

2013

Thèse n° 73304

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole doctorale des

Sciences de la vie et de la santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement le 04 mars 2013

Par Pierre Cardinal

Né(e) le 12/05/1983 à Chenôve

Rôle du récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB₁) hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique et de l'homéostasie du glucose

Sous la direction du Dr Daniela Cota

Membres du Jury

Mme Sophie LAYE, Directeur de recherches, INRA UMR 1286, Bordeaux

Président

Mr Sébastien BOURET, Group leader, Los Angeles ; Chargé de recherches CNRS, Inserm U837, Lille

Rapporteur

Mme Patricia PARNET, Directeur de recherches, INRA UMR 1280, Nantes

Rapporteur

Mr Philippe CIOFI, Chargé de recherches, INSERM U862, Bordeaux .

Examineur

Mr Uberto PAGOTTO, Médecin-chercheur, Université de Bologne

Examineur

Mme Daniela Cota, Chargée de recherches, INSERM U862, Bordeaux

Directeur de thèse

Résumé

Le système endocannabinoïde est un acteur majeur de la régulation de la balance énergétique. Cependant, son rôle au niveau de l'hypothalamus, une région critique dans la régulation de la balance énergétique, reste méconnu. **L'objectif général de ce travail de thèse a été de disséquer le rôle du récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB₁) exprimé par des populations neuronales hypothalamiques spécifiques dans la régulation de la balance énergétique et l'homéostasie du glucose en caractérisant trois nouvelles lignées de souris possédant une mutation conditionnelle de CB₁.**

En régime standard, la délétion de CB₁ dans l'hypothalamus induit une augmentation de la dépense énergétique et une baisse de prise de poids corporel sans modifier la prise alimentaire alors que la délétion de CB₁ dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMN-CB₁-KO) entraîne une baisse significative de masse grasse, une augmentation de l'oxydation des acides gras *in vivo*, une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (SNS) et un métabolisme du glucose périphérique amélioré. Enfin, la délétion de CB₁ dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN-CB₁-KO) induit une baisse de poids sans modifier la prise alimentaire ni la composition corporelle.

Lors de l'exposition à un régime riche en graisses, les souris VMN-CB₁-KO prennent plus de poids et de masse grasse que les WT, tandis que les souris PVN-CB₁-KO sont partiellement protégées de l'obésité alimentaire grâce à une dépense énergétique accrue.

Ces résultats suggèrent que CB₁ exprimé par différentes populations hypothalamiques joue un rôle différent dans la régulation de la balance énergétique, qui dépend aussi du régime alimentaire.

Mots-clés : Hypothalamus, CB₁, balance énergétique, leptine, régime riche en graisses

2013

Thesis n° 73304

THESIS

For the

DOCTORATE OF BORDEAUX 2 UNIVERSITY

Doctoral school of

Sciences de la vie et de la santé

Option: Neurosciences

Presented and publicly defended on March, 4th, 2013

By Pierre Cardinal

Born on 05/12/1983 in Chenôve

Role of hypothalamic cannabinoid type 1 receptors (CB₁) in energy balance regulation and glucose homeostasis

Under the direction of Dr Daniela Cota

Jury Members

Mme Sophie LAYE, Directeur de recherches, INRA UMR 1286, Bordeaux

Président

Mr Sébastien BOURET, Group leader, Los Angeles ; Chargé de recherches CNRS, Inserm U837, Lille

Rapporteur

Mme Patricia PARNET, Directeur de recherches, INRA UMR 1280, Nantes

Rapporteur

Mr Philippe CIOFI, Chargé de recherches, INSERM U862, Bordeaux .

Examineur

Mr Uberto PAGOTTO, Médecin-chercheur, Université de Bologne

Examineur

Mme Daniela Cota, Chargée de recherches, INSERM U862, Bordeaux

Directeur de thèse

Summary

The endocannabinoid system is a major player in energy balance regulation. However, a complete understanding of its role within the hypothalamus, a region critically involved in energy balance regulation, is still missing. **The general aim of this PhD work was to dissect the specific role of the cannabinoid type 1 receptor (CB₁) expressed on different hypothalamic neuronal populations in energy balance regulation and glucose homeostasis by characterizing three new mouse mutant lines with a conditional deletion of CB₁.**

On standard diet, CB₁ deletion within the hypothalamus induced an increase in energy expenditure and a decrease in body weight gain without modifying food intake, while CB₁ deletion within the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMN-CB₁-KO) decreased fat mass, increased fatty acid oxidation *in vivo* and sympathetic nervous system (SNS) activity, and improved peripheral glucose metabolism. CB₁ deletion within the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN-CB₁-KO) decreased body weight gain without affecting food intake or body composition.

When exposed to a high-fat diet, VMN-CB₁-KO mice gained significantly more weight and fat mass than their WT, while PVN-CB₁-KO mice were partly protected from diet-induced obesity thanks to increased energy expenditure.

These results overall suggest that CB₁ expressed on different hypothalamic neuronal populations have distinct roles in energy balance regulation, which in turn also depend on the diet consumed.

Key words: Hypothalamus, CB₁, energy balance, leptin, high-fat diet

Liste des abréviations utilisées

2-AG : 2-arachidoynolglycérol
2-DG : 2-déoxy glucose
5-HT : sérotonine
 α -MSH : hormone stimulant les α -mélanocytes
 β 3-AdrR : récepteur β 3-adrénergique
 β -MSH : hormone stimulant les β -mélanocytes
AAV : virus adéno-associé
ACC-1 : acétyl-coA carboxylase 1
ACC-2 : acétyl-coA carboxylase 2
ACTH : hormone adrénocorticotrope
AEA : anandamide
AgRP : agouti gene related peptide
AHA : aire hypothalamique antérieure
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
AMPK : protéine kinase activée par l'AMP
ANOVA : analyse de variance
aPV : noyau périventriculaire de l'hypothalamus
ARC : noyau arqué de l'hypothalamus
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP : adénosine tri-phosphate
AVP : vasopressine
BAT : tissu adipeux brun
BDNF : brain-derived neurotrophic factor
CART : cocaine, amphétamine regulated transcript
CB₁ : récepteur aux cannabinoïdes de type 1
CB₂ : récepteur aux cannabinoïdes de type 2
CCK : cholécystokinine
Cox IV : cyclooxygénase IV
CPT-1 β : carnitine palitoyltransférase 1 β
Cre : cre-recombinase
CRH : corticotrophin-releasing hormone
DAGL : diacylglycérol lipase
DMH : noyau dorsomédian de l'hypothalamus
DRN : noyau du raphé dorsal
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique
E α : récepteur aux oestrogènes α

FAAH : fatty acid amid hydrolase
GABA : acide γ aminobutyrique
GFP : green fluorescent protein
GK : glucokinase
GLP-1 : glucagon-like peptide 1
GRP : peptide libérant la ghréline
GTT : test de tolérance au glucose
HFD : régime enrichi en graisses
HOMA : homeostasis model assessment
HPA : axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien
Hyp : hypothalamus
icv : intracérébroventriculaire
IR : récepteur à l'insuline
ip : intra-péritonéal(e)
ITT : test de tolérance à l'insuline
KO : knock-out
LH : aire hypothalamique latérale
LR : récepteur à la leptine
LRb : forme longue du récepteur à la leptine
MAGL : monoacylglycérol lipase
MAPK : mitogen activated protein kinase
MCH : hormone concentrant la mélanine
MCR : récepteur aux mélanocortines
MT-II : mélanotane II
mTOR : cible de la rapamycine chez les mammifères
NAPE-PLD : N-acylphosphatidyl-éthanolamine-spécifique phospholipase D
NPY : neuropeptide Y
NTS : noyau du tractus solitaire
OXM : oxyntomoduline
OXT : ocytocine
PBN : noyau parabrachial
PCR : polymerase chain reaction
PET : tomographie par émission de positron
PGC-1 α : peroxisome proliferator gamma Co activator 1 alpha
PI3K : phosphatidylinositol-3-OH kinase
POA : aire pré-optique
POMC : pro-opiomélanocortine

Ppar γ : peroxisome proliferator activated receptor gamma
PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
PYY : peptide YY
qPCR : PCR quantitative en temps réel
RER : quotient respiratoire
SCN : noyau supra-chiasmatique de l'hypothalamus
SEC : système endocannabinoïde
SF1 : stéroïdogénic factor 1
Sim : single-minded gene
SNC : système nerveux central
SNS : système nerveux sympathique
SOCS3 : suppressor of cytokine signaling 3
SON : noyau supraoptique de l'hypothalamus
STAT3 : Signal Transducer And Activator of Transcription 3
SUV : valeur d'absorption standard
Tfam : Transcription factor A, mitochondrial
THC : (-)- Δ^9 - tétrahydrocannabinol
TRH : thyrotropin-releasing hormone
UCP-1 : uncoupling protein-1
Vglut2 : transporteur vésiculaire du glutamate 2
VIP : polypeptide vasoactif intestinal
VMN : noyau ventromédian de l'hypothalamus
VTA : aire tégmentale ventrale
WAT : tissu adipeux blanc
WIN : WIN-55212-2
WT : sauvage (Wild Type)
Y1 : récepteur au NPY 1
Y5 : récepteur au NPY 5

Liste des publications et communications scientifiques

Publications

- **Cardinal P**, Bellocchio L, Clark S, Cannich A, Klugmann M, Lutz B, Marsicano G, Cota D. Hypothalamic CB₁ Cannabinoid Receptors Regulate Energy Balance in Mice. *Endocrinology*, 2012 Sep;153(9):4136-43.
- Bermudez-Silva FJ, **Cardinal P**, Cota D. The Role of the Endocannabinoid System in the Neuroendocrine Regulation of Energy Balance. *J Psychopharmacol* 2012 Jan;26(1):114-24. (revue)
- Dubreucq S, Matias I, **Cardinal P**, Häring M, Lutz B, Marsicano G, Chaouloff F. Genetic Dissection of the Role of Cannabinoid Type-1 Receptors in the Emotional Consequences of Repeated Social Stress in Mice. *Neuropsychopharmacology* 2012 Juil; 37(8):1885-900.
- Bellocchio L, Soria-Gomez E, Quarta C, Metna-Laurent M, **Cardinal P**, Elke Binder E, Cannich A, Delamarre A, Häring M, Martín-Fontecha M, Vega D, Bartsch D, Monory K, Lutz B, Chaouloff F, Guzman M, Pagotto U, Cota D, Marsicano G. Activation of the sympathetic nervous system mediates hypophagic and anxiety-like effects of CB₁ receptor blockade. *PNAS*, 2013, March 9;110(12):4786-91

Publications en préparation

- **Cardinal P**, Bellocchio L, Quarta C, Clark S, Elie M, Leste-Lasserre T, Maitre M, Cannich A, Pagotto U, Marsicano G, Cota D. Diet-dependent role of VMN CB₁ cannabinoid receptor in the regulation of energy balance.
- **Cardinal P**, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Leste-Lasserre T, Cannich A, Marsicano G, Cota D. PVN CB₁ cannabinoid receptors regulate energy expenditure.
- Mancini G, Srivastava RK, Aparisi Rey A, Quarta C, **Cardinal P**, Tedesco L, Zingaretti CM, Sassmann A, Conrad A, Schwitter C, Wettschureck N, Monory K, Cinti S, Marsicano G, Offermanns S, Nisoli E, Cota D, Pagotto U, Lutz B. Adipocyte cannabinoid CB₁ receptor is a key regulator of body energy homeostasis.
- Bosier B, Bellocchio L, Metna-Laurent M, Soria-Gomez E, Matias I, Cannich A, Maitre M, Verrier D, Leste-Lasserre T, **Cardinal P**, Mendizabal-Zubiaga J, Canduela MJ, Reguero L, Chaouloff F, Hermans E, Grandes P, Cota D, Marsicano G. Critical role of astroglial CB₁ cannabinoid receptors in the regulation of leptin-mediated functions.

Communications orales

- **Cardinal P**, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Marsicano G, Cota D. “The role of CB₁ located in the ventromedial nucleus in energy and glucose homeostasis.” Congrès de la société américaine d’obésité (TOS) à Orlando, Octobre 2011
- **Cardinal P**, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Marsicano G, Cota D. “The role of CB₁ located in the ventromedial nucleus in energy and glucose homeostasis.” Symposium de l’Institut F. Magendie à Bordeaux (France), Décembre 2011
- **Cardinal P**, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Marsicano G, Cota D. “The role of CB₁ located in the ventromedial nucleus in energy and glucose homeostasis.” Congrès européen sur l’obésité (ECO) à Lyon (France), Mai 2012

Communications affichées (Poster)

- **Cardinal, P**, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Marsicano G, Cota D. “The role of CB₁ located in the ventromedial nucleus in energy and glucose homeostasis.” Symposium de l’Institut F. Magendie à Bordeaux (France), Septembre 2010
- **Cardinal, P**, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Marsicano G, Cota D. “The role of CB₁ located in the ventromedial nucleus in energy and glucose homeostasis.” Doctoral school meeting à Arcachon, Avril 2011
- **Cardinal, P**, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Marsicano G, Cota D. “Opposite role of CB₁ signaling of the paraventricular and ventromedial nuclei of the hypothalamus in energy balance regulation.” Journée de l’Ecole Doctorale à Arcachon, Avril 2012
- **Cardinal, P**, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Marsicano G, Cota D. “Role of hypothalamic paraventricular CB₁ receptor in energy balance regulation.” Symposium de l’Institut F. Magendie à Bordeaux (France), Septembre 2012

Remerciements

Je voudrais remercier le Dr Philippe Ciofi pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. C'est un honneur et un plaisir de vous compter parmi les membres de ce jury. Nos discussions sur le balcon me manquent, dommage que tu aies arrêté de fumer.

Je voudrais remercier le Dr Sébastien Bouret d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. C'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je voudrais remercier le Dr Patricia Parnet d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. C'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je voudrais remercier le Dr Sophie Layé d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. C'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Vorrei ringraziare il Dr Uberto Pagotto di aver accettato di far parte della mia « jury de thèse ». E' un onore di averla tra i membri della mia commissione. Vorrei esprimerle i miei più sinceri e sentiti ringraziamenti.

Vorrei ringraziare la Dr Daniela Cota di avermi accolto in tesi nella sua équipe, e di aver supervisionato il mio lavoro nel corso di questi tre anni. So di non essere stato sempre al meglio delle mie capacités e vorrei ringraziarti per la tua pazienza e la tua grande comprensione. Vorrei anche ringraziarti per la qualità dei tuoi insegnamenti che ho ricevuto nel corso di questi tre anni, oltre ad essere una brillante scienziata sei anche « très pédagogue ». Infine ti vorrei ringraziare per avermi introdotto nel mondo del sistema endocannabinoïde e del bilancio énergétique, soggetto che si è rivelato essere molto appassionante. Grazie mille per tutto Daniela.

I would like to thank Mrs Samantha James (aka Sergie) for being so nice and happy during all the time I have been in this team with you. Thank you for playing the role of my "second mom" and for the support you gave me during these three years.

Je voudrais également remercier Isabelle Trenque pour m'avoir supporté durant ces derniers mois. Je sais que l'écriture de ma thèse ne m'a pas rendu le plus agréable des hommes. Merci mon cœur d'avoir enduré cette épreuve avec moi et j'espère être aussi là pour toi quand tu rédigeras la tienne.

Je voudrais remercier le Dr Mathieu Pizon d'avoir été là toute ces années. Des amis comme ça, on les compte sur les doigts d'une main. Merci encore pour ces soirées burgers et films qui m'ont toujours remonté le moral quand ça n'allait pas. Merki Chonchon !!

Je voudrais également remercier ma famille, mes parents, mes frères et tous les autres. Sentir une famille unie comme ça, ça fait vraiment chaud au cœur. En espérant que cela dure toujours. Merci à vous d'avoir cru en moi et d'avoir toujours été là pour moi malgré les épreuves.

Enfin, je voudrais remercier tous les membres (anciens et actuels) de l'équipe « physiopathologie de l'équilibre énergétique et obésité ». Merci à vous tous(tes) pour votre bonne humeur et votre gentillesse au cours de ces années. Merci de m'avoir aidé quand j'en avais besoin, de m'avoir supporté quand ça n'allait pas, de vos conseils.

Je voudrais également remercier le Dr Giovanni Marsicano sans qui ces travaux de thèse n'auraient pas pu être réalisés. Grazie Gio per tutto.

Je souhaiterais remercier le Dr Luigi Bellocchio qui m'a grandement aidé au début de ma thèse et qui a toujours été un interlocuteur de choix. Grazie Gigett per tutto.

Je voudrais également remercier tout le personnel des différentes plates-formes de l'unité U862 pour leur super boulot qui simplifie et facilite le nôtre au quotidien.

Merci également à Isabel Gauthereau. Te rencontrer au cours de ma thèse a été un réel plaisir et m'a fait beaucoup avancer. Merci à toi.

Enfin je voudrais remercier l'INSERM et la région Aquitaine qui ont financé ces travaux de thèse ; l'école doctorale qui m'a autorisé à faire une 4ème année de thèse, et le LabEx, qui a accepté de la financer.

Table des matières

Chapitre I : Introduction générale.....	14
Le concept de balance énergétique	15
L'hypothalamus.....	17
Anatomie générale	17
Fonctions de l'hypothalamus	18
L'hypothalamus et la balance énergétique.....	18
Le système endocannabinoïde et la balance énergétique	30
Brève histoire du système endocannabinoïde	30
Le SEC et la balance énergétique.....	32
Chapitre II : Etude du rôle du récepteur CB₁ hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique chez la souris.	37
Résumé.....	38
Introduction.....	38
Matériels et méthodes	39
Animaux.....	39
Délétion du gène du récepteur CB ₁ médiée par un virus adéno-associé dans l'hypothalamus	39
Hybridation fluorescente in situ	40
PCR quantitative en temps réel (qPCR)	40
Prise alimentaire en réponse au rimonabant et à la leptine	40
Calorimétrie indirecte.....	41
Statistiques	41
Résultats.....	42
Effets de la délétion des récepteurs CB ₁ hypothalamiques sur la balance énergétique	42
Effet de l'administration de rimonabant chez les souris Hyp-CB ₁ -KO	42
Effet de l'administration de leptine chez les souris Hyp-CB ₁ -KO	43
Discussion	45
Chapitre III : Le rôle du récepteur CB₁ dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus dans la régulation de la balance énergétique chez la souris.	48
Résumé.....	49
Introduction.....	49
Matériels et méthodes	50
Animaux.....	50
Analyse de la composition corporelle.....	50
Etude de la réponse alimentaire à la leptine	51
Tests de tolérance au glucose et à l'insuline	51
Calorimétrie indirecte.....	51
Tomographie par émission de positrons (PET)	51
Analyse de l'ADN génomique	52
Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel.....	52
Double hybridation in situ fluorescente	53
Immunohistochimie (IHC).....	53
Quantification des hormones	54
Analyse statistique.....	54
Résultats.....	54
Génération et caractérisation des souris VMN-CB ₁ -KO	54
Les souris avec la délétion de CB ₁ dans les neurones SF1 sont plus minces et ont une oxydation des acides gras augmentée en régime standard	55
Les souris mâles VMN-CB ₁ -KO ont une meilleure sensibilité à l'insuline en régime standard	58
Les souris VMN-CB ₁ -KO ont une sensibilité à la leptine accrue.....	60

Les souris VMN-CB ₁ -KO sont plus sensibles à l'obésité alimentaire.....	61
Discussion	63
<i>Chapitre IV : Le rôle du récepteur CB₁ dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus dans la régulation de la balance énergétique et l'homéostasie du glucose chez la souris..</i>	
Résumé.....	68
Introduction.....	68
Matériels et méthodes	69
Animaux.....	69
Analyse de la composition corporelle.....	70
Tests de tolérance au glucose et à l'insuline	70
Calorimétrie indirecte.....	70
Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel.....	70
Double hybridation in situ fluorescente	71
Quantification des hormones et des métabolites	72
Analyse statistique.....	72
Resultats	72
Génération et caractérisation des souris PVN-CB ₁ -KO	72
La délétion de CB ₁ exprimé dans les neurones Sim réduit la prise de poids chez les mâles en régime standard.....	73
La délétion de CB ₁ exprimé dans les neurones Sim ne modifie pas la composition corporelle ni la dépense énergétique en régime standard.....	73
La délétion de CB ₁ exprimé dans les neurones Sim ne modifie pas les concentrations basales de corticostérone en régime standard	74
La délétion de CB ₁ exprimé dans les neurones Sim ne modifie pas la régulation de la glycémie en régime standard.....	75
La délétion de CB ₁ dans les neurones Sim protège de l'obésité alimentaire	75
Changements moléculaires dans les tissus adipeux chez les souris PVN-CB ₁ -KO en régime riche en graisse	76
Sensibilité accrue à l'insuline chez les souris PVN-CB ₁ -KO en régime riche en graisse	76
Discussion	77
<i>Chapitre V : Discussion Générale.</i>	
80	
Le CB ₁ hypothalamique et son rôle dans la prise de poids et la composition corporelle en régime standard.....	81
CB ₁ hypothalamique et prise alimentaire en régime standard	81
Le CB ₁ hypothalamique joue un rôle dans la dépense énergétique en régime standard.....	83
CB ₁ hypothalamique et régulation de la glycémie en régime standard	85
CB ₁ hypothalamique et obésité alimentaire.....	85
CB ₁ hypothalamique et genre.....	87
Remarques finales	88
<i>Bibliographie</i>	90
<i>Annexes.....</i>	104

Chapitre I : Introduction générale

Le concept de balance énergétique

L'énergie est à la base de toute vie. Sans elle, nous ne serions que de la matière inerte. Elle permet le développement, la survie et la reproduction de tout organisme, qu'il soit uni ou pluricellulaire. La vie repose donc sur la capacité à détecter des sources d'énergie dans le milieu extérieur afin de les transformer en énergie utilisable pour l'organisme, et à les stocker. La balance énergétique représente donc l'homéostasie de l'énergie chez les êtres vivants. Pour survivre, un organisme, qu'il soit uni ou pluri cellulaire, animal ou végétal, doit connaître ses besoins énergétiques et ses réserves afin de moduler l'un et l'autre pour assurer le bon fonctionnement des ses différentes fonctions.

Au niveau cellulaire, la régulation de la balance énergétique repose sur la capacité de la cellule à capter, transformer, stocker et utiliser les nutriments présents dans l'environnement. Par exemple, si elle possède des mécanismes permettant de détecter le glucose extérieur, puis d'autres qui lui permettant de le transférer à l'intérieur de la cellule, cela lui confère un avantage de survie indéniable [1]. Au cours de l'évolution des espèces, ces mécanismes se sont complexifiés. En effet, alors que les espèces les plus primaires, comme les organismes unicellulaires, sont uniquement dirigées par leurs besoins endogènes, les espèces plus évoluées telles que les mammifères sont également soumises à des facteurs exogènes. Cela est vrai notamment pour les êtres humains, où de nombreux facteurs extérieurs influencent la prise alimentaire et participent à l'épidémie d'obésité que le monde connaît actuellement [2-4].

Historiquement, il était supposé par les anciens philosophes grecs que le siège de la régulation de la faim se situait en périphérie, dans la cavité abdominale [5]. Plus précisément, Claude Galien avait émis l'hypothèse que l'estomac était le centre de la faim [5]. Cette hypothèse a survécu jusqu'au 19^{ème} siècle, quand de nouvelles théories furent formulées. Notamment Magendie, Tidewald ou encore Roux avaient postulé qu'un « centre de la faim » était localisé dans le système nerveux central (SNC), et que ce centre était sensible aux variations de concentrations de nutriments dans le sang [5]. Les différentes études lésionnelles et d'électrostimulations cérébrales réalisées dans la première moitié du 20^{ème} siècle ont révélé que l'hypothalamus est une zone primordiale pour la régulation de la balance énergétique. En particulier, les études pionnières d'Hetherington et Ranson dans ce domaine ont révélé que lorsque le noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMN) est lésé, cela induit une hyperphagie et une obésité chez le rat; ce noyau fut ainsi reconnu comme le centre de la satiété. A l'inverse, une lésion de l'aire hypothalamique latérale (LH) induisait une hypophagie et une perte de poids, aboutissant à la conclusion que cette région cérébrale était le centre de la faim [5].

En parallèle, les hypothèses sur les mécanismes permettant la régulation de la balance énergétique ont évolué et, sachant que les deux principales sources d'énergie cellulaire sont les glucides et les acides gras, les théories lipostatique et glucostatique ont émergé [6]. La théorie lipostatique, originellement formulée par Kennedy dans les années 50, repose sur la capacité du cerveau à déterminer le stock énergétique disponible (sous forme de graisses) [6] par l'intermédiaire de « signaux d'adiposité » dont les concentrations circulantes dans le sang reflètent les stocks de graisses [7]. Un signal d'adiposité doit remplir plusieurs critères : ses concentrations circulantes doivent refléter les stocks de graisse, il doit pouvoir interagir avec le cerveau (en traversant la barrière hémato-encéphalique) en se fixant à des récepteurs spécifiques dans des régions cérébrales impliquées dans la régulation de la balance énergétique, et ses variations de concentrations doivent entraîner des changements prédictibles de la prise alimentaire et de la dépense énergétique [6]. Le signal d'adiposité le plus étudié à ce jour est l'hormone leptine, le produit du gène *ob* [8], qui est principalement sécrétée par les adipocytes du tissu adipeux blanc (WAT) [9], et une petite partie par l'estomac [10], qui, en se fixant sur ses récepteurs (LR) dans l'hypothalamus module la prise alimentaire et la dépense énergétique pour garantir l'homéostasie énergétique. Le WAT est donc la « réserve énergétique » de l'organisme, puisqu'il permet d'emmagasiner les graisses

puis de les libérer si l'énergie vient à manquer. Mais ce tissu est également un important organe endocrine, jouant un rôle critique dans la régulation de la balance énergétique et du métabolisme du glucose [6, 9, 11].

Un autre signal d'adiposité est l'insuline, sécrétée par les cellules β du pancréas [12]. Elle a pour rôle principal la régulation de la glycémie mais elle possède également les caractéristiques d'un signal d'adiposité avec ses concentrations qui augmentent après un repas et diminuent pendant le jeûne, et sa capacité à agir directement sur les circuits hypothalamiques via l'activation des récepteurs à l'insuline (IR) au niveau neuronal [12]. De plus, elle stimule la lipogenèse au niveau du foie et réduit en parallèle la lipolyse au niveau du WAT [13].

La théorie glucostatique, formulée par Jean Mayer dans les années 50, proposait quant à elle que le cerveau, et l'hypothalamus en particulier, régule la balance énergétique en détectant et en modulant le stockage et le métabolisme des carbohydrates [12, 14]. Bien que le maintien de la balance énergétique sur le long terme semble plus reposer sur les mécanismes lipostatiques, il existerait un effet à court terme du glucose sur la prise alimentaire car l'injection intra-péritonéale (i.p.) de 2-déoxy glucose (2-DG), un analogue non métabolisable du glucose, stimule la prise alimentaire [15]. Cependant, les repas sont généralement pris avant d'être en sévère hypoglycémie et la stimulation de la prise alimentaire induite par la glucopénie a été proposée comme un mécanisme « de secours » en cas de forte hypoglycémie [12, 16]. D'un autre côté, de nombreuses études ont révélé que le métabolisme périphérique du glucose est en partie régulé par l'hypothalamus [12, 16].

Les différentes théories sur la façon dont le cerveau peut intégrer les informations sur les stocks énergétiques et l'énergie disponible pour l'organisme (signaux d'adiposité, glucose, nutriments...) ont évolué en parallèle avec les recherches neuro-anatomiques permettant d'identifier les noyaux hypothalamiques spécifiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique. Cela a permis de mettre en évidence de nombreux acteurs de la régulation de la balance énergétique incluant plusieurs hormones, de nombreux neurotransmetteurs et leurs récepteurs ainsi que les cascades intracellulaires associées à leurs activations [17]. Dernièrement, le système endocannabinoïde (SEC) s'est révélé comme un régulateur majeur de la balance énergétique. En effet, ce système, qui inclut des récepteurs spécifiques, les récepteurs aux cannabinoïdes de types 1 et 2 (CB₁ et CB₂, respectivement), des ligands endogènes appelés endocannabinoïdes, dont les deux plus étudiés sont l'anandamide (AEA) et le 2-arachidoynolglycérol (2-AG), et les machineries enzymatiques responsables de leur synthèse et leur dégradation [18], affecte la balance énergétique en agissant sur des cibles aussi bien centrales que périphériques [19, 20]. Le récepteur CB₁ a été reconnu comme jouant un rôle primordial dans la modulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique [21-23], et il affecte le métabolisme des lipides et du glucose dans les tissus périphériques [19, 20, 24]. Paradoxalement, alors que CB₁ et ses ligands endogènes sont présents au niveau hypothalamique, peu d'études ont tenté d'élucider le rôle spécifique de CB₁ dans cette structure, et en particulier dans les différents noyaux hypothalamiques connus pour jouer un rôle dans la régulation de la balance énergétique.

Mon projet de thèse a eu pour objectif de tenter de comprendre quel pouvait être le rôle du CB₁ hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique, ceci par la caractérisation comportementale et moléculaire de trois modèles de souris transgéniques. Donc je décrirais, au cours de mon introduction, le rôle des différents noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique et de l'homéostasie du glucose. Puis j'introduirai le SEC et montrerai les liens existant entre le SEC et l'hypothalamus dans le contexte de la régulation de la balance énergétique. Ensuite, je poursuivrai par les trois études que j'ai menées dans le contexte de mes travaux de thèse. En particulier, dans la première étude, nous avons créé un modèle murin possédant une délétion du gène codant pour CB₁ dans l'hypothalamus, dont nous avons ensuite étudié les prises de poids et de nourriture, ainsi que la dépense énergétique. Dans la seconde étude, nous avons caractérisé une nouvelle lignée transgénique de souris possédant une délétion de CB₁

restreinte au noyau ventromédian (VMN) de l'hypothalamus. Enfin, dans ma troisième étude, j'ai examiné l'impact de la délétion de CB₁ au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus sur la régulation de la balance énergétique. Je terminerai par une discussion générale sur les 3 modèles que j'ai caractérisés et par une analyse des résultats obtenus, et conclurai sur le rôle du CB₁ hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique et de l'homéostasie du glucose.

L'hypothalamus

Anatomie générale

Historiquement, la première description de l'hypothalamus est attribuée à Andreas Vesalius (1514-1564), qui fut le premier à le représenter dans son célèbre ouvrage sur l'anatomie humaine *De humani corporis fabrica* (1543). De nombreuses observations cliniques ont ensuite été faites sur cette région cérébrale au cours des siècles mais ce n'est qu'au début du 20^{ème} siècle qu'est réalisée la première investigation expérimentale de l'hypothalamus [16]. Le développement des méthodes histologiques, ainsi que l'apparition de la stéréotaxie ont permis par la suite de déterminer précisément la localisation de chaque noyau et d'étudier spécifiquement le rôle de chacun [12].

L'hypothalamus est une structure du SNC située sous le thalamus (d'où son nom) dont il est séparé par le sillon de Monroe. Il forme le plancher et les parois inféro-latérales du 3^{ème} ventricule. Il est délimité en avant par les chiasmas optiques, en arrière par le tegmentum mésencéphalique et il est relié à l'hypophyse par la tige infundibulaire et l'éminence médiane. Il se compose de trois régions principales : antérieure, moyenne et latérale [25].

a. L'hypothalamus antérieur

Il se situe au-dessus du chiasma optique et sous le PVN. Il se compose des noyaux préoptiques périventriculaire, médian et latéral ainsi que du noyau suprachiasmatique (SCN).

b. L'hypothalamus moyen

Il se situe au-dessus de la tige infundibulaire et se compose des noyaux suivants :

- Le noyau arqué (ARC), dans la partie la plus ventrale de l'aire moyenne, est en contact avec les cellules épendymaires bordant le 3^{ème} ventricule.
- Le VMN, situé au-dessus de l'ARC
- Le noyau dorsomédian (DMH), au-dessus du VMN
- Le PVN
- Le noyau supraoptique (SON)
- Le noyau périventriculaire (aPV)
- Les corps mamillaires
- Le noyau hypothalamique postérieur

c. L'hypothalamus latéral

Aussi appelé aire hypothalamique latérale (LH), l'hypothalamus latéral se compose de 2 noyaux formés d'une matrice neuronale pauvre en cellules et est délimité médialement par le tractus mammillothalamique et la colonne antérieure du fornix. Le bord moyen de la capsule interne et la région sous-thalamique forment sa frontière latérale.

La figure 1 illustre la neuro-anatomie générale de l'hypothalamus.

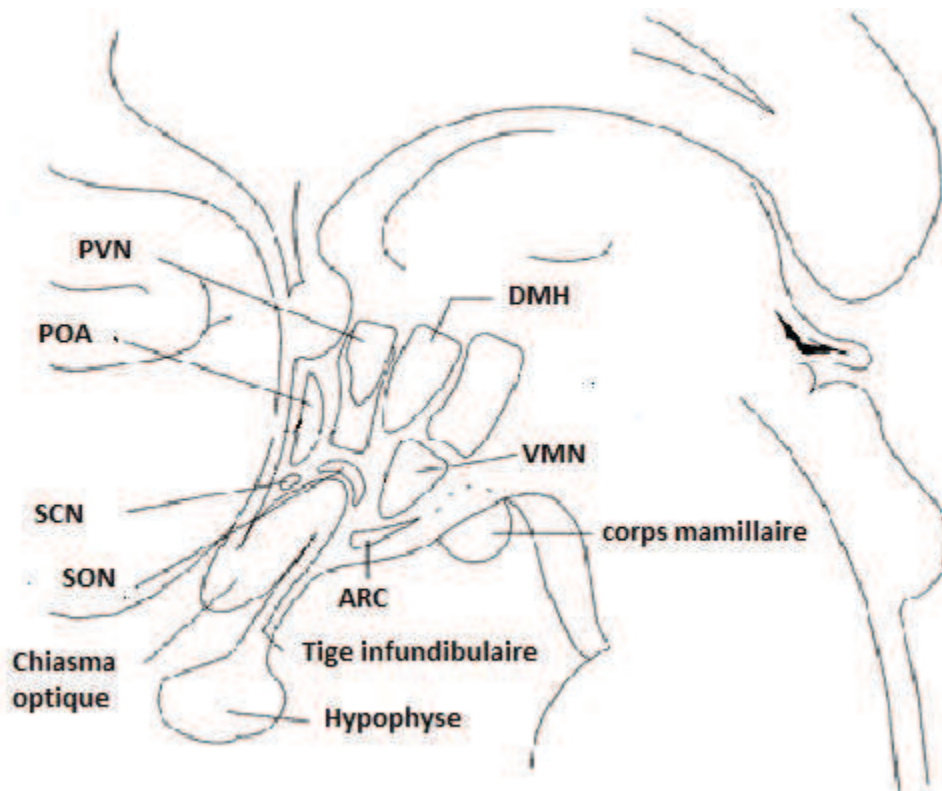


Figure 1. Représentation schématique des principaux noyaux hypothalamiques circumventriculaires en vue latérale. ARC : noyau arqué ; DMH : Noyau hypothalamique dorsal ; POA : aire pré-optique ; PVN : noyau paraventriculaire ; SCN : noyau suprachiasmatique ; SON : noyau supra-optique ; VMN : noyau ventromédian. Adaptée de [26].

Fonctions de l'hypothalamus

L'hypothalamus est une structure dont les fonctions sont très conservées au cours de l'évolution, à la différence de nombreuses autres structures du SNC qui varient entre les espèces. L'hypothalamus peut être comparé à un capteur et un centre intégrateur des différentes variables des milieux intérieur (corps) et extérieur (environnement). L'hypothalamus est le principal relais entre les fonctions inférieures ou viscérales (tronc cérébral et moelle épinière) et supérieures (système limbique, cortex). Il est donc un centre d'intégration d'une grande partie des fonctions végétatives dépendant du système nerveux autonome telles que la fréquence cardiaque, la vasodilatation et la température corporelle [26]. Il est impliqué dans la balance hydrique (et plus généralement dans le maintien de l'osmolarité du milieu intérieur), dans la régulation des rythmes circadiens (grâce à la photopériode détectée au niveau du SCN), dans la différenciation sexuelle, la reproduction et la lactation (même le comportement monogame ou polygame), dans les réponses au stress et immunitaires, dans l'intégration des stimuli olfactifs (comme les phéromones) et, ce qui nous intéresse plus particulièrement, dans la régulation de la balance énergétique [27].

L'hypothalamus et la balance énergétique

Les neurones hypothalamiques ont la capacité de détecter les concentrations plasmatiques de nombreuses hormones sécrétées par les organes ou tissus périphériques (Fig. 2). D'après les connaissances actuelles, les circuits hypothalamiques répondent à la leptine [28], l'insuline, la ghréline [29], une hormone sécrétée par l'estomac qui stimule la prise alimentaire, et diverses hormones intestinales médiant la satiété telles que la cholécystokinine (CCK), le glucagon-like peptide 1 (GLP-1), le Peptide YY (PYY) [30], mais également directement aux nutriments (glucose, acides gras et acide aminés) [31]. Il peut également détecter les variations de concentrations d'autres hormones et cytokines produites par le WAT telles que l'adiponectine ou les interleukines. Grâce à cette capacité de « capteur » de l'hypothalamus, le cerveau est ainsi constamment informé du statut énergétique de

l'organisme et peut moduler les réponses des fonctions cérébrales sur la périphérie selon ses besoins. Plus spécifiquement, les circuits neuronaux hypothalamiques adaptent la prise alimentaire aux besoins de l'organisme en modulant la réponse de tous les organes qui y participent, tels que l'estomac, l'intestin, le foie, le pancréas, et contrôlent la dépense énergétique par le biais du système nerveux sympathique (SNS). En parallèle, ils modulent le stockage des lipides au niveau du tissu adipeux et l'homéostasie glycémique.

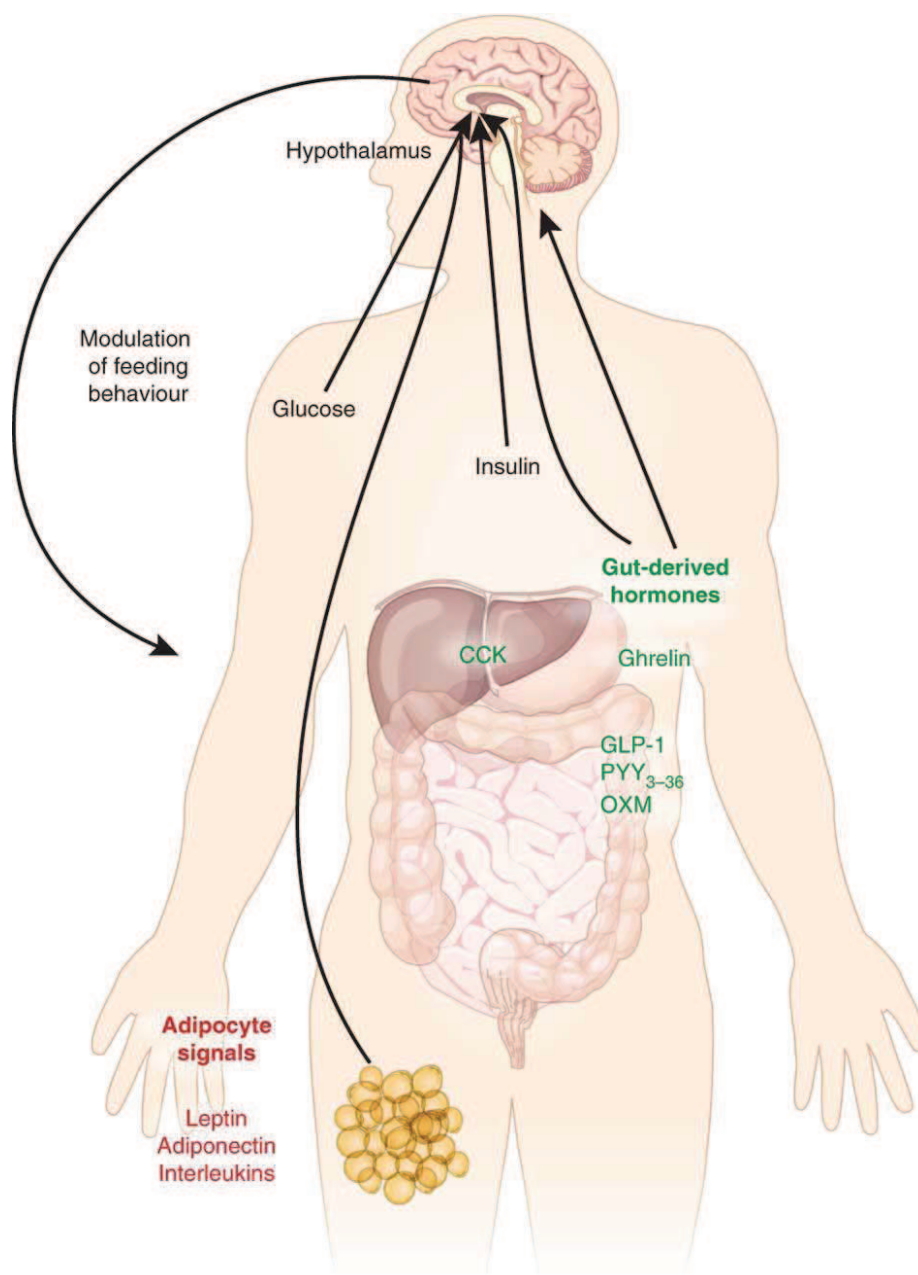


Figure 2. (extraite de [32]) Représentation schématique des différents signaux périphériques captés par l'hypothalamus dans la régulation du comportement alimentaire. Le tissu adipeux blanc libère la leptine, l'adiponectine ainsi que des interleukines. L'estomac synthétise la ghréline et l'intestin la cholécystokinine (CCK), le gastric releasing peptide 1 (GLP-1), le peptide YY (PYY) ou bien encore l'oxytomoduline (OXM). Toutes ces hormones, ainsi que le glucose et l'insuline, agissent au niveau de l'hypothalamus pour moduler le comportement alimentaire.

Au sein de l'hypothalamus, de nombreux noyaux et populations neuronales ont été révélés comme jouant un rôle dans la régulation de la balance énergétique. Ces structures permettent d'intégrer les signaux hormonaux et des nutriments afin d'engager les réponses adaptatives d'ingestion d'énergie (via les aliments), de stockage et/ou utilisation [33]. Les principaux noyaux impliqués sont l'ARC, le VMN, le PVN, le DMH, le LH et, dans une moindre mesure, le SCN (Fig. 3).

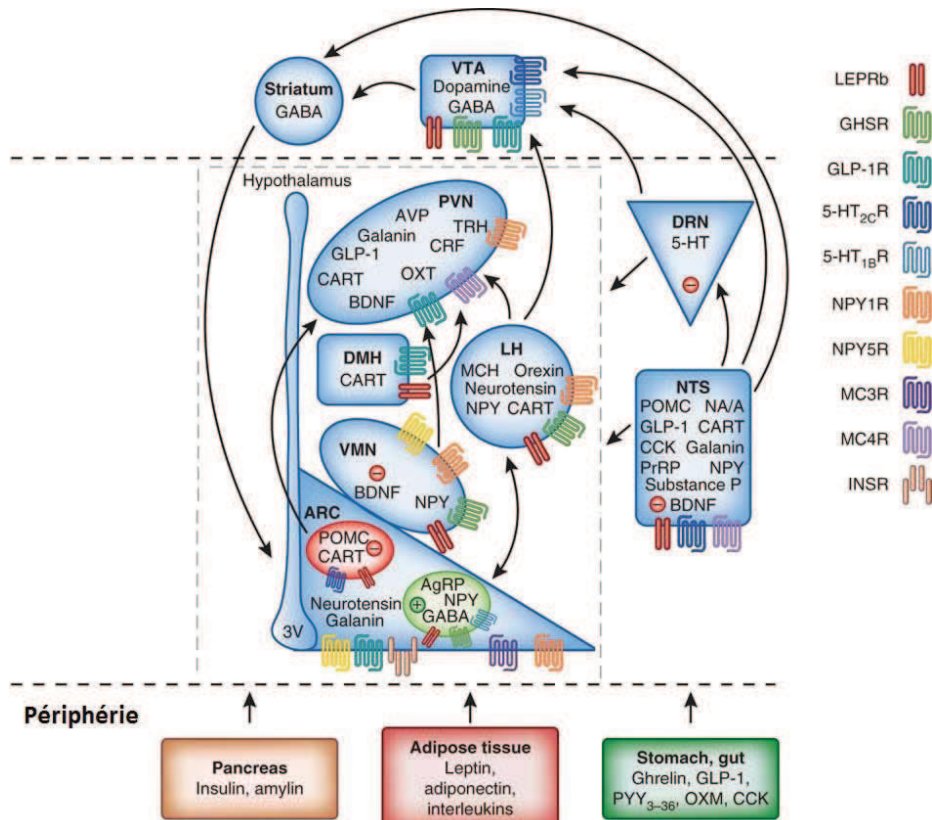


Figure 3. Représentation non exhaustive des principaux systèmes de régulation de la balance énergétique au niveau hypothalamique (modifiée de [32]). Les différentes hormones provenant de la périphérie (insuline et amyline sécrétées par le pancréas ; leptine, adiponectine et interleukines libérées par le tissu adipeux blanc ; la ghréline, le GLP-1, la CCK, le PYY et OXM sécrétées par le tractus gastro-intestinal) traversent la barrière hémato-encéphalique et activent leurs récepteurs exprimés par les différents types de neurones de différents noyaux hypothalamiques où ils modulent l'activité neuronale et la libération des différents neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique. A leur tour, les neurones hypothalamiques envoient et reçoivent des signaux vers le système limbique (VTA et striatum). Ces hormones agissent également sur le NTS soit directement, soit indirectement en modulant les afférences vagales. Acide γ aminobutyrique (GABA), Agouti Related Peptide (AgRP), cocaïne, amphétamine regulated transcript (CART), hormone concentrant la mélanine (MCH), Neuropeptide Y (NPY), oxyntomoduline (OXM), pro-opiomélanocortine (POMC) ; aire hypothalamique latérale (LH), aire tegmentale ventrale (VTA), noyau arqué (ARC), noyau dorsomédian (DMH), noyau du raphé dorsal (DRN), noyau du tractus solitaire (NTS), noyau paraventriculaire (PVN), noyau ventromédian (VMN).

Le noyau arqué et le système mélanocortine

Parmi les différents noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique, l'ARC est considéré comme étant un des acteurs majeurs [6]. Sa localisation à la base de l'hypothalamus, sous le 3^{ème} ventricule et proche de l'éminence médiane, caractérisée par une barrière hémato-encéphalique incomplète [34], facilite sa capacité à détecter les signaux périphériques. De plus, il possède la plus forte expression de récepteurs à la leptine et à l'insuline de l'hypothalamus [6], impliquant son rôle critique dans l'action de ces deux hormones dans la régulation de la balance énergétique. Parmi les populations neuronales constituant l'ARC, deux ont été intensément étudiées dans le contexte de la régulation de la balance énergétique et sont constituées d'une population produisant la pro-opiomélanocortine (POMC), dont les produits diminuent la prise alimentaire, et l'autre l'agouti-related peptide (AgRP), un puissant peptide oréxigène, qui, en agissant sur des récepteurs spécifiques appelés récepteurs à la mélanocortine (MCR), constituent le système mélanocortine hypothalamique [35, 36] (Fig. 3).

Le système mélanocortine est donc un circuit neural formé des cellules exprimant soit POMC et ses produits dérivés, c'est-à-dire les produits de clivage post-translacionnels de POMC représentés par l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et l'hormone stimulant les α - et β -mélanocytes (α -MSH et β -MSH) qui sont agonistes des MCR (l'ACTH est spécifique du MCR2 tandis que les α -MSH et β -MSH se lient aux MCR1, 3, 4 et 5); ou l'AgRP, l'antagoniste endogène des MCRs, et les cellules exprimant les MCRs et qui sont les cibles de ces 2 populations neuronales [36]. Dans l'ARC, chacune de ces 2 populations neuronales coexpriment un autre peptide : les neurones à POMC synthétisent aussi le cocaïne and amphetamine related transcript (CART), tandis que les neurones à AgRP co-expriment le

neuropeptide Y (NPY), un autre peptide avec un puissant effet oréxigène [6]. De nombreuses études ont également montré que les neurones AgRP peuvent réguler l'activité des neurones POMC. En effet, une sous-population de neurones NPY/AgRP expriment également l'acide γ -aminobutyrique (GABA) qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, et envoient des projections inhibitrices aux neurones POMC, bloquant ainsi les signaux de satiété et favorisant les signaux de faim [37]. Il existe donc, au sein des cellules produisant POMC, différentes sous-populations, caractérisées par leur différentes aptitudes à répondre à la leptine et à l'insuline [38] ou par l'expression de GABA ou de glutamate [39].

Les études chez les rongeurs et chez l'homme ont mis en évidence l'importance du système mélanocortine dans le contrôle du poids corporel. L'ablation du gène codant pour POMC entraîne une augmentation de la prise alimentaire et une obésité chez la souris [40]. De plus, une ablation de POMC par une toxine diphtérique à l'âge adulte entraîne chez la souris une hyperphagie et une prise de poids augmentée [41]. A l'inverse, une surexpression d'AgRP induit une hyperphagie associée à une obésité [42], tandis qu'une destruction ciblée des neurones AgRP chez la souris adulte conduit à un poids corporel diminué associé à une anorexie [41]. Chez l'homme, des mutations de POMC ont également été observées chez des patients avec une sévère obésité précoce [43].

Cinq sous-types de MCRs ont été identifiés dans le SNC, mais seulement 2 semblent jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la prise alimentaire, les récepteurs MC3R et MC4R [44]. MC4R est largement exprimé dans le cerveau mais est particulièrement dense dans le PVN, le VMN, le DMH et le LH [45]. Il est activé par l'ACTH et l α -MSH, et inhibé par AgRP. Il est intéressant de noter que les MC4R dans le PVN sont principalement impliqués dans les effets anoréxigènes des mélanocortines [46]. A l'inverse, une délétion globale du gène codant pour MC4R chez la souris conduit à l'hyperphagie, hyperinsulinémie, hyperleptinémie et à une obésité marquée [47], révélant ainsi son action nécessaire pour le maintien de la balance énergétique. En outre, la plus grande partie des obésités monogéniques chez l'homme sont dues à des mutations du gène codant pour MC4R [43].

NPY, qui n'appartient pas au système mélanocortine, va agir sur des récepteurs spécifiques à NPY (Y1 et Y5 principalement) pour induire son action oréxigène [34].

La délétion des neurones NPY chez les souris *ob/ob*, caractérisées par une absence constitutive de la leptine, améliore leur phénotype obèse et leur sensibilité à la leptine [48]. Mais la délétion des neurones NPY chez la souris n'entraîne pas d'hypophagie ni de baisse de poids [49]. De plus, une délétion simple du gène codant pour NPY, ou une double délétion (NPY et AgRP) ne modifie pas les prises alimentaires et de poids chez ces souris mutantes [50]. Cependant, il faut noter que la délétion des neurones AgRP au stade post-embryonnaire induit un phénotype mince et hypophagique [51]. Il est également important de souligner que le régime alimentaire, le statut nutritionnel et les différentes hormones affectent non seulement le fonctionnement des neurones POMC et AgRP [52], mais également leur plasticité structurale et synaptique, et leur morphologie [53-56].

Le développement des outils génétiques, et en particulier l'utilisation du système cre/lox (provenant originellement de bactériophages), basé sur la capacité d'une enzyme, la Cre-recombinase, à reconnaître des sites spécifiques (loxP) pour se lier et découper l'ADN, permettant ainsi de contrôler l'expression de gènes d'une manière cellule-spécifique et/ou temps-spécifique a permis de révéler et de détailler les fonctions de nombreuses molécules impliquées dans la régulation de la balance énergétique. L'expression de la Cre-recombinase peut être sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire et sera alors exprimée dans toutes les cellules de l'organisme. Mais elle peut également être sous le contrôle d'un promoteur spécifique, permettant ainsi une expression restreinte à certains types cellulaires. Croiser une lignée de souris « cre » avec une lignée de souris « flox », qui possède le gène que l'on souhaite supprimer entouré de deux sites loxP, permet de supprimer ce gène uniquement dans les cellules exprimant la Cre-recombinase, autorisant ainsi une délétion spécifique. Par conséquent, la génération et la caractérisation des souris POMC-Cre [57] et AgRP-Cre [58] en 2004 a permis aux chercheurs d'étudier plus en détail la fonction des différents composants

du système mélanocortine dans la régulation de la balance énergétique [36]. Les neurones POMC et AgRP expriment la forme longue du récepteur à la leptine (LRb) et le récepteur à l'insuline (IR) et sont inversement régulés par ces 2 hormones. Tandis que l'activation de LRb dans les neurones POMC induit une dépolarisation de ces cellules [37, 59], elle va inhiber les neurones NPY/AgRP. A l'inverse, l'insuline hyperpolarise les neurones exprimant POMC [59]. En utilisant la technologie cre/lox, il a ainsi pu être montré que des souris possédant une délétion spécifique du LRb dans les cellules exprimant POMC sont caractérisées par une augmentation de poids et de masse grasse [60], une hyperleptinémie et une expression altérée des neuropeptides dans l'hypothalamus [57]. Paradoxalement, la délétion des LRb dans les cellules exprimant AgRP donne un phénotype similaire [60]. A l'opposé une délétion spécifique des IR, aboutissant à la génération de souris POMC-IR KO ou AgRP-IR KO, ne modifie pas la prise alimentaire ni le poids corporel, mais réduit la suppression de glucose hépatique induite par l'insuline périphérique chez les souris AgRP-IR KO [61].

Afin de coordonner la régulation de la balance énergétique, les neurones AgRP et POMC envoient des projections à d'autres aires cérébrales. Par exemple, les neurones POMC produisant l' α -MSH activent des populations neuronales de 2nd ordre au sein de noyaux hypothalamiques tels que le LH, le PVN et le VMN, mais également à des sites plus éloignés comme le noyau parabrachial (PBN), l'amygdale, et le noyau du tractus solitaire (NTS) [62]. Il est à noter que ces neurones projetant vers le NTS se terminent à proximité des neurones sensibles à la distension gastrique, suggérant une coordination entre système mélanocortine et signaux de satiété provenant du tractus gastro-intestinal [63]. De plus, les projections vers le PVN et le VMN font synapse avec des neurones du système nerveux sympathique (SNS) innervant le tissu adipeux brun (BAT), suggérant une association entre les systèmes cholinergique et mélanocortine dans la dépense énergétique et la thermogénèse au sein du BAT [64].

Le cerveau est différent des autres organes dans le sens où sa source d'énergie principale est le glucose [33]. Il doit donc être capable de détecter les variations de glycémie plasmatique afin de maintenir un niveau d'énergie satisfaisant pour le bon fonctionnement du système. En accord avec ce concept, certains neurones de l'ARC sont stimulés (neurones gluco-excités) ou inhibés par le glucose (neurones gluco-inhibés). Les neurones gluco-excités de l'ARC sécrètent POMC [65, 66] tandis que les neurones gluco-inhibés sécrètent NPY [67, 68]. Enfin, des études récentes ont également montrées que les nutriments, et notamment certains acides gras et acides aminés comme la leucine, sont capables d'agir directement sur le système mélanocortine de l'ARC et de moduler le comportement alimentaire et le métabolisme [69, 70].

Le noyau ventromédian : un centre de satiété et anti hypoglycémie

La première mise en évidence du rôle du VMN dans la régulation de la prise alimentaire vient des expériences lésionnelles d'Hetherington et Ranson dans les années 1940. Ils avaient observé qu'une lésion bilatérale du VMN induit une hyperphagie conduisant rapidement ces animaux à l'obésité [71]. Des études ultérieures ont montré que l'obésité induite par les lésions du VMN n'était pas seulement due à l'hyperphagie mais résultait de nombreuses altérations métaboliques comme la réduction de l'activité du SNS en direction du tissu adipeux brun [72], anomalies dans le métabolisme des graisses et hyper insulinémie [73]. Récemment, une étude utilisant des stimulations à basse fréquence dans le VMN de cochons nains a montré que cette méthode était capable de limiter la prise de poids de ces animaux sans modifier leur prise alimentaire, confirmant le rôle du VMN dans la régulation de la dépense énergétique [74]. Bien que les lésions du VMN induisent des altérations de la réponse thermogénique du BAT (et donc de la dépense énergétique), les connections neuro-anatomiques entre le VMN et le BAT ne sont pas claires [75]. En effet, alors que l'électrostimulation du VMN induit une augmentation de la thermogénèse dans le BAT [76], et que la dénervation sympathique du BAT abolit cet effet [77], les études des connections par marquage trans-synaptique rétrograde ont montré qu'une très faible population de neurones

dans le VMN possédait des connexions indirectes avec le BAT [78] et que l'innervation du BAT provenant du VMN représenterait seulement 1.4% des afférences sympathiques innervant ce tissu [78].

Il est important de noter que le LRb et l'IR, ainsi que les MCRs, sont exprimés dans le VMN (Fig. 4) et jouent un rôle dans la régulation de la balance énergétique à ce niveau. L'utilisation de modèles de souris transgéniques conditionnelles a permis d'étudier plus en détail la fonction de ces récepteurs au sein du VMN.

L'étude des fonctions du « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF), un facteur neurotrophique fortement exprimé dans le VMN, et en particulier dans les neurones exprimant le stéroïdogénic factor 1 (SF1) [79], a permis de mettre en lumière le rôle du VMN et des neurones SF1 dans la régulation de la balance énergétique. SF1 est un récepteur nucléaire orphelin (originellement désigné NR5A1) exprimé dans les gonades, le cortex des surrénales et l'hypophyse, et, dans le cerveau, est un marqueur spécifique des neurones du VMN [80]. SF1 est essentiel au développement du VMN. En effet, des souris KO pour le gène codant pour SF1 ont une cytoarchitecture du VMN altérée et sont, de plus, hyperphagiques et obèses [81-85]. Un tiers des neurones SF1 ont le BDNF [86] et 50% des neurones exprimant le BDNF sont positifs pour SF1 [87]. Le BDNF réduit la prise alimentaire et stimule la dépense énergétique [79] et la délétion du BDNF dans le VMN par injection d'un virus adéno-associé (AAV) induit une hyperphagie et une obésité [88]. De plus, la stimulation des neurones SF1 entraîne la libération de BDNF [86] et augmente les influx GABAergiques inhibiteurs sur ces neurones [86].

Le développement ultérieur d'une lignée transgénique de souris SF1-Cre exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur du gène codant pour SF1 [89, 90] a permis de préciser le rôle crucial des neurones SF1 dans la régulation de la balance énergétique [91]. Par exemple, le LRb est fortement exprimé dans le VMN, principalement dans sa région dorsomédiale [92] (Fig. 4). La délétion spécifique de ce récepteur dans les neurones SF1 induit un phénotype sensible à l'obésité alimentaire [90], incapable d'activer normalement la dépense énergétique en réponse à un challenge avec un régime hypercalorique riche en graisses [90]. D'un autre côté, la délétion spécifique du suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), qui inhibe la voie intracellulaire du LRb et est en partie responsable de la résistance à la leptine [93], dans les neurones SF1 réduit la prise alimentaire et la dépense énergétique sans modifier le poids, améliore la sensibilité à l'action anorexigène de la leptine et l'homéostasie du glucose [94]. Tous ces éléments supportent donc l'idée que le LRb, et sa voie de signalisation, au sein du VMN et dans les neurones SF1 en particulier, sont des éléments importants dans la médiation des effets de la leptine sur la prise alimentaire, la dépense énergétique et l'homéostasie du glucose.

Comme déjà mentionné plus haut, L'IR est également exprimé au sein du VMN (Fig. 4). L'augmentation des concentrations plasmatiques d'insuline hyperpolarise les neurones SF1, un phénomène médié par la phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K) [95]. Une délétion du gène de l'IR dans les neurones SF1 protège de l'obésité alimentaire et des effets métaboliques associés, et augmentent la sensibilité à l'action anorexigène de la leptine [95] tandis que la sur-activation de la voie de la PI3K (mimant une sur-activation des IR) les rend de nouveau sensibles à l'obésité alimentaire [95].

Le VMN contient également des neurones exprimant les MC4R [96] et les MC3R [97]. Une inhibition de ces neurones induit des effets métaboliques globaux : par exemple, une surexpression d'AgRP par injection d'un vecteur viral recombinant adéno-associé (rAAV) dans le VMN de rats entraîne une augmentation de la prise alimentaire, du poids corporel, du tissu adipeux blanc ainsi que des concentrations plasmatiques de leptine et d'insuline [98]. A l'inverse, une micro-injection de MT-II, un analogue de l' α -MSH et un agoniste des MCRs, dans le VMN augmente l'absorption de $2[3H]$ déoxy-glucose dans le BAT, le cœur et les muscles [99].

Enfin, il est également important de noter dans le contexte du présent projet de recherche que les neurones SF1 du VMN expriment le récepteur CB₁ (voir aussi chapitre

suivant sur le SEC), qu'ils sont hyperpolarisés par les agonistes de CB₁ et que l'expression de CB₁ est modulée par SF1, à savoir que la délétion du gène SF1 dans le VMN induit une baisse de l'expression de l'ARNm de CB₁ dans ce noyau [100]. Les connections GABAergiques et glutamatergiques provenant des régions corticales et sous corticales faisant synapse dans le VMN expriment également CB₁, faisant de ce noyau un point important dans la médiation des effets du SEC [101]. De plus, il faut noter que chez des rats obèses déficients pour le récepteur à la leptine (rats Zucker), l'expression de l'ARNm de CB₁ est augmentée dans le VMN, ainsi que dans d'autres noyaux hypothalamiques comme le PVN, reflétant possiblement un lien entre signalisation de la leptine et SEC [102]. Enfin, le VMN est le noyau hypothalamique ayant la plus forte expression de l'ARNm de CB₁ [103]. Cependant, à notre connaissance, personne n'a encore exploré le rôle spécifique des récepteurs CB₁ dans le VMN et le lien entre CB₁ et leptine au niveau des neurones SF1. **Un des buts de ma thèse** a donc été de l'évaluer en utilisant la lignée transgénique VMN-CB₁-KO, générée dans notre laboratoire par croisement des souris CB₁ flox [104] avec des souris SF1-Cre (Laboratoires Jackson), et caractérisée par une délétion spécifique du récepteur CB₁ dans les neurones SF1 du VMN (Chapitre III).

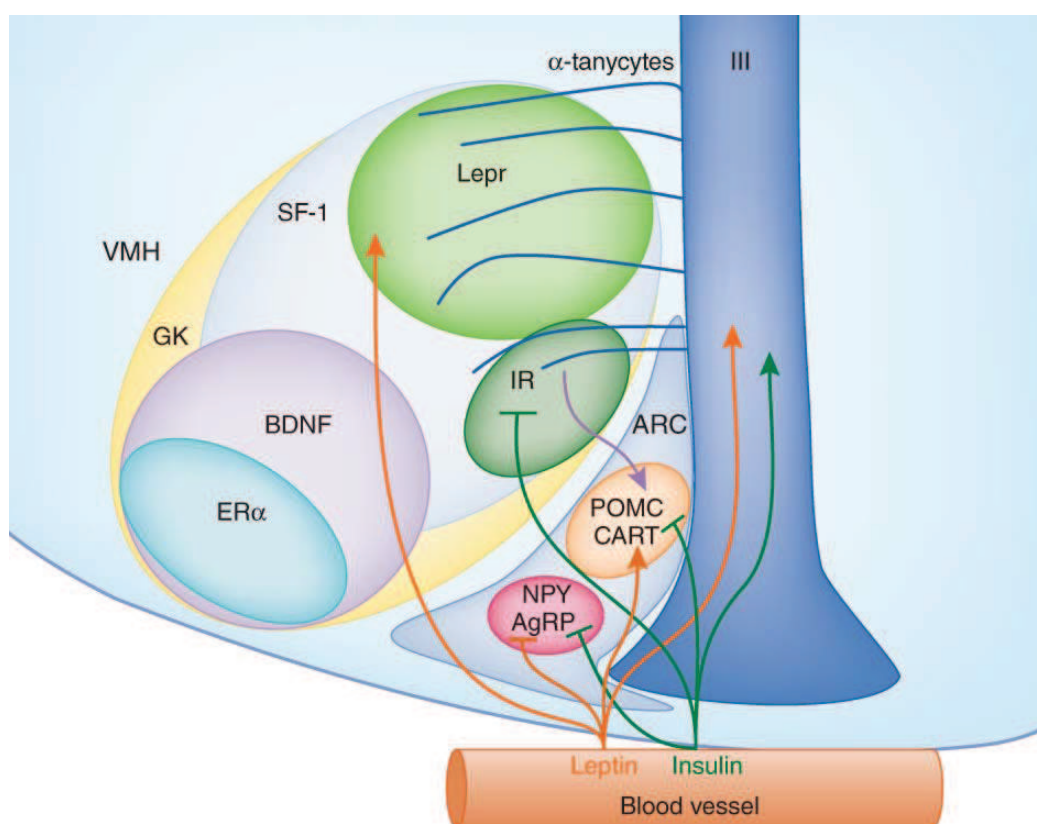


Figure 4. (extraite de [105]) Représentation non exhaustive de la localisation des principaux récepteurs et neuropeptides impliqués dans la régulation de la balance énergétique au sein du noyau ventromédian de l'hypothalamus. Les neurones exprimant le steroidogenic factor 1 (SF1) expriment également les récepteurs à la leptine (LepR) et à l'insuline (IR), et une partie le brain derived neurotrophic factor (BDNF), mais pas le récepteur aux œstrogènes ($ER\alpha$) ni la glucokinase (GK). L'activité de ces neurones est donc influencée par les variations de concentrations plasmatiques de leptine et d'insuline et influence l'activité des neurones du système mélanocortine du noyau arqué (ARC) [e.g. les neurones exprimant l'Agouti gene related transcript (AgRP) et le Neuropeptide Y (NPY), et les neurones exprimant la pro-opiomélanocortine (POMC) et le cocaine and amphetamine related transcript (CART)].

Maintenir un niveau satisfaisant de glucose est un besoin essentiel du cerveau car il ne peut lui-même le synthétiser. Il est donc important de mentionner qu'une des fonctions principales du VMN est de moduler le métabolisme du glucose, en particulier en activant les mécanismes de contre-régulation en réponse à l'hypoglycémie, notamment la sécrétion de glucagon pancréatique et la gluconéogenèse hépatique.

Au sein du VMN, il existe deux types de neurones glucosensibles : des neurones stimulés par le glucose et inhibés par l'hypoglycémie (neurones « gluco-excités »), et des

neurones inhibés par le glucose et stimulés par l'hypoglycémie (neurones « gluco-inhibés ») [106]. L'effet du glucose est soit direct en modulant directement l'activité des neurones, soit indirect en modulant l'activité pré-synaptique de ces neurones [106].

Les neurones glucosensibles utilisent, comme les cellules β du pancréas, une enzyme, la glucokinase (GK), comme l'étape limitante dans la régulation de l'activité neuronale par le glucose [107]. Une activité augmentée de la GK spécifiquement dans le VMN réduit les sécrétions d'épinephrine, norépinephrine, et de glucagon normalement censées contrer l'hypoglycémie induite par l'insuline chez le rat. D'un autre côté, une réduction de l'activité de la GK augmente la libération d'épinéphrine dans le VMN en réponse à une hypoglycémie induite par l'insuline [107]. A l'inverse, réduire les concentrations de glucose extracellulaire augmente les concentrations de norépinephrine dans le VMN, ce qui en retour va déclencher les réponses de contre régulation à l'hypoglycémie [108].

Les neurones « gluco-excités » sont de type GABAergique et utilisent des canaux potassium sensibles à l'ATP pour détecter les variations de concentrations de glucose. Lorsque ces concentrations sont élevées, ces canaux se ferment et permettent la libération de GABA dans le VMN [109]. A l'inverse, lorsque les concentrations de glucose baissent, les K_{ATP} s'ouvrent et inhibent la libération de GABA [109]. Mais la majorité des neurones SF1 étant glutamatergiques, et ces neurones constituant la majorité des neurones du VMN, il est logique de supposer qu'ils soient impliqués dans la régulation de la glycémie. Contrairement aux neurones GABAergiques, les neurones glutamatergiques utilisent les canaux chlorure pour détecter les variations des concentrations de glucose extracellulaires. Supprimer le transporteur vésiculaire du glutamate 2 (Vglut2) de ces neurones rend les souris hypoglycémiques et incapables de réguler correctement les réponses à l'hypoglycémie à cause d'un défaut de production de glucagon par le pancréas et de l'activation de la néoglucogénèse du foie [110].

Le noyau paraventriculaire : le lien avec la périphérie

Le PVN, de par sa position et ses connexions, est également fortement impliqué dans la régulation de la balance énergétique. Dans les années 80, il a provisoirement remplacé le VMN dans le rôle du « centre de la satiété » [16] car des études lésionnelles ont démontré qu'une destruction bilatérale du PVN entraînait une hyperphagie et une obésité [111].

De par ses afférences provenant de l'ARC, du VMN, du LH mais surtout du noyau du tractus solitaire (NTS) qui reçoit les informations périphériques grâce au nerf vague [112], le PVN est informé du statut énergétique de l'organisme. Et grâce à ses 2 populations neuronales, les neurones magnocellulaires et parvocellulaires sécrétant de nombreuses hormones [ocytocine (OXT), vasopressine (AVP), corticotrophin-releasing hormone (CRH), thyrotrophin-releasing hormone (TRH)] et faisant contact avec l'hypophyse et le système porte hypophysaire, il module l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et l'axe thyroïdote. De plus, ses projections vers le tronc cérébral et la moelle épinière lui permettent un contrôle fin des réponses périphériques.

Comme déjà mentionné plus haut, le PVN est un des noyaux cibles de l'action des mélanocortines. Les MC3R et MC4R sont exprimés dans les neurones du PVN qui sont la cible des neurones de 1^{er} ordre des neurones POMC et AgRP provenant de l'ARC [113]. Plus précisément, il a été montré un rôle du système mélanocortine du PVN dans la réponse de prise alimentaire induite par le jeûne [114]. En effet, les souris qui sont soumises à un jeûne ont une réponse hyperphagique lorsqu'ils ont de nouveau accès à la nourriture, et cette réponse alimentaire est en partie contrôlée par l'action des neurones POMC de l'ARC faisant synapse dans le PVN [114, 115]. Dans une étude sur les connexions entre ARC, PVN et NTS, Singru et collaborateurs ont mis en évidence une sous-population de neurones dans la partie parvocellulaire antérieure du PVN qui projette sur le NTS et qui est principalement glutamatergique [116]. Ces données suggèrent que les neurones activés par l' α -MSH dans le PVN pourraient contribuer à la satiété induite par l'absorption de nourriture médiée par le nerf

vague à travers des effets sur le NTS, notamment en modulant la sensibilité des neurones du NTS aux signaux de satiété provenant du nerf vague via une excitation glutamatergique [116].

NPY, par le biais de ses récepteurs Y1 et Y5, joue également un rôle dans la régulation de la prise alimentaire par le PVN [117]. Wang et collaborateurs ont montré par exemple qu'après une lésion bilatérale du PVN, une infusion intracérébroventriculaire (icv) de NPY n'a plus d'effet oréxigène [118], révélant le rôle crucial du PVN dans la médiation des effets oréxigènes de NPY. De plus, une délétion des gènes codant pour les récepteurs Y1 et Y5 restreinte au PVN à l'âge adulte conduit à un phénotype hypophagique chez la souris lorsque ces animaux sont soumis à un régime riche en graisses, mais ils prennent plus de poids et de masse grasse dû à une dépense énergétique diminuée [117].

Enfin, les neurones du PVN expriment également l'ARNm de CB₁ [103] dont le rôle dans la régulation de la réponse au stress, et sa régulation par les glucocorticoïdes a été démontrée [119-121]. Chez les souris CB₁-KO, caractérisées par une délétion du gène de CB₁, on observe une hyperréactivité de l'axe HPA, suggérant que l'activation de CB₁ exerce un contrôle négatif sur l'axe HPA [119]. Il a par exemple été montré que les endocannabinoïdes participent au rétrocontrôle négatif de l'axe HPA par les glucocorticoïdes, qui sont sécrétés par les surrénales après activation de l'axe HPA dans le PVN [122, 123]. Cependant le rôle de CB₁ dans le PVN dans la régulation de la balance énergétique n'est pas clair. En effet, les expériences de jeûne/prise alimentaire chez le rongeur n'ont pas permis de révéler une modification de l'expression de l'ARNm de CB₁ dans le PVN (ou dans le VMN), et ce, même en l'absence de LRB [102]. De plus, l'administration aiguë de rimonabant, un antagoniste de CB₁, ne modifie pas l'expression de c-fos dans les neurones du PVN [124]. Cependant, l'administration de WIN55,212-2, un agoniste de CB₁, augmente l'immunoréactivité de c-fos dans le PVN [124]. De plus, la libération d'endocannabinoïdes déclenchée par les glucocorticoïdes dans le PVN peut être inhibée par la leptine [122]. Enfin, une étude récente a montré que chez le rat, une injection intra-PVN d'AEA augmente la prise alimentaire et le quotient respiratoire de ces animaux [125].

Parmi les différents gènes impliqués dans le développement du PVN, un s'est révélé essentiel pour l'étude du rôle de ce noyau hypothalamique en physiologie: le gène *single-minded* (*Sim1*). Chez la drosophile, le gène *Sim1* est impliqué dans le développement de lignées cellulaires du SNC [126, 127]. Son identification chez la souris a permis de mieux comprendre la prolifération et la différenciation de certaines lignées neuronales [126-129], notamment les lignées neuroendocrines du PVN. Ce gène est également exprimé dans le SON, l'aPV et le corps mamillaire durant le développement. Après la naissance, il continue à être exprimé dans le PVN, le LH et une partie de l'amygdale. Les souris homozygotes pour un allèle *null* du gène *Sim1* meurent dans les 24 heures après la naissance [128] et possèdent un PVN et un SON hypocellulaires, avec une absence de différenciation des neurones magnocellulaires à AVP et OXT, et des neurones parvocellulaires à TRH, CRH (ainsi que les neurones à somatostatine de l'aPV) [128]. De manière intéressante, des souris hétérozygotes pour ce même allèle sont viables mais ont un développement linéaire accru, sont hyperphagiques et deviennent rapidement obèses [130]. Cela entraîne également une expression de POMC augmentée dans l'hypothalamus, ainsi qu'une résistance aux effets anorexigènes de l'agoniste du MC4R, le mélanotane II (MTII) par une absence d'activation des neurones dans le PVN [131]. Ce phénotype hyperphagique est en partie médié par une baisse de l'expression de la neuro-hormone anorexigène OXT dans le PVN [132, 133], et par une diminution de 70% des connexions du PVN vers le complexe vagal dorsal [134]. La diminution de l'expression de *Sim1* spécifiquement dans le PVN augmente la prise alimentaire [135]. A l'inverse, une surexpression de *Sim1* restreinte au PVN diminue la prise alimentaire [135], ce qui protège partiellement de l'obésité induite par le régime alimentaire [136]. La création d'une lignée de souris *Sim1-cre* (exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Sim1*) a ensuite permis de préciser le rôle de ces neurones dans la régulation de la balance énergétique [46]. Par exemple, une réexpression de MC4R dans les neurones *Sim1*, de souris *MC4R-KO* (qui sont obèses), réduit leur taille et poids (par une

baisse de masse grasse et de masse maigre) ainsi que leur prise alimentaire, mais ne normalise pas leur dépense énergétique [46]. Cela a donc permis de montrer que les MC4R du PVN sont principalement impliqués dans la régulation de la prise alimentaire plutôt que dans la régulation de la dépense énergétique [46].

Cependant, de la même manière que pour le VMN, il n'existe pas d'étude portant sur le rôle de CB₁ au sein de ces neurones Sim1 dans la régulation de la balance énergétique. Nous avons donc, dans le contexte de ces travaux de thèse, évalué cette contribution en croisant la lignée Sim-Cre (Laboratoires Jackson) avec la lignée CB₁-flox (CB₁^{f/f}) [104] afin de supprimer CB₁ des neurones Sim1, et d'étudier le phénotype des souris PVN-CB₁-KO ainsi générées (Cf. chapitre III).

Le noyau dorsomédian (DMH)

Comme pour le VMN et le PVN, les études lésionnelles et d'électrostimulation ont permis de mettre en évidence un rôle du DMH dans la régulation de la prise alimentaire, de boisson et de la croissance corporelle [137]. En effet, les rats ayant subi une lésion du DMH sont hypophagiques, hypodipsiques et présentent un retard de croissance corporelle [137]. Le retard de croissance n'est pas attribué à des problèmes de croissance, mais il a été supposé que détruire le DMH modifiait le « set point » du poids des animaux en l'abaissant [137]. De plus, la lésion du DMH retarde la prise de poids lorsque les rats lésés sont soumis à un régime riche en graisses.

Le DMH fait partie des noyaux hypothalamiques cibles du système mélanocortine. Il exprime les MC3R et MC4R et reçoit des projections des neurones POMC/CART et NPY/AgRP provenant de l'ARC [138]. Le DMH est également un des sites d'action de la leptine et il a été révélé que chez des souris obèses résistantes à l'action anorexigène de la leptine, une administration de l'hormone stimule la thermogénèse au niveau du BAT, et cet effet est en partie médié par les neurones du système mélanocortine du DMH [139]. De plus, au sein du DMH, il existe différents types neuronaux libérant divers neuropeptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire comme l'orexine-A [140] et la cholécystokinine (CCK) [141]. Il a été par exemple proposé que les neurones du DMH exprimant les récepteurs Y1 et Y5 sont les cibles des neurones NPY provenant de l'ARC et sont impliqués dans les effets oréxigènes de ce neuropeptide [142], puis qu'une injection icv de NPY induit l'expression de c-Fos dans le DMH [143]. De plus, lorsque des souris sont soumises à un régime riche en graisses, on observe une augmentation de l'expression de l'ARNm de NPY dans le DMH et dans le VMN [144]. Enfin, une délétion de NPY restreinte au DMH favorise le développement du BAT et protège de l'obésité alimentaire [145]. De plus, l'exposition à un régime riche en graisse augmente l'immunoréactivité de c-Fos dans le DMH chez les animaux sensibles à l'obésité alimentaire, tandis que les animaux résistants à l'obésité n'ont pas cette augmentation [146]. Enfin, les données dans la littérature impliquent le DMH dans la régulation de la glycémie, grâce à la présence de neurones gluco-sensibles. Ce noyau participe donc à la coordination des réponses appropriées pour le maintien de l'homéostasie du glucose en périphérie, notamment par l'intermédiaire des neurones CCK [141].

L'aire hypothalamique latérale (LH)

A la différence des noyaux hypothalamiques bien définis comme l'ARC, le PVN ou le VMN, le LH possède une organisation beaucoup plus étalée. Historiquement, le LH était considéré comme un centre de stimulation de la prise alimentaire [147] car les études lésionnelles ont révélé un phénotype hypophagique chez les animaux lésés. A l'opposé, la stimulation électrique du LH induit une prise alimentaire, même chez des animaux rassasiés [147].

Les connexions du LH avec d'autres régions cérébrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire (comme la plupart des noyaux hypothalamiques) ainsi que des régions extra-cérébrales servant au maintien de la balance énergétique en font un acteur de choix de la régulation de cette balance. Son lien avec le système limbique, et en particulier avec les

circuits dopaminergiques, fait également du LH un régulateur des comportements motivés [148], dont un est la prise alimentaire.

Le LH possède deux populations neuronales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et largement étudiées ces dernières années : les neurones sécrétant l'hormone de concentration de la mélanine (MCH) et ceux sécrétant les oréxines A et B (ou hypocrétines). Les neurones MCH stimulent la prise alimentaire. En effet, une injection chronique de MCH [149] ou une surexpression de MCH chez la souris [150] conduit à l'obésité alors qu'antagoniser les récepteurs à MCH [151] ou supprimer la MCH [152] ou les neurones MCH [153] donne un phénotype mince. De plus, les neurones MCH du LH font partie des populations neuronales qui projettent sur le tronc cérébral et régulent la thermogénèse du BAT [154]. Enfin, une partie de ces neurones co-exprime CART [155], un autre modulateur de la prise alimentaire et de la dépense énergétique.

Bien que le rôle oréxigène de la MCH soit bien établi, le rôle des oréxines est plus complexe. Elles semblent plus impliquées dans les fonctions d'éveil. Cependant, la stimulation du système oréxine augmente l'appétit [156], la température corporelle [157] et l'activité du SNS innervant le BAT [158], supposant qu'elles jouent un rôle dans la régulation de la balance énergétique. De plus, le jeûne et la ghréline, une hormone oréxigène produite par l'estomac [29], stimulent les neurones à oréxine, alors que le glucose et la leptine les inhibent. En effet, les neurones du LH expriment le LRb et leur activité, régulée par la leptine, module la prise alimentaire [147].

Le LH est également composé de neurones gluco-sensibles et participe au maintien de la glycémie [159]. Plus spécifiquement, une sous-population de neurones exprimant NPY a été identifiée comme neurones gluco-sensibles [159].

Le noyau suprachiasmatique (SCN)

Le SCN est considéré comme étant le régulateur principal des rythmes circadiens chez les mammifères grâce à sa fonction « d'horloge interne » [160]. Les principales caractéristiques nécessaires à l'organisation d'un système circadien sont la capacité à percevoir les informations environnementales, l'intégration des informations relatives au temps dans un centre servant d'horloge circadienne, la transmission des informations de temps ajustées aux différents processus physiologiques et métaboliques, et enfin la capacité de pouvoir recevoir en retour des informations provenant des différents tissus [161]. Le système circadien doit constamment s'adapter à l'environnement et les signaux internes du corps, et se synchroniser avec eux.

Les rythmes circadiens sont principalement basés sur la détection des variations de la photopériode qui permet à l'organisme d'orchestrer et de synchroniser les rythmes de fonctionnement des différents tissus, et ainsi les comportements [160]. Grâce à ses connections avec la rétine, le SCN peut détecter de tels changements, et induire l'expression de « gènes horloges » (clock genes) qui vont rythmer l'expression et la libération de différents neuropeptides tels que le polypeptide vasoactif intestinal (VIP), l'AVP, le GABA et le peptide libérant la ghréline (GRP) qui sont aussi impliqués dans la régulation de la balance énergétique.

De plus, afin d'établir la communication entre le SCN et le métabolisme, différents voies de signalisation intracellulaires, telles que la voie de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR), sont mises en jeu au sein du SCN pour détecter les variations d'hormones et de nutriments [160].

Donc, le SCN participe à la régulation de la balance énergétique afin de garantir l'adaptation des différentes fonctions physiologiques au rythme circadien. Il faut noter que le SCN envoie des projections vers l'ARC, le PVN et le DMH et qu'il va donc, dans une certaine mesure, pouvoir influencer les signaux émis par les neurones de ces noyaux en fonction des conditions environnementales et de l'état métabolique de l'organisme. Il est particulièrement intéressant de noter que des études chez l'homme suggèrent que des perturbations des rythmes circadiens (tels que le travail de nuit ou la privation de sommeil)

sont des facteurs aggravant du syndrome métabolique et peuvent favoriser le développement de l'obésité et des problèmes métaboliques associés, tels que le diabète de type 2 [160].

Le système endocannabinoïde et la balance énergétique

Brève histoire du système endocannabinoïde

Cannabis sativa est une des plus anciennes plantes cultivées par l'homme. Des écrits rapportent sa culture en Chine 28 siècles avant J.C. [162], lorsque l'empereur Shen-nung enseigna à son peuple à cultiver le chanvre pour ses fibres. Plus de 1000 ans avant J.C., son usage comme remède médicinal est décrit en Inde.

La plante est arrivée en Europe au 19^{ème} siècle grâce à un médecin Anglais, W.B. O'Shaughnessy, qui la rapporta d'Inde en 1839. Après avoir testé sa toxicité sur l'animal, il l'administra à ses patients pour traiter différentes pathologies telles que les rhumatismes, la rage ou bien encore le tétanos. Son usage s'est ensuite largement répandu dans la pharmacopée des pays occidentaux au cours de la deuxième moitié du 19^{ème} siècle [162], et s'est maintenue jusqu'au début du 20^{ème} siècle où elle a ensuite été peu à peu remplacée par d'autres molécules, notamment les opiacés, plus efficaces et plus faciles à utiliser car plus hydrophiles [162].

En parallèle avec l'arrivée du cannabis dans les pays occidentaux, les chercheurs ont tenté d'isoler et d'identifier la (les) molécule(s) responsable(s) des effets psychoactifs de la *marijuana*. Ce n'est qu'en 1963 que Robert Mechoulam et collaborateurs, isolent et élucident la structure du 1^{er} (phyto)cannabinoïde, le cannabidiol [163]. Un an plus tard, ils isolent et purifient le (-)- Δ^9 -Tétrahydrocannabinol (THC), connu à ce jour comme le principal composé psychoactif de la marijuana [164]. Cela a donné lieu à une explosion des recherches sur les cannabinoïdes mais, sans cible pour expliquer leur mode d'action, elles se sont peu à peu essouffées. Cependant, A.C. Howlett, une des pionnières des effets intracellulaires des cannabinoïdes, fut la 1^{ère} à mettre en évidence une diminution de l'accumulation d'AMP cyclique (AMPC) stimulée par les prostanoïdes dans des préparations de membranes de neuroblastomes, et donc une inhibition de l'adénylate cyclase [165], avec du THC. C'était la première évidence que les cannabinoïdes pouvaient agir par le biais d'un récepteur. Howlett et ses collaborateurs ont ensuite montré que cet effet nécessitait une protéine Gi fonctionnelle, argumentant encore en faveur d'un récepteur médiant les effets des cannabinoïdes [166]. En 1988, son groupe est le 1^{er} à isoler et caractériser un récepteur aux cannabinoïdes dans le cerveau de rat [167]. Le gène codant pour ce récepteur fut ensuite identifié et cloné en 1990 par Matsuda et collaborateurs [168] et nommé récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB₁). Un second récepteur fut identifié dans la lignée cellulaire HL-60 en 1993 et appelé récepteur aux cannabinoïdes de type 2 (CB₂) [169]. Alors que l'on pensait au départ que CB₁ était principalement exprimé dans le cerveau et que l'expression de CB₂ était limitée à la périphérie et aux cellules immunitaires [170], leur distribution s'est révélée plus complexe. En effet, CB₁ est présent dans de nombreux tissus périphériques tels que le WAT, le foie les muscles, l'intestin, le pancréas [171] ; et CB₂ est exprimé dans le SNC [172].

La présence de récepteurs répondant aux cannabinoïdes exogènes suggérait qu'il existait des ligands endogènes fonctionnels. En 1992, le groupe de Mechoulam identifia le premier cannabinoïde endogène (ou endocannabinoïde), le N-ethanolamide de l'acide arachidonique, l'anandamide (AEA), comme ligand des récepteurs aux cannabinoïdes [173]. Deux ans plus tard, ils ont découvert un second endocannabinoïde, le 2-arachidoynolglycérol (ou 2-AG) [174]. D'autres endocannabinoïdes ont ensuite été identifiés, mais les 2 les plus étudiés restent l'AEA et le 2-AG. Ils proviennent de la transformation de phospholipides membranaires par des enzymes spécifiques. En particulier, le N-acylphosphatidyl-éthanolamine-spécifique phospholipase D (NAPE-PLD) permet la synthèse d'AEA à partir du N-acylphosphatidyl-éthanolamine, et la diacylglycérol lipase (DAGL) permet de synthétiser le 2-AG à partir du diacylglycérol [18, 175]. Les recherches sur le SEC ont ensuite identifié les voies de dégradation spécifiques des endocannabinoïdes telles que la « fatty acid amid hydrolase » (FAAH) et la monoacylglycérol lipase (MAGL) qui dégradent l'AEA et le 2-AG, respectivement [170]. Le récepteur CB₁ est un des récepteurs couplé à une protéine G les plus abondants du SNC. Il est également exprimé dans les astrocytes ainsi que dans les nerfs

périphériques, incluant ceux innervant le tractus gastro-intestinal. L'expression de CB₁ co-localise d'ailleurs très bien avec l'expression de l'AEA et du 2-AG dans le SNC. La distribution de l'ARNm et de la protéine CB₁ diffèrent car, alors que le 1^{er} est principalement localisé au niveau des corps cellulaires neuronaux, la seconde est majoritairement localisée au niveau pré synaptique, c'est-à-dire sur les terminaisons des axones où elle va inhiber (voir aussi Figure 5) la libération des principaux neurotransmetteurs tels que le GABA et le glutamate, ou bien encore la dopamine, la noradrénaline, ou la sérotonine (5-HT) [176]. A la différence des neurotransmetteurs classiques qui sont stockés dans des vésicules, les endocannabinoïdes sont synthétisés à partir des lipides membranaires puis libérés « à la demande » [18]. Plus particulièrement au niveau du SNC, ils agissent de façon rétrograde dans la fente synaptique sur les CB₁ localisés au niveau pré-synaptique suite à une dépolarisation membranaire et une augmentation intracellulaire de calcium dans le bouton post-synaptique (Fig. 5). L'effet général de l'activation de CB₁ est une hyperpolarisation du bouton pré-synaptique réduit la libération de neurotransmetteur dans la synapse. Ce type d'action est à la base de la fonction neuromodulatrice du SEC au niveau du SNC. L'activation des récepteurs CB₁ au niveau pré-synaptique active une protéine Gi/o (inhibitrice) [18]. Cette activation induit la fermeture des canaux calcium (de types N, P/Q et L), [18] et inhibe l'adénylate cyclase, conduisant à une baisse de l'AMP cyclique (AMPc) et des protéines kinases dépendantes de l'AMPc, ayant pour résultat une baisse de la phosphorylation des canaux K⁺ [170]. Cela va également induire une régulation de certains canaux ioniques, une activation de kinases focales d'adhésion, et la stimulation de la voie des mitogen activated protein kinase (MAPK), et plus spécifiquement les cascades d'ERK, p38 MAPK [170]. Après s'être lié à CB₁, les endocannabinoïdes vont ensuite être catabolisés par leurs enzymes de dégradation respectifs [170, 176]. Un transporteur pour la recapture des endocannabinoïdes a été proposé [175] et de nombreux composés synthétiques sont considérés comme des inhibiteurs de la recapture. Cependant, le transporteur n'a pas encore été identifié à l'heure actuelle. Très récemment, Chicca et collègues ont mis en évidence un transport bidirectionnel des endocannabinoïdes au niveau membranaire [177].

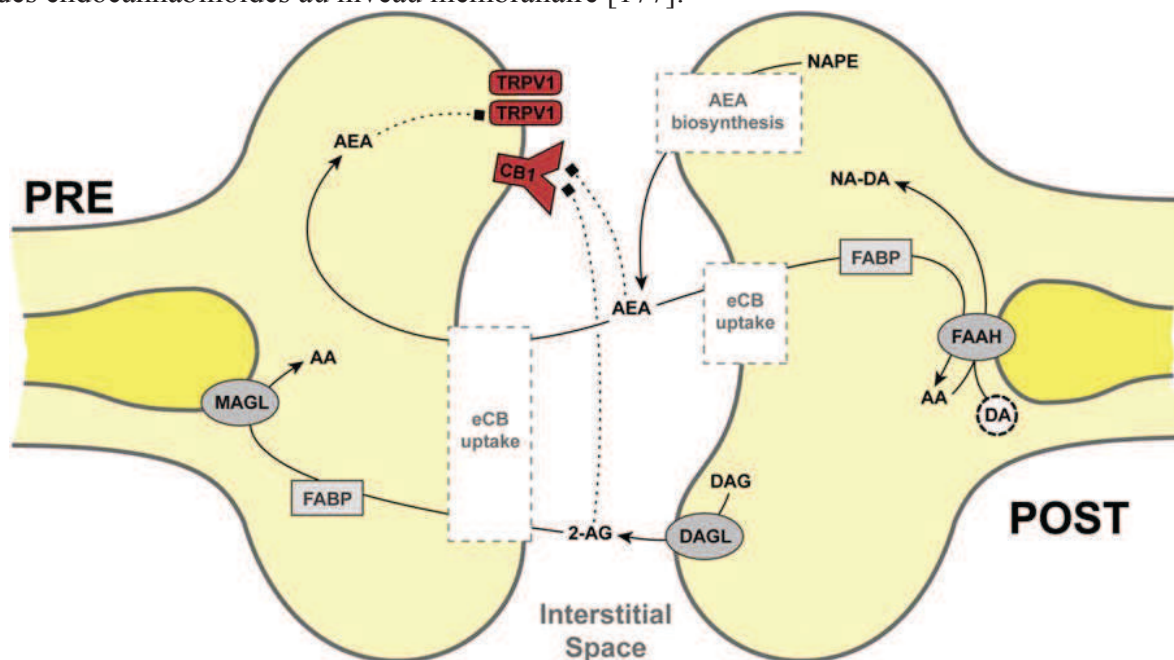


Figure 5. (extraite de [178]) Représentation schématique du fonctionnement du système endocannabinoïde au niveau synaptique. Les deux principaux endocannabinoïdes, l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonylglycérol (2-AG) sont synthétisés à la demande au niveau post-synaptique. L'AEA est synthétisé à partir de la N-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine (NAPE) par catalyse grâce à une phospholipase D spécifique (NAPE-PLD). D'autres voies de synthèse alternatives ont également été mises en évidence dans la littérature. Le 2-AG provient quant à lui de l'hydrolyse du 1,2-diacylglycerol (DAG) via les DAG lipases DAGL α and DAGL β . Une fois libérés dans la fente synaptique, l'AEA et le 2-AG se fixent au niveau présynaptique sur le récepteur CB₁ et d'autres récepteurs tels que CB₂ et le transient receptor potent vanilloid 1 (TRPV1). La fin de la signalisation des endocannabinoïdes s'effectue grâce à une recapture intracellulaire à l'aide d'un transporteur non encore identifié (eCB uptake). Une fois à l'intérieur de la cellule, les endocannabinoïdes sont transportés grâce à des protéines chaperones telles que les fatty acid binding proteins (FABP) vers leurs enzymes spécifiques de dégradation. La dégradation du 2-AG est principalement attribuée aux monoacylglycerol lipase (MAGL) pré-synaptiques qui clivent le 2-AG en acide arachidonique (AA) et glycérol. La dégradation de l'AEA s'effectue dans le bouton post-synaptique grâce à la fatty acid amide hydrolase (FAAH) qui dégrade l'AEA en AA et éthanolamine.

Le SEC et la balance énergétique

La découverte de CB₁ a entraîné une augmentation croissante des publications sur le rôle du SEC en physiologie, des effets allant de la modulation de la prise alimentaire au contrôle de la douleur, en passant par la mémoire, la reproduction et la réponse au stress, pour n'en citer que quelques-uns [170].

Les effets du THC, et plus généralement du cannabis, sur la prise alimentaire sont connus depuis des centaines d'années. De plus, la découverte du 1^{er} antagoniste de CB₁ en 1994 par Rinaldi-Carmona et collaborateurs, le SR141716A, également connu sous le nom de Rimonabant [179] a grandement aidé à l'élucidation du rôle du SEC dans ce contexte. En 1998, Colombo et collaborateurs ont été les premiers à décrire une réduction de la prise alimentaire de rats non obèses dans les 5 premiers jours d'administration et une perte de poids corporel qui dure toute la durée du traitement au rimonabant [180]. La même année, Croci et collaborateurs démontrent *in vitro* que le WIN-55212-2 (WIN), un agoniste de CB₁, est capable d'inhiber la contraction de préparations de cellules musculaires longitudinales d'iléon humain, et que cet effet est bloqué par le rimonabant [181]. L'activation de CB₁ au niveau des neurones cholinergiques de l'iléon permettrait l'inhibition de la libération d'acétylcholine. Cette découverte est renforcée un an plus tard par Izzo et collaborateurs [182] qui montrent qu'une administration systémique de rimonabant augmente la défécation et le transit gastro-intestinal chez la souris tandis que le WIN la réduit. La même année, la 1^{ère} évidence d'un rôle oréxigène d'un endocannabinoïde est démontrée. Williams et Kirkham injectent de l'AEA en sous cutané à des rats et observent une augmentation de la prise alimentaire [183]. Une fois encore, cet effet est CB₁-dépendant car bloqué par l'administration de rimonabant. La même année, en 2001, Di Marzo et collaborateurs démontrent que la leptine régule les niveaux des endocannabinoïdes spécifiquement dans l'hypothalamus [184]. En particulier, ils observent que l'absence de leptine chez les souris *ob/ob* est associée à une augmentation des endocannabinoïdes hypothalamiques et qu'un traitement à la leptine diminue les concentrations hypothalamiques d'AEA et de 2-AG [184]. Cette observation a ensuite été confirmée par électrophysiologie dans le LH où l'inhibition induite par les endocannabinoïdes est bloquée par la leptine [185], et dans le PVN où la leptine bloque la libération d'endocannabinoïdes stimulée par les glucocorticoïdes [122, 123]. En 2003, la caractérisation de souris KO pour le gène du récepteur CB₁ a confirmé le rôle crucial de ce récepteur dans la régulation de la balance énergétique car les souris CB₁-KO sont hypophagiques et plus minces que leurs congénères sauvages [186]. En accord avec ces observations, l'administration chronique de rimonabant conduit au même résultat. En particulier, dans l'étude réalisée par Ravinet Trillou et collègues [187], il a été montré que le rimonabant causait une baisse de 20% du poids corporel après 5 semaines de traitement, et une réduction de l'adiposité d'environ 50%. De plus, de nombreux paramètres métaboliques étaient améliorés, comme les concentrations plasmatiques d'insuline et d'acides gras. De la même façon, une seconde étude par Hildebrand et collaborateurs publiée la même année a montré un effet positif du traitement avec l'AM251, un autre antagoniste de CB₁, sur le poids et l'adiposité de souris soumises à un régime riche en graisses [188].

De la découverte de CB₁ (dans des cellules neuronales) jusqu'en 2003, il était supposé que les effets des cannabinoïdes médiés par CB₁ étaient uniquement neuronaux. Mais Cota et collaborateurs [186], et en parallèle Bensaid et collaborateurs [189], ont été les 1^{ers} à identifier la présence de CB₁ au niveau des adipocytes blancs, et à démontrer que l'activation de CB₁ au niveau de ces cellules stimulait la lipogenèse, la différenciation et la maturation adipocytaires. Ravinet-Trillou et collaborateurs avaient également émis l'hypothèse d'un effet métabolique périphérique car des animaux soumis à un jeûne de 24 heures perdaient plus de poids lorsqu'ils étaient traités avec le rimonabant, suggérant une augmentation de la dépense énergétique [187]. Les recherches ultérieures ont montré que CB₁ (et le SEC) étaient présents dans tous les tissus intervenant dans la régulation de la balance énergétique : il est évidemment présent au niveau du cerveau, mais également dans de nombreux organes

périphériques. Il est par exemple exprimé au niveau des cellules réceptrices du goût sur la langue et augmente spécifiquement le goût sucré [190]. La modulation du goût serait également un niveau où leptine et endocannabinoïdes interagissent [191]. Le SEC est présent au niveau des glandes salivaires [192] et les endocannabinoïdes sont libérés dans la salive [192]. Au niveau de l'estomac, ils augmentent les concentrations de ghréline [193] et semblent jouer un rôle dans la modulation de la flore intestinale [194], tandis qu'au niveau de l'intestin, leur production est stimulée par l'ingestion de lipides [195]. De plus, un jeûne de 24 h augmente les concentrations d'AEA dans l'intestin grêle [196]. Au niveau hépatique, l'activation de CB₁ participe à la résistance à l'insuline observée lors d'une obésité alimentaire [197], favorise la synthèse hépatique des lipides [198] et la gluconéogenèse [199]. Au niveau du pancréas, le rôle du SEC, et de CB₁ en particulier, restent encore à être élucidés car jusqu'à présent, des résultats opposés sur la sécrétion d'insuline et de glucagon ont été observés. Dans les muscles squelettiques, la signalisation de CB₁ est impliquée dans l'absorption du glucose et dans la résistance à l'insuline souvent observée dans l'obésité [200]. Enfin, au niveau du tissu adipeux, l'activation de CB₁ stimule la lipogenèse et le stockage des lipides [201]. Antagoniser CB₁ au niveau des adipocytes blancs induit un phénotype d'adipocyte brun *in vitro* [202], tandis que le blocage pharmacologique de CB₁ au niveau périphérique réduit l'obésité et améliore la sensibilité à la leptine [203].

Cette large implication du SEC dans pratiquement tous les aspects régulant la balance énergétique lui donne une place de choix pour pouvoir contrôler, à tous les niveaux, la prise alimentaire, l'absorption des nutriments, la dépense énergétique, le stockage des graisses et l'homéostasie du glucose [24]. Il est également important de noter que l'obésité chez le rongeur et chez l'homme est associée à des concentrations élevées d'endocannabinoïdes plasmatiques et à une hyperactivité du SEC [19, 20].

Le développement d'antagonistes de CB₁ pour le traitement de l'obésité et des pathologies métaboliques associées a initialement attiré beaucoup d'attention car leurs effets sur la perte de poids et les bénéfices métaboliques associés (meilleur profil lipidique sanguin, sensibilité à l'insuline augmentée) étaient évidents, mais ils ont aussi généré des déceptions à cause des effets secondaires psychiatriques qu'ils pouvaient engendrer [204]. Même si les recherches vont plutôt actuellement dans la direction de la découverte et la caractérisation d'un antagoniste périphérique de CB₁ [20], il ne faut pas oublier que le SEC du SNC joue un rôle important dans la régulation de la balance énergétique. En effet, une délétion de CB₁ restreinte aux cellules nerveuses donne également un phénotype plus mince, une réduction de la prise alimentaire et une résistance à l'obésité [205]. Une délétion de CB₁ restreinte aux neurones glutamatergiques principaux et à une partie des neurones du SNS induit également une résistance à l'obésité, grâce à une sur-activation du SNS et une dépense énergétique augmentée [21].

Système endocannabinoïde et hypothalamus

L'hypothalamus étant une des principales régions cérébrales impliquée dans la régulation de la balance énergétique, il est logique de supposer que le SEC, qui est également un acteur majeur de la régulation de cette balance, puisse jouer un rôle au niveau hypothalamique.

Bien que l'expression de l'ARNm de CB₁ soit faible, l'activation des CB₁ hypothalamiques est très efficace. L'ARNm de CB₁ possède sa plus forte expression dans les neurones du VMN, mais est également présent dans les neurones du PVN, du LH, et de la MPOA, et est absent de l'ARC [103, 186, 206]. Alors que la protéine de CB₁ a été identifiée dans les projections hypothalamiques atteignant le VMN, PVN, LH, AHA et l'ARC [207], qui sont toutes connues comme étant des régions clés dans la régulation de la balance énergétique [91, 98, 208, 209]. Elle est également présente dans des projections neuronales dirigées vers des régions extra-hypothalamiques, telles que le tronc cérébral ou le complexe vagal dorsal, impliquées dans la régulation de la balance énergétique [210, 211].

De plus, la relation entre leptine et SEC, comme mentionnée précédemment, a été intensément étudiée ces dernières années et il a été montré que la leptine inhibe la production d'endocannabinoïdes hypothalamiques et leur fonction neuromodulatrice dans les différents noyaux hypothalamiques [122, 184, 185], tandis que les animaux mutants qui n'ont pas de leptine comme les souris *ob/ob*, ou avec une signalisation de la leptine défectueuse comme les souris *db/db*, ont des niveaux élevés d'endocannabinoïdes dans l'hypothalamus. Cependant, les sites spécifiques de cette interaction restent méconnus, même si un effet au niveau du LH et du PVN a été décrit [123, 185].

Alors que la modulation de la signalisation de CB₁ affecte le fonctionnement de différentes populations neuronales hypothalamiques (voir ci-dessous), il est intéressant de remarquer que le rôle du SEC hypothalamique dans le contexte de la balance énergétique est toujours méconnu. Dans cette optique, nous avons souhaité supprimer l'expression de CB₁ dans tout l'hypothalamus chez la souris adulte. Spécifiquement, la disponibilité de la lignée CB₁^{ff} et notre collaboration de longue date avec le Dr. Marsicano (NSERM U862) a permis de pouvoir développer un modèle de délétion de CB₁ dans l'hypothalamus. En particulier, en injectant dans l'hypothalamus de souris CB₁^{ff} un virus adéno-associé exprimant la Cre-recombinase, nous avons induit une délétion spécifique du gène codant pour CB₁ dans l'hypothalamus de souris adultes. Nous avons ensuite étudié ce nouveau modèle animal et cette étude, récemment publiée dans *Endocrinology* (Cf. Annexes) constitue le deuxième chapitre de ma thèse. Cependant, avant de rentrer plus dans le détail de mes travaux de thèse, je dois présenter l'état actuel des connaissances sur la présence et le rôle du SEC dans les différents noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique.

Le SEC et le noyau arqué

Comme cela a été décrit précédemment, les principaux neurones impliqués dans la régulation de la balance énergétique présents dans l'ARC appartiennent au système mélanocortine. Il semblerait que ces neurones ne soient pas directement impliqués dans les effets du SEC. En effet, les neurones POMC/CART et NPY/AgRP de l'ARC n'expriment pas l'ARNm de CB₁ [186]. Cependant, il faut noter que les projections axonales GABAergiques et glutamatergiques se terminant dans l'ARC expriment la protéine CB₁ [207], bien que cela soit à des niveaux faibles en comparaison d'autres régions cérébrales comme le cortex ou l'hippocampe.

Plusieurs évidences suggèrent que le système mélanocortine n'est pas indispensable à l'action du SEC. Il a par exemple été montré qu'une sous-population de neurones exprimant POMC libère des endocannabinoïdes qui inhibent la libération de GABA vers les neurones POMC [212, 213]. Cependant, alors que l'injection icv d'un antagoniste de CB₁ atténue la prise alimentaire induite par des antagonistes des MC4R [214], l'administration icv d'un agoniste des MC4R ne modifie pas les concentrations hypothalamiques d'endocannabinoïdes [215]. Des études sur la relation entre SEC et autres neuropeptides de l'ARC régulant la balance énergétique ont également été réalisées. Par exemple, les souris NPY KO répondent normalement à l'action du rimonabant [184]. Cependant, ces résultats ne sont pas aussi clairs car une injection de rimonabant chez des souris induit une activation de c-fos dans les neurones NPY et CART, tout en diminuant l'expression d'ARNm et de protéine de NPY et en augmentant celle de CART [216]. De plus, chez les souris CART-KO, le rimonabant est incapable de réduire la prise alimentaire suite à un jeûne [217]. Il faut noter également que chez les souris génétiquement modifiées pour inactiver le gène de la FAAH (la principale enzyme responsable de la dégradation de l'AEA, dont la délétion augmente les concentrations d'endocannabinoïdes dans les synapses de ces animaux) existe une diminution de l'immunoréactivité des fibres des neurones exprimant CART, et qu'un traitement de ces animaux avec le rimonabant ramène l'immunoréactivité de CART au niveau des contrôles [217]. Ces résultats suggèrent qu'il y aurait un lien, au moins indirect, entre NPY, CART et SEC bien que d'autres analyses soient nécessaires pour clarifier cette interaction.

Le SEC et le noyau ventromédian

Le VMN est le noyau hypothalamique ayant la plus forte expression d'ARNm de CB₁ [103, 218]. De plus, il possède une densité moyenne de la protéine [207] qui est présente sur les neurones GABAergiques et glutamatergiques corticaux et sous corticaux [101] faisant synapse dans le VMN. Il est donc logique de supposer que moduler l'activité pré-synaptique des synapses du VMN influera sur la réponse des neurones post-synaptiques, et donc sur la réponse physio-comportementale des animaux. Dans cette optique, comme déjà mentionné plus haut, il faut rappeler que les neurones SF1 du VMN expriment CB₁, qu'ils sont hyperpolarisés par les agonistes de CB₁ et que l'expression de CB₁ est modulée par SF1, à savoir que la délétion du gène SF1 dans le VMN induit une baisse de l'expression de l'ARNm de CB₁ dans ce noyau [100]. De plus, l'administration aigue d'AEA dans le VMN de rats augmente la prise alimentaire [219] par le biais de la protéine CB₁ exprimée dans le VMN, car cet effet est bloqué en pré-traitant les animaux avec le rimonabant.

Etant donné que les neurones du VMN projettent leurs axones dans de nombreuses régions cérébrales, déterminer le rôle de CB₁ exprimé par ces neurones s'avère compliqué et n'a pas encore été exploré à ce jour. C'est ce que je me propose de faire dans mon étude de la nouvelle lignée transgénique VMN- CB₁-KO (Cf. Chapitre III)

Le SEC et le noyau paraventriculaire

Le PVN est considéré comme l'un des principaux sites d'actions du SEC sur la prise alimentaire [176]. Une injection intra-PVN de THC chez le rat augmente significativement la prise alimentaire, et cet effet est inhibé par le rimonabant [220]. De plus, une étude récente a montré que chez le rat, une injection intra-PVN d'AEA augmentait la prise alimentaire et le quotient respiratoire de ces animaux [125].

De la même façon que dans le VMN, l'ARNm de CB₁ est également exprimé au niveau du PVN [103, 186], et co-localise avec plusieurs neuropeptides impliqués dans la régulation de la balance énergétique, comme CART et CRH [186]. Les projections des neurones du PVN vont notamment se faire en direction de l'hypophyse, laissant supposer un rôle de CB₁ dans la régulation de l'axe HPA. Plus précisément, il a été montré que le SEC au niveau du PVN participait au feedback négatif des glucocorticoïdes sur l'axe HPA [221]. Libérés par les neurones parvocellulaires sécrétant le CRH, l'OXT ou l'AVP à la suite de leur activation par les glucocorticoïdes, les endocannabinoïdes inhibent la libération de glutamate pré-synaptique, et inhibent ainsi l'axe HPA [221]. A l'inverse, l'administration de rimonabant augmente les concentrations de corticostérone plasmatiques à la suite d'un stress alors que l'administration d'agonistes de CB₁ réduit la libération de corticostérone [222]. Il faut également noter que chez les souris CB₁-KO, l'axe HPA est plus actif, avec de niveaux d'ACTH et corticostérone plus élevés lors du pic circadien d'activité de l'axe HPA, que chez leurs congénères sauvages du fait de l'absence d'inhibition de l'axe HPA par CB₁ [119]. Et la libération d'ACTH par l'hypophyse est également augmentée chez les souris CB₁-KO [119]. Mais le PVN projette aussi vers le PBN, le complexe vagal dorsal et le tronc cérébral où il module l'activité du SNS afin de contrôler la dépense énergétique. Il semble donc qu'une action des endocannabinoïdes au niveau des terminaisons axonales des neurones du PVN va influencer sur leur fonctionnement. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude explorant le rôle nécessaire que joue le CB₁ du PVN dans la régulation de la balance énergétique. C'est ce que nous avons tenté d'élucider en utilisant un modèle de souris mutant conditionnelle dans laquelle l'expression de CB₁ était spécifiquement supprimée dans le PVN. Cette étude constitue le 4^{ème} chapitre de ma thèse.

Le SEC et l'aire hypothalamique latérale

Enfin, tout comme le PVN et le VMN, l'expression de l'ARNm et de la protéine CB₁ dans le LH supposent que le SEC pourrait jouer un rôle à deux niveaux. Il agit directement au

niveau du LH où les terminaisons axonales faisant synapse dans le LH sont influencées par le SEC. De plus, la présence de l'ARNm, notamment dans les neurones à oréxine et MCH [186], font des régions cibles, telles que l'ARC, le PVN et le tronc cérébral, des axones provenant du LH des sites potentiels de l'action du SEC sur la balance énergétique. Il faut par exemple remarquer que l'interaction entre signalisation de la leptine et SEC a également été observée dans le LH [185]. En effet, il a été proposé que l'activation de CB₁ permet l'activation des neurones à MCH en inhibant les influx Gabaergiques inhibiteurs sur ces neurones, et cet effet est bloqué par la leptine, qui inhibe la synthèse d'endocannabinoïdes dans les neurones MCH, réduisant ainsi l'activation de CB₁ [185]. De plus, il a été montré qu'alors que les endocannabinoïdes activent les neurones à MCH, ils inhibent les neurones à oréxine [223]. Ainsi, le SEC est impliqué dans la régulation de l'activité neuronale au niveau du LH.

Le SEC est un des acteurs majeurs de la régulation de la balance énergétique. Au niveau hypothalamique, il régule différents neurotransmetteurs impliqués dans cette régulation. Cependant, les études publiées jusqu'à présent ont évalué le rôle de CB₁ au niveau des terminaisons nerveuses projetant dans les différents noyaux hypothalamiques, **et non de CB₁ exprimé par les neurones hypothalamiques**. Nous avons donc choisi d'utiliser une approche génétique pour :

- supprimer l'expression de CB₁ dans l'hypothalamus entier de la souris adulte grâce à l'injection d'un virus, ceci afin d'évaluer d'une manière globale l'impact du CB₁ hypothalamique sur la régulation de la balance énergétique, et ainsi éviter les éventuels mécanismes compensatoires qui pourraient résulter d'une délétion embryonnaire. Cette étude correspond au second chapitre de ma thèse et a fait l'objet d'une publication dans *Endocrinology* en Septembre 2012.

- supprimer l'expression de CB₁ dans le VMN. C'est le noyau hypothalamique possédant la plus forte expression d'ARNm de CB₁, et également un noyau important dans la régulation de la balance énergétique. En croisant des animaux de la lignée SF1-cre avec des souris CB₁ flox, nous avons ainsi pu étudier l'impact de la délétion de CB₁ dans les neurones SF1 (constituant la majorité des neurones du VMN) sur la régulation de la balance énergétique. Ce travail constitue le troisième chapitre de ma thèse et fera l'objet d'une publication dans un futur proche.

- supprimer l'expression de CB₁ dans le PVN, qui est également un des centres critiques de la régulation de la balance énergétique, et où l'action du SEC dans ce contexte a déjà été impliquée. Nous avons voulu évaluer le rôle de CB₁ exprimé dans les neurones Sim1 de ce noyau en croisant des animaux de la lignée Sim-cre avec des souris CB₁ flox. Cette étude correspond au quatrième chapitre de ma thèse et fera également l'objet d'une publication originale.

Chapitre II : Etude du rôle du récepteur CB₁ hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique chez la souris.

Résumé

L'activation des récepteurs CB₁ est généralement considérée comme un puissant signal oréxigène et l'inhibition du SEC est bénéfique dans le traitement de l'obésité et de ses problèmes métaboliques associés. L'hypothalamus joue un rôle crucial dans la régulation de la balance énergétique en modulant à la fois la prise alimentaire et la dépense énergétique. Bien que la signalisation des récepteurs CB₁ soit impliquée dans ces deux mécanismes, une compréhension totale de son rôle dans l'hypothalamus est toujours manquante. Afin d'étudier cette question, nous avons combiné une approche génétique avec l'utilisation de vecteurs viraux adéno-associés pour supprimer le gène du récepteur CB₁ dans l'hypothalamus de souris adultes, et nous avons étudié l'impact de cette manipulation sur la régulation de la balance énergétique.

La délétion du gène du récepteur CB₁ médiée par le virus a permis la génération de souris Hyp-CB₁-KO, qui présentent une baisse d'environ 60% des niveaux d'ARNm de CB₁ hypothalamiques. Les souris Hyp-CB₁-KO soumises à un régime standard, normocalorique, présentent une prise de poids diminuée au cours du temps, associée à une dépense énergétique augmentée et des niveaux plus élevés d'ARNm du récepteur β_3 -adrénergique et de l'uncoupling protein-1 (UCP-1) dans le tissu adipeux brun mais, de façon étonnante, sans modification de la prise alimentaire. De plus, les souris Hyp-CB₁-KO étaient insensibles à l'action anorexigène de l'hormone leptine (5 mg/kg), et présentaient une réponse hypophagique dépendante du temps à l'agoniste inverse de CB₁, le rimonabant (3 mg/kg). Ces résultats suggèrent que la signalisation du récepteur CB₁ hypothalamique est un acteur clé de la dépense énergétique en conditions basales, et révèle son rôle spécifique dans la médiation des effets de la leptine et de l'antagonisme pharmacologique du récepteur CB₁ sur la prise alimentaire.

Ce travail a été publié dans *Endocrinology* en septembre 2012 sous le titre « hypothalamic CB₁ cannabinoid receptors regulate energy balance in mice » (Cf. annexes).

Introduction

Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction générale de cette thèse, l'hypothalamus est une des principales régions impliquées dans la régulation de la balance énergétique [224]. Les signaux hormonaux et les nutriments sont détectés dans l'hypothalamus et informent le cerveau sur l'état des niveaux de réserves disponibles pour l'organisme [33, 225]. En retour, les circuits neuronaux hypothalamiques utilisent ces informations pour réguler la prise de calories, la dépense énergétique et les métabolismes périphériques des lipides et du glucose [226-229].

Parmi les médiateurs chimiques impliqués dans la régulation fine de l'activité des circuits hypothalamiques, les endocannabinoïdes jouent un rôle central. Ces dérivés d'acides gras agissent comme des signaux rétrogrades sur les récepteurs CB₁ pour diminuer la libération de neurotransmetteur au niveau des terminaisons nerveuses [230]. Bien que l'expression des récepteurs CB₁ hypothalamiques soit parmi les plus faibles du cerveau [231], leur activation montre une haute efficacité et induit des effets biologiques profonds en modulant l'activité d'un grand nombre de populations neuronales hypothalamiques [19].

De nombreuses évidences suggèrent que l'activation du récepteur CB₁ est un puissant signal oréxigène et que l'inhibition du SEC est bénéfique pour le traitement de l'obésité et des désordres métaboliques associés [19, 20]. Des souris présentant une absence du gène de CB₁ (CB₁-KO) sont minces et résistantes à la DIO [186, 232]. De la même façon, les composés synthétiques tels que l'agoniste inverse de CB₁, le rimonabant, ont montré leur efficacité dans le traitement de l'obésité [19, 20].

Au cours des dernières années, nous et d'autres ont aidé à déterminer que le SEC participe à la régulation de la balance énergétique en engageant des mécanismes à la fois centraux et périphériques. Cependant, bien qu'il soit maintenant établi que la signalisation du récepteur CB₁ en périphérie participe au métabolisme et au stockage des nutriments [19, 20], une compréhension totale de son rôle dans l'hypothalamus manque toujours. De plus, la

relation entre la signalisation du récepteur CB₁ et la régulation de la prise alimentaire pourrait être plus complexe que ce qui était supposé à l'origine car l'effet oréxigène bien connu des endocannabinoïdes dépend de leur action sur les récepteurs CB₁ localisés sur les terminaisons des neurones glutamatergiques corticaux, tandis que la signalisation des récepteurs CB₁ présents sur les terminaisons des neurones GABAergiques supprime la prise alimentaire [233].

Des études récentes ont également suggéré que la maintenance de la perte de poids induite par l'administration chronique d'antagonistes ou d'agonistes inverses du récepteur CB₁ est principalement due à une dépense énergétique augmentée via la stimulation du SNS qui induit l'activation de la lipolyse et de l'oxydation des acides gras [21, 22, 234, 235]. De la même façon, des souris transgéniques ayant une délétion du gène de CB₁ dans le prosencéphale, incluant l'hypothalamus, et les neurones sympathiques sont résistantes à la DIO grâce à une oxydation des lipides et une thermogénèse accrues, qui provient d'une activité sympathique augmentée [21]. Dans cette étude, nous avons souhaité vérifier l'impact général de la signalisation des récepteurs CB₁ hypothalamiques sur la balance énergétique et en particulier clarifier comment la fonction du récepteur CB₁ dans cette structure cérébrale peut affecter la prise alimentaire et la dépense énergétique, les deux principaux mécanismes au travers desquelles les circuits hypothalamiques garantissent la maintenance de la balance énergétique.

Matériels et méthodes

Animaux

Des mâles CB₁-floxés (CB₁^{f/f}) de même portées [236] ont été utilisés dans cette étude. Les souris étaient hébergées dans des cages individuelles pour rongeurs standard en plastique, maintenues dans un cycle 12h-jour/12h-nuit (avec la lumière s'éteignant à 13h) avec un accès *ad libitum* à de la nourriture en boulettes (Standard Rodent Diet A03, 3.2 Kcal/g; SAFE, Augy, France) et à l'eau, à moins que cela soit spécifié.

Toutes les expériences ont été menées dans le strict respect des recommandations de l'union européenne (2010/63/EU) et approuvées par le ministère français de l'agriculture et de la pêche (autorisation expérimentation animale n° 3309004). A la fin des expériences comportementales, les souris furent tuées par dislocation cervicale and les tissus prélevés pour une analyse ultérieure. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est détaillé dans les légendes des figures.

Délétion du gène du récepteur CB₁ médiée par un virus adéno-associé dans l'hypothalamus

Des vecteurs viraux adéno-associés recombinants exprimant la Cre recombinase (rAAV-Cre) ou la « green fluorescent protein » (rAAV-GFP) ont été préparées comme précédemment décrit [237]. Les souris CB₁^{f/f} ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine et de xylazine (0.01 ml/g de poids du corps d'un mélange de 2 ml de kétamine à 5%, 0.5 ml de xylazine à 2%, et 7.5 ml de solution saline) et ont reçu une dose analgésique de buprénorphine (0.1 ml/souris). 0.5 µl de soit le rAAV-Cre ou rAAV-GFP (titration: 2x10¹² génomes viraux par millilitre) fut injecté de façon bilatérale à 0.05µl/min par des injecteurs de 9 mm de long placés dans des guide canules en acier inoxydable de 8 mm dans un appareil stéréotaxique, et ciblant le VMN (1.5 mm postérieur au bregma, 0.5 mm latéral par rapport à la ligne médiane, 5.7 mm sous la surface du crâne). Les souris Hyp-CB₁-WT et Hyp-CB₁-KO ont rapidement récupéré de la chirurgie, et leur prise alimentaire et leur poids corporels ont été mesurés tous les jours pendant la durée de l'étude. La "Feed efficiency" a été calculée sur la période de l'étude comme le poids corporel gagné divisé par l'énergie absorbée (en kilocalories).

Hybridation fluorescente in situ

Les cerveaux ont été prélevés, puis immédiatement congelés dans la carboglace. Ils ont ensuite été stockés à -80°C avant d'être coupés au cryostat (14 µm, Microm HM 500M; Microm Microtech, Francheville, France). Des ribosondes marquées à la digoxigénine dirigées contre le récepteur CB₁ de souris ont été préparées, et l'hybridation *in situ* a été réalisée comme précédemment décrit [237]. Pour l'amplification du signal, nous avons utilisé le système the TSA Plus System cyanine 3/fluoresceine (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Le tampon de blocage TNB et le tampon de lavage TNT ont été préparés en suivant le protocole du fournisseur. Les coupes ont enfin été analysées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Leica, Nanterre, France).

PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les hypothalamus et thalamus ont été "punchés" bilatéralement sur les cerveaux congelés à l'aide d'un cryostat et d'un perforateur cylindrique de cerveau (Fine Science Tools, Foster City, CA; diamètre interne : 1.0 mm and 2.0 mm, respectivement). La longueur des punchs était d'environ 1.7 mm (début : 0.58mm à partir du bregma). L'ARNm a ensuite été extrait des punchs, et l'expression du récepteur CB₁ a été quantifiée par qPCR, comme décrit précédemment [21]. Des qPCR ont aussi été réalisées sur l'ARNm extrait du BAT de ces animaux afin d'évaluer l'expression d'UCP-1 et du récepteur β_3 adénergique. Les couples d'amplificateurs pour *UCP-1* (n° d'accès GenBank : NM_009463) étaient : AAAGAGCTGATGAAGTCCAGACA (forward) et TCAGTATCTCTTCTCCAAGTTGCT (reverse); pour le récepteur β_3 adénergique (n° d'accès GenBank : NM_013462) : CGACATGTTCTCCACAAATCA (forward) et TGGATTCCTGCTCTCAAATAACC (reverse). Les deux gènes de ménage utilisés étaient : *Ywhaz* (tyrosine 3 mono-oxygénase/tryptophane 5 Mono-oxygénase activation protein, ζ polypeptide) (n° d'accès GenBank : NM_011740) : CTTGTGAGGCTGTGACACAAACA (forward) and CAAGAGTGTGCACGCAGACA (reverse); et *NonO* (non-Pit-Oct-Unc domain containing, octamer binding protein) (n° d'accès GenBank : NM_023144) : CTGTCTGGTGCATTCCTGAACATAT (forward) et AGCTCTGAGTTCATTTCCCATG (reverse).

Prise alimentaire en réponse au rimonabant et à la leptine

Pour l'étude de prise alimentaire avec l'agoniste inverse du récepteur CB₁ rimonabant, les souris ont été privées de nourriture pendant 24h puis ont eu libre accès à une quantité prédéterminée de nourriture standard. Trente minutes avant le retour de la nourriture, les animaux ont été injectés intra-péritonéalement (i.p.) avec du rimonabant (3 mg/kg, obtenu grâce au National Institute of Mental Health Chemical Synthesis and Drug Supply Program, Bethesda, MD) ou son véhicule (1.25% de diméthyl sulfoxyde et 1.25% de Tween-80 dans une solution saline).

Pour l'étude de prise alimentaire avec la leptine, les mangeoires avec la nourriture standard ont été enlevées des cages (ainsi que les possibles miettes de nourriture dans les litières) 1h avant l'administration de l'hormone [mouse recombinant leptin 5 mg/kg, i.p., obtenue auprès du Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program (Torrance, CA)] ou du PBS, qui a été effectuée 4 h avant le début de la phase nocturne (9 am). Au moment où la phase nocturne a débuté, les mangeoires ont été replacées dans les cages [238, 239].

La prise alimentaire a ensuite été mesurée 1, 2, et 24h après le retour de la nourriture. Le poids corporel a été mesuré immédiatement avant les traitements et 24h après le retour de la nourriture. L'étude de prise alimentaire avec la leptine a été réalisée deux fois, de façon à ce que les souris reçoivent les deux traitements dans un ordre contrebalancé.

Calorimétrie indirecte

Les souris ont été hébergées individuellement dans des cages métaboliques (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany) dans lesquelles la prise de nourriture et de boisson, l'activité locomotrice, et les échanges gazeux peuvent être mesurés et enregistrés. Après 72 h d'habituation, la consommation d'O₂ et la production de CO₂ ont été mesurées 4 fois par heure pendant une durée de 48h afin de mesurer les échanges gazeux, le quotient respiratoire (RQ), et la dépense énergétique. Les valeurs ont été normalisées en fonction du poids des animaux. Les prises alimentaire et de boisson ont été mesurées de façon continue au cours de l'expérience. Simultanément, l'activité locomotrice dans la cage était déterminée en utilisant un système de faisceaux lumineux infra-rouges tridimensionnel. L'activité locomotrice totale a ensuite été exprimée en nombre de croisements de faisceau durant ces 48h.

Statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica version 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK). Toutes les valeurs exprimées sont les moyennes \pm SEM. Les données de qPCR, de feed efficiency, et les changements de poids corporel sur 24h ont été analysées par ANOVA ou par un test *t* de Student à deux facteurs. Le gain de poids et les variations de prise alimentaire au cours du temps ont été analysées par ANOVA à mesures répétées. Les ANOVA significatives ont été suivies par un test *post hoc* de Fisher de la plus petite différence significative. $p < 0.05$ est considéré comme significativité statistique.

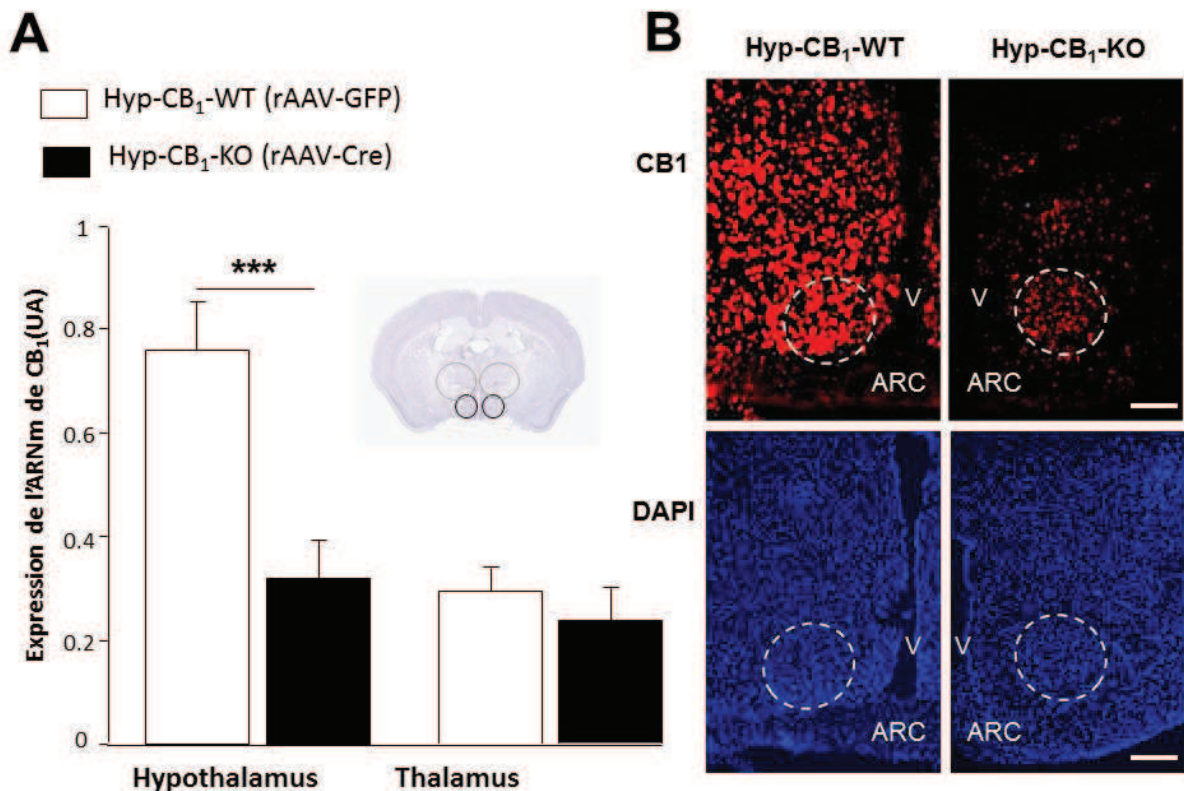


Figure 1. (A) Expression de l'ARNm de CB₁ dans des prélèvements (punches) d'hypothalamus (ligne noire dans l'image de coupe coronale) et de thalamus (ligne grise in the mouse coronal section image) de souris CB₁^{ff} (4 et 8 souris/groupe) recevant soit le virus rAAV-GFP (Hyp-CB₁-WT) ou rAAV-Cre (Hyp-CB₁-KO) dans l'hypothalamus. (B) Images représentatives prise au niveau de la partie la plus rostrale du noyau ventromédian (pointillés) de l'hypothalamus provenant d'études d'hybridation *in situ* fluorescente montrant l'expression de l'ARNm de CB₁ chez des souris Hyp-CB₁-WT et Hyp-CB₁-KO (3 souris/groupe). Le contre-marquage du noyau a été effectué à l'aide de DAPI. DAPI, 4',6'-Diamino-2-phenylindole V: 3^e ventricule. ARC: noyau arqué. Echelle de la barre: 100 μ m. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM ; * $p < 0.05$.

Résultats

Effets de la délétion des récepteurs CB₁ hypothalamiques sur la balance énergétique

Afin d'obtenir une délétion globale du gène du récepteur CB₁ dans les neurones hypothalamiques, nous avons injecté un virus recombinant adéno-associé exprimant la Cre-recombinase (rAAV-Cre) ou la GFP (rAAV-GFP) dans l'hypothalamus de souris adultes CB₁^{fl/fl} [236]. Les souris CB₁^{fl/fl} ont été distribuées de façon aléatoire en deux groupes ayant un poids corporel identique (Groupe rAAV-GFP : 27.05 ± 1.01g; groupe rAAV-Cre : 26.43 ± 0.7g, $p > 0.05$) avant l'injection intra-hypothalamique du rAAV-Cre ou du rAAVGFP. L'injection du rAAV-Cre a conduit à la génération des souris Hyp-CB₁-KO, qui étaient caractérisées par une diminution de l'expression de l'ARNm du récepteur CB₁ de 57.6 ± 9.34% dans l'hypothalamus en comparaison avec leurs congénères Hyp-CB₁-WT générés en administrant le rAAV-GFP (Fig. 1A). Aucune modification de l'expression de l'ARNm de CB₁ n'a été observée dans les punches des thalamus adjacents à la suite de l'administration du rAAV-Cre, suggérant que la procédure était spécifique et a uniquement ciblé l'expression du récepteur CB₁ dans l'hypothalamus (Fig. 1A). La délétion au sein de l'hypothalamus était étendue et non limitée à un noyau hypothalamique spécifique, comme l'a confirmé l'analyse par hybridation *in situ* fluorescente (Fig. 1B). Comme précédemment rapporté dans la littérature [186, 240], l'ARNm du récepteur CB₁ n'était pas exprimée dans l'ARC des souris Hyp-CB₁-WT (Fig. 1B).

Les souris Hyp-CB₁-KO ont présenté une baisse significative de gain de poids en comparaison avec leurs congénères Hyp-CB₁-WT (Fig. 2A, $p < 0.01$) en régime standard, tandis qu'aucune différence significative de prise alimentaire n'a été observée au cours de la période d'étude (Fig. 2B). En particulier, durant la semaine 9, lorsque la différence de poids est la plus importante, la prise alimentaire n'était pas significativement différente entre les deux génotypes (Prise alimentaire des Hyp-CB₁-WT: 5.44 ± 0.15 g vs. Prise alimentaire des Hyp-CB₁-KO: 5.15 ± 0.14 g; $p > 0.05$; et Fig. 2B). Donc, une baisse significative de la feed efficiency est devenue évidente chez les souris Hyp-CB₁-KO (Fig. 2C, $p < 0.01$), qui était associée à une augmentation significative de la dépense énergétique, présente durant les phases diurne et nocturne du cycle nyctéméral (Fig. 2D). En accord avec ces résultats, les souris Hyp-CB₁-KO avaient des niveaux d'expression d'ARNm du récepteurβ3 adrénergique et d'UCP-1 augmentés dans le BAT (Fig. 2E), suggérant une activation augmentée du SNS et de la thermogénèse chez ces animaux. Enfin, l'activité locomotrice totale n'était pas significativement différente entre les deux génotypes (Fig. 2F).

Effet de l'administration de rimonabant chez les souris Hyp-CB₁-KO

L'administration systémique aigue de l'agoniste inverse du récepteur CB₁ rimonabant est connue pour diminuer la prise alimentaire et le poids corporel en mettant en jeu des mécanismes à la fois centraux et périphériques [21, 196]. Afin de déterminer le rôle de la signalisation des récepteurs CB₁ hypothalamiques dans les effets anorexigènes du rimonabant, nous avons administré la drogue (3 mg/kg, i.p.) aux souris Hyp-CB₁-WT et Hyp-CB₁-KO après 24h de jeûne. Les souris mutantes et leurs contrôles ont perdu du poids de façon similaire après le jeûne de 24h (perte de poids : Hyp-CB₁-WT, 3.53±0.17 g vs. Hyp-CB₁-KO, 3.61±0.12 g, $p > 0.05$). Le rimonabant a diminué la prise alimentaire induite par le jeûne dans les deux groupes une heure après le retour de la nourriture (Fig. 3A). Cependant, alors que l'effet anorexigène de la drogue était toujours présent 24h après le retour de la nourriture chez les souris Hyp-CB₁-WT, il avait complètement disparu chez leurs congénères Hyp-CB₁-KO (Fig. 3B). De la même façon, le rimonabant a diminué la prise de poids induite par le retour de la nourriture chez les souris Hyp-CB₁-WT mais pas chez les souris portant la délétion hypothalamique du gène de CB₁ (Fig. 3C).

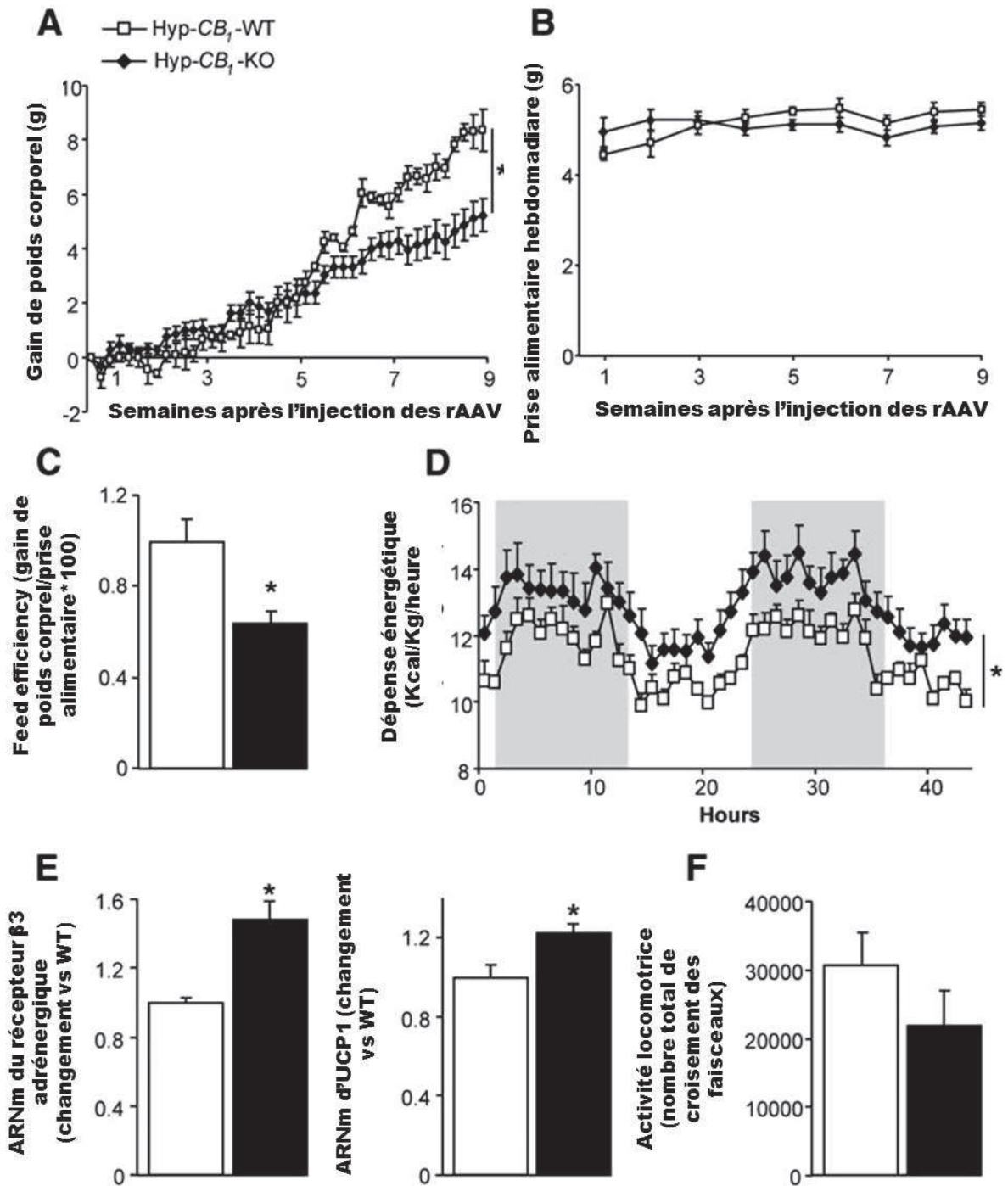


Figure 2. Gain de poids corporel (A), prise alimentaire hebdomadaire (B), et feed efficiency (C) chez les souris Hyp- CB_1 -WT et leurs congénères Hyp- CB_1 -KO en conditions de régime standard (4 et 8 souris/groupe). (D), Dépense énergétique sur 48 heures et activité locomotrice totale (F) chez les souris Hyp- CB_1 -WT et leurs congénères Hyp- CB_1 -KO (5 et 6 souris/groupe). (E) Expression de l'ARNm du récepteur β_3 -adrénergique et d'UCP-1 dans le tissu adipeux brun de souris Hyp- CB_1 -WT et Hyp- CB_1 -Ko en conditions de régime standard (4 et 5 souris/groupe). Les rectangles gris en (D) représentent la phase nocturne. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM ; *, $p < 0.05$.

Effet de l'administration de leptine chez les souris Hyp- CB_1 -KO

L'hormone dérivée des adipocytes leptine régule négativement la signalisation du récepteur CB_1 dans l'hypothalamus en diminuant les niveaux d'endocannabinoïdes. Il est supposé que cette réduction est en partie responsable des effets hypophagiques de l'hormone [122, 184, 185]. En prenant ces données en compte, nous avons voulu vérifier l'action anorexigène de la leptine chez les souris Hyp- CB_1 -WT et leurs congénères Hyp- CB_1 -KO. Comme attendu, les souris Hyp- CB_1 -WT ont répondu à l'injection périphérique de leptine (5 mg/kg, i.p.) par une profonde hypophagie. De façon surprenante, cependant, cet effet ainsi que les changements de poids associés étaient totalement absents chez les souris Hyp- CB_1 -KO (Fig. 4A-C).

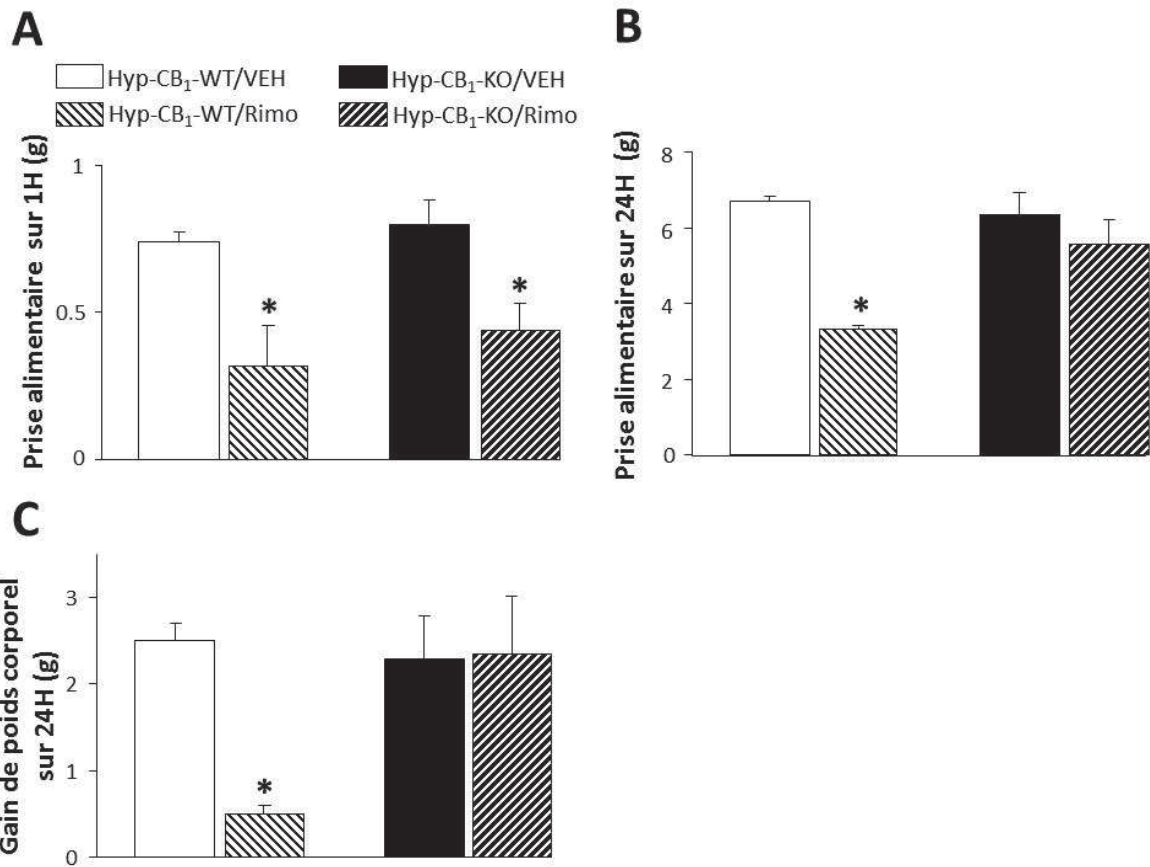


Figure 3. Effet de l'administration systémique de l'agoniste inverse du récepteur CB1 rimonabant (Rimo; 3 mg/kg, ip) ou son véhicule (VEH) sur la prise alimentaire induite par le jeûne à 1 h (A) et 24 h (B) et le gain de poids corporel sur 24 h (C) chez les souris Hyp-CB₁-WT et leurs congénères Hyp-CB₁-KO (4 souris/groupe). Les données sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM ; *, $p < 0.05$.

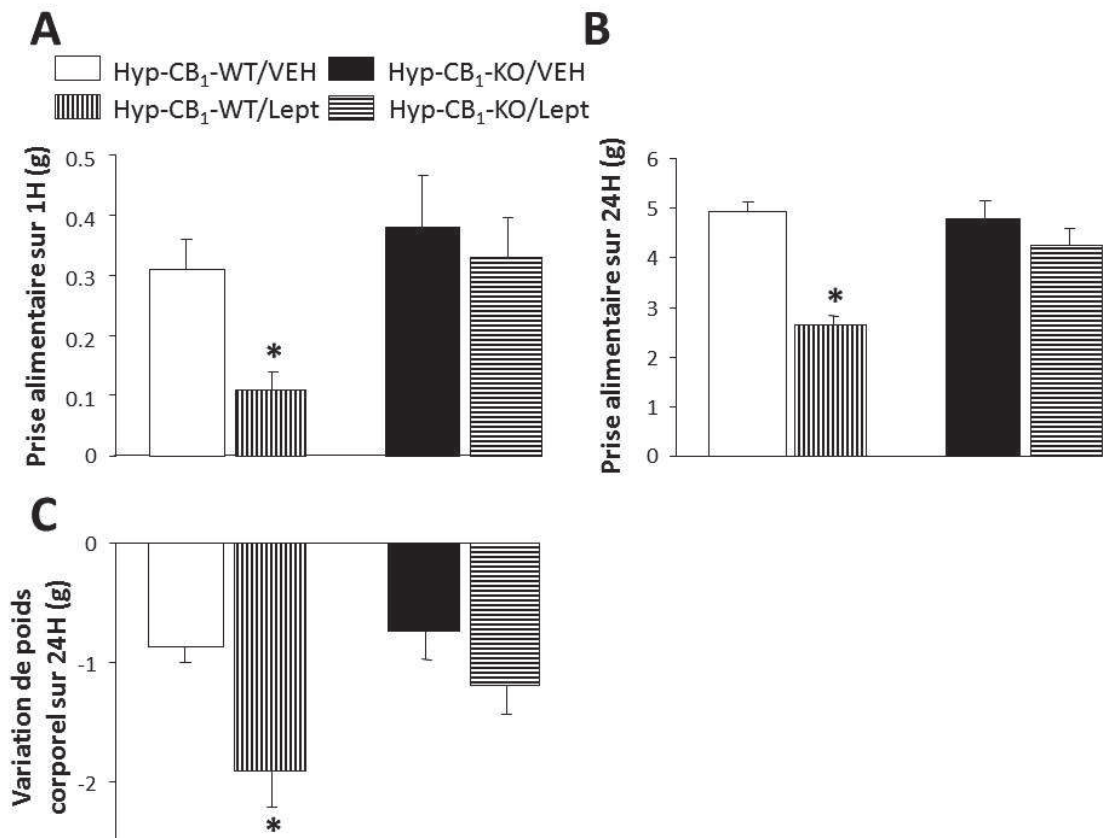


Figure 4. Effet de l'administration systémique aiguë de leptine (Lept; 5 mg/kg, ip) ou de son véhicule (VEH) sur la prise alimentaire à 1 h (A) et 24 h (B) et sur les variations de poids sur 24h (C) chez les souris Hyp-CB₁-WT et leurs congénères Hyp-CB₁-KO (4 et 8 souris/groupe). Les données sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM ; *, $p < 0.05$.

Discussion

L'hypothalamus joue un rôle crucial dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique, et la signalisation du récepteur CB₁ a été impliqué dans la modulation de ces deux mécanismes participant au maintien de la balance énergétique [19, 20]. Dans la présente étude, nous montrons qu'une délétion partielle du gène du récepteur CB₁ dans l'hypothalamus de souris adultes induit une baisse importante de la prise de poids, qui est la conséquence d'une dépense énergétique augmentée plutôt qu'une baisse de la prise alimentaire.

C'est un résultat intrigant, si l'on considère la littérature sur le rôle de la signalisation du récepteur CB₁ hypothalamique dans la régulation de la prise alimentaire. Il a été montré que l'administration de l'endocannabinoïde AEA dans le VMN augmente rapidement la prise alimentaire chez le rat d'une manière CB₁-dépendante [219]. De la même façon, l'administration de l'agoniste du récepteur CB₁ THC dans le PVN induit une hyperphagie par activation du récepteur CB₁ [220]. Il faut également noter que l'effet oréxigène de l'hormone gastrique ghréline, qui est associé à une augmentation des concentrations d'endocannabinoïdes hypothalamiques, requiert une signalisation intacte du récepteur CB₁ [241, 242]. A côté de ça, les souris CB₁-KO sont légèrement hypophagiques, un effet dont la cause possible est le changement des niveaux d'expression de nombreux neuropeptides hypothalamiques connus pour réguler la prise alimentaire [186].

Les résultats obtenus, et en particulier l'absence de changements significatifs dans la prise alimentaire pourraient s'expliquer si l'on prend en compte l'approche utilisée pour déléter le gène du récepteur CB₁. En effet, elle ne permet pas d'éliminer sélectivement l'expression du récepteur CB₁ au sein d'un type neuronal hypothalamique spécifique. C'est important si l'on considère que des populations neuronales hypothalamiques ont des rôles opposés dans la modulation de la prise alimentaire [224], et d'autant plus important si l'on considère les récentes découvertes illustrant l'effet opposé que la modulation CB₁-dépendante des signalisations glutamatergique et GABAergique a sur la prise alimentaire [233]. Donc, la présente étude n'exclue pas un rôle des récepteurs CB₁ localisés sur une population cellulaire hypothalamique spécifique dans la régulation du comportement alimentaire. Cela suggère plutôt que lorsque l'expression du récepteur CB₁ est significativement diminuée dans l'hypothalamus, sans tenir compte du type cellulaire ciblé par une telle approche, cela n'affecte pas la prise alimentaire, ni en conditions basales, ni en condition stimulée (e.g. induite par le jeûne).

De plus, due aux limitations intrinsèques de diffusion du vecteur [243, 244], le ciblage viral donne une délétion incomplète des gènes cibles, qui pourrait donc expliquer la délétion partielle du récepteur CB₁ observée dans notre modèle. Donc, il est possible qu'un pourcentage plus important de délétion du gène du récepteur CB₁ dans l'hypothalamus puisse résulter en des changements significatifs du comportement alimentaire. Enfin, il doit également être mentionné que, une fois encore à cause des caractéristiques intrinsèques du vecteur utilisé, il est peu probable que le virus rAVV-Cre ait affecté l'expression de l'ARNm de CB₁ dans des structures extra-hypothalamiques connues pour avoir un rôle dans la régulation de la balance énergétique, telle que le noyau accumbens ou l'aire tegmentale ventrale (VTA) [245].

A l'inverse de la prise alimentaire, la dépense énergétique, l'autre contributeur majeur du maintien de la balance énergétique, montre des changements importants après la diminution d'expression des récepteur CB₁ hypothalamiques, et explique la baisse de prise de poids observée chez les souris Hyp-CB₁-KO. Donc, la cause la plus probable de la baisse de prise de poids suite à la délétion partielle du gène du récepteur CB₁ dans l'hypothalamus est une dissipation de l'énergie accrue. De façon intéressante, des résultats récents suggèrent que la délétion du gène du récepteur CB₁ dans les neurones principaux du prosencéphale (incluant l'hypothalamus) et les neurones sympathiques s'accompagne de changements de régulation de la balance énergétique due à une augmentation générale de l'activité sympathique [21]. Par conséquent, nous avons trouvé que les souris Hyp-CB₁-KO avaient une expression augmentée

de l'ARNm du récepteur β_3 -adrénergique et d'UCP-1 dans le BAT, suggérant une activation sympathique et une thermogénèse augmentées. Les présents résultats suggèrent que les récepteurs CB_1 hypothalamiques exercent un contrôle général de la dépense énergétique, probablement en modulant indirectement l'activité du SNS.

Cette interprétation est en accord avec de nombreuses études récentes mettant en évidence une relation fonctionnelle entre la signalisation du récepteur CB_1 et le SNS. En effet, une administration aigue ou chronique d'antagonistes ou d'agonistes inverses de CB_1 augmente la dépense énergétique et l'activité sympathique, un effet nécessaire à l'induction de la thermogénèse dans le BAT, et de la lipolyse dans le WAT [21, 22, 235, 246]. Pris collectivement, les données précédentes et actuelles suggèrent que l'expression du récepteur CB_1 dans l'hypothalamus est nécessaire pour contrôler la dépense énergétique et pour maintenir le poids corporel, probablement par la régulation de l'activité noradrénergique périphérique.

Il faut noter que les présents résultats ont été générés en utilisant des souris soumises à un régime standard et, comme mentionné plus tôt, la délétion du récepteur CB_1 dans l'hypothalamus n'était que partielle. Cela implique que dans des conditions où une sur-activation du SEC est observée, telles que lors de l'exposition à un régime riche en graisse (HFD) ou lorsqu'une délétion complète du récepteur CB_1 hypothalamique est obtenue, des effets encore plus forts pourraient être observés sur la dépense énergétique.

Nous avons ensuite voulu vérifier si l'effet anorexigène bien connu du rimonabant dépend des CB_1 hypothalamiques. De façon intéressante, nous avons observé que durant la première heure de réalimentation induite par le jeûne, le rimonabant était aussi efficace à générer une hypophagie chez les souris Hyp- CB_1 -WT que chez leurs congénères Hyp- CB_1 -KO. Cependant, cet effet était perdu à 24h chez les souris Hyp- CB_1 -KO. Cela suggère que deux composantes biologiques bien distinctes participent à l'hypophagie induite par le rimonabant, et qu'elles agissent d'une manière dépendante du temps. La première composante qui est rapidement engagée par l'administration périphérique du composé, pourrait être médiée par des sous-populations hypothalamiques spécifiques ou être d'origine extra-hypothalamique car il n'était pas altéré par la délétion partielle des récepteurs CB_1 de l'hypothalamus. En accord avec ces résultats, une étude de Gomez *et al.* publiée en 2002 [196] a révélé un rôle de la signalisation de CB_1 périphérique dans les effets rapides sur la prise alimentaire observées juste après l'injection de rimonabant. La deuxième composante, qui est mise en jeu plus tard et intègre les informations venant des terminaisons nerveuses périphériques et du tronc cérébral, mais également de la circulation sanguine, est d'origine hypothalamique car ses effets sur la prise alimentaire et la perte de poids sont abolis chez les souris Hyp- CB_1 -KO 24h après l'administration de la substance.

Contrairement au rimonabant, l'action anorexigène de l'hormone leptine dépend principalement de sa capacité à cibler de nombreuses structures du SNC impliquées dans la régulation de la prise alimentaire, incluant l'hypothalamus, le cerveau moyen, et le tronc cérébral [9].

La relation entre leptine et SEC a été intensément étudiée ces dernières années. En particulier, il a été montré que la leptine inhibe la production d'endocannabinoïdes hypothalamiques et leur fonction neuromodulatrice [122, 184, 185], et les animaux mutants qui n'ont pas de leptine comme les souris *ob/ob*, ou avec une signalisation de la leptine défectueuse comme les souris *db/db*, ont des niveaux élevés d'endocannabinoïdes dans l'hypothalamus [184]. Nous avons donc testé si la leptine était toujours capable de moduler la prise alimentaire chez des souris avec une expression de l'ARNm de CB_1 hypothalamique diminuée. Et, étonnamment, nous avons pu observer que la leptine était incapable de réduire la prise alimentaire chez ces souris. Cela suggère qu'un SEC hypothalamique fonctionnel est nécessaire à l'action de l'hormone. Une fois encore, à cause des limites de la technique employée, nous n'avons pas été en mesure d'établir des populations neuronales spécifiques impliquées dans ce phénomène. D'autres études seront nécessaires pour clarifier si la résistance observée à l'administration exogène de la leptine est le résultat d'une altération

directe de la signalisation dépendant de la leptine dans l'hypothalamus. Néanmoins, les données présentées ici supposent l'existence d'un lien fonctionnel entre la leptine et le SEC qui pourrait être plus complexe que celui initialement imaginé, et impliquent un rôle permissif de la signalisation des CB₁ hypothalamiques dans la médiation des effets aigus de la leptine sur la prise alimentaire et le poids corporel. Ainsi, tandis que la leptine inhibe la production d'endocannabinoïdes, une signalisation fonctionnelle du récepteur CB₁ hypothalamique est apparemment nécessaire pour l'effet anorexigène de l'hormone.

En résumé, les présents résultats apportent des preuves d'un rôle direct de la signalisation des récepteurs CB₁ hypothalamiques dans la régulation de la balance énergétique.

Chapitre III : Le rôle du récepteur CB₁ dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus dans la régulation de la balance énergétique chez la souris.

Résumé

Le système endocannabinoïde (SEC) joue un rôle clé dans la régulation de la balance énergétique mais ses fonctions au sein des différents noyaux hypothalamiques connus pour réguler cette balance n'ont pas encore été clairement établies. Le noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMN) régule à la fois la prise alimentaire et la dépense énergétique. Bien que la signalisation des récepteurs aux cannabinoïdes de type 1 (CB₁) soit impliquée dans ces deux mécanismes, une compréhension totale de son rôle dans le VMN est toujours manquante. Afin d'étudier cette question, nous avons supprimé le gène *CB₁* dans les neurones SF1 du VMN, et nous avons étudié l'impact de cette manipulation sur la régulation de la balance énergétique chez la souris.

Les souris VMN-*CB₁*-KO sont caractérisées par une baisse d'environ 80% des niveaux d'ARNm de CB₁ dans le VMN. Comparés à leurs congénères sauvages (WT), les souris mâles VMN-*CB₁*-KO soumises à un régime standard, normocalorique, ont une prise de poids et une prise alimentaire normales au cours du temps, mais présentent une baisse de masse grasse et une sensibilité accrue à l'action anorexigène de l'hormone leptine, ainsi qu'à l'insuline, et une meilleure tolérance au glucose que leurs congénères WT. Cela est associé à un quotient respiratoire diminué et à des niveaux plus élevés d'ARNm du récepteur α -adrénergique dans le tissu adipeux blanc. A l'inverse, lors de l'exposition à un régime riche en graisses, les souris mâles VMN-*CB₁*-KO prennent significativement plus de poids, principalement dû à une augmentation de la prise alimentaire qui résulte en une masse grasse augmentée, et présentent une baisse de l'expression de l'ARNm du récepteur à la leptine dans l'hypothalamus. Ces résultats suggèrent que la signalisation du récepteur CB₁ dans le VMN hypothalamique affecte différemment la balance énergétique selon le type de nourriture consommée, et implique une possible interaction entre les signalisations de CB₁ et du récepteur à la leptine dans le VMN.

Introduction

Le système endocannabinoïde (SEC) a émergé ces dernières années comme un acteur clé de la régulation de la balance énergétique [23] et de l'homéostasie du glucose [247]. L'activation du récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB₁) par ses ligands lipidiques endogènes, les endocannabinoïdes, est habituellement considéré comme un puissant signal oréxigène, bien que des études récentes ont montré que son action sur la prise alimentaire dépend en fait de sa présence sur des types neuronaux spécifiques [233]. Une délétion complète de CB₁ chez la souris réduit la prise alimentaire et la prise de poids [186]. De plus, une délétion de CB₁ dans les neurones principaux du prosencéphale et du système nerveux sympathique (SNS) induit un phénotype résistant à l'obésité [21]. Récemment, nous avons publié une étude où la délétion partielle (60% de réduction d'expression) de CB₁ restreinte à l'hypothalamus induit également une prise de poids réduite, qui n'était cependant pas due à une altération de la prise alimentaire, probablement à cause du fait que des populations exerçant un rôle opposé sur la prise alimentaire ont été simultanément touchées, mais à une augmentation de la dépense énergétique [248]. Cependant, le rôle de CB₁ au niveau des noyaux spécifiques de l'hypothalamus, également connus pour réguler la balance énergétique, reste méconnu.

Au niveau hypothalamique, l'expression de l'ARNm de CB₁ est la plus importante dans le noyau ventromédian [103]. Ce noyau est considéré comme le centre historique de la satiété car les études lésionnelles ont révélé qu'une lésion bilatérale du VMN conduit à l'obésité [16]. De plus, il est impliqué dans la contre-régulation de l'hypoglycémie [110]. Le steroidogenic factor 1 (SF1) est un récepteur nucléaire orphelin récemment identifié qui contrôle le développement et la cytoarchitecture du VMN [80, 81, 83, 84]. Des études récentes ont également révélé que SF1 joue un rôle dans la régulation de la balance énergétique [91]. En effet, une délétion de SF1 induit un phénotype obèse, principalement due à une baisse de l'activité physique plutôt qu'une augmentation de la prise alimentaire [249]. De plus, les neurones SF1 sont connus pour médier une partie des effets de l'hormone

adipocytaire leptine, car la leptine dépolarise et augmente la fréquence de décharge des neurones SF1 [90]. En outre, une délétion du gène du récepteur à la leptine spécifiquement dans les neurones SF1 induit l'obésité et le développement d'un syndrome métabolique, ainsi qu'une incapacité à augmenter la thermogénèse en réponse à un régime riche en graisses [90, 250]. Il est également intéressant de noter que l'ARNm de CB₁ est régulé par SF1 car son expression est stimulée par SF1, et une délétion de SF1 réduit l'expression de CB₁ dans le VMN [100]. Les neurones SF1 sont inhibés par le WIN 55, 212, un agoniste de CB₁, et cet effet est bloqué par un antagoniste de CB₁, révélant l'implication spécifique de CB₁ dans les effets observés [100]. De plus, une injection intra-VMN d'anandamide stimule la prise alimentaire chez le rat [219]. Cependant, il n'existe pas à notre connaissance d'études ayant évalué le rôle spécifique du récepteur CB₁ dans les neurones SF1 dans la régulation de la balance énergétique. Afin de répondre à cette question, nous avons généré une lignée de souris mutantes possédant une délétion de CB₁ restreinte aux neurones SF1, que nous avons ensuite caractérisés en termes de prise de poids, prise alimentaire en régime standard normocalorique ou enrichi en graisses, de composition corporelle et dépense énergétique, et nous avons réalisé une analyse moléculaire des tissus impliqués dans la régulation de la balance énergétique. Nos résultats suggèrent que CB₁ exprimé au niveau des neurones SF1 joue un rôle dans la balance énergétique, et que ce rôle dépend de la composition du régime alimentaire.

Matériels et méthodes

Animaux

Pour la génération des souris CB₁^{ff} *sfl*-Cre (VMN-CB₁-KO), des animaux de la lignée SF1-Cre (obtenue auprès des laboratoires Jackson, Bar Harbor, ME) ont été croisés avec des souris CB₁-flox homozygotes (CB₁^{ff}) [236] grâce à un protocole de rétrocroisement en trois étapes, comme décrit précédemment [104, 237, 251]. Brièvement, des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Sfl* (SF1-Cre) ont été croisées avec des souris CB₁^{ff} pour obtenir des souris hétérozygotes CB₁-flox exprimant la Cre-recombinase (CB₁^{Cre;f/+}; étape 1). Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris CB₁^{ff} afin d'obtenir des souris homozygotes CB₁^{Cre;ff} (étape 2). Enfin, les mâles de l'étape 2 ont été croisés avec des femelles CB₁^{ff} pour générer les animaux expérimentaux (étape 3). Le génotypage locus du gène CB1 « floxé » a été réalisé par PCR sur un prélèvement d'un petit bout de la queue en utilisant les primers suivants : forward : '5-GCTGTCTCTGGTCTCTTAAA; reverse: 5'-CTCCTGTATGCCATAGCTCTT [251].

Les souris (mâles et femelles) âgées de 6 à 7 semaines étaient hébergées en cages individuelles dans une animalerie thermo-régulée à 22°C ± 2°C, avec un cycle jour/nuit 12h/12h (début de la phase diurne à 1 a.m.). Les animaux avaient un accès *ad libitum* à l'eau et à un régime standard pour rongeurs (Standard Rodent Diet A03, 3.2 Kcal/g, SAFE, France) sauf indication contraire. Pour les expériences chroniques en régime riche en graisses, les animaux étaient exposés à un régime enrichi en graisses à 40% (40% HFD, Research Diets, 4.54 Kcal/g, New Brunswick, NJ). Le poids corporel des animaux ainsi que leur prise de nourriture étaient mesurées 5 fois par semaine.

Toutes les expériences ont été menées dans le strict respect des recommandations de l'union européenne (2010/63/EU) et approuvées par le ministère français de l'agriculture et de la pêche (autorisation expérimentation animale n° 3309004) et par le comité éthique local. A la fin des expériences comportementales, les souris furent tuées par dislocation cervicale ou anesthésiées et perfusées, et les tissus prélevés pour une analyse ultérieure. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est détaillé dans les légendes des figures.

Analyse de la composition corporelle

La composition corporelle des animaux a été évaluée par résonance magnétique nucléaire (EchoMRI, Houston, TX, comme précédemment décrit [239]) à 7 et 15 semaines d'âge.

Etude de la réponse alimentaire à la leptine

Pour l'étude de prise alimentaire en réponse à la leptine, les mangeoires avec la nourriture standard ont été enlevées des cages (ainsi que les possibles miettes de nourriture dans les litières) 1h avant l'administration de l'hormone [mouse recombinant leptin obtenue auprès du Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program (Torrance, CA)] ou du véhicule (Tampon salin phosphate, PBS), qui a été effectuée 4 h avant le début de la phase nocturne. Au moment où la phase nocturne a débuté, les mangeoires ont été replacées dans les cages, comme dans [238, 239]. Une dose sous-effective de leptine (2.5 mg/kg, ip) a été utilisée pour vérifier la présence possible d'une sensibilité accrue à l'action anorexigène de l'hormone chez les souris VMN-CB₁-KO.

La prise alimentaire a été mesurée 1, 2, 4, 8 et 24h après le retour de la nourriture. Le poids corporel a été mesuré immédiatement avant les traitements et 24h après le retour de la nourriture. L'étude de prise alimentaire avec la leptine a été réalisée deux fois, de façon à ce que les souris reçoivent les deux traitements dans un ordre contrebalancé.

Tests de tolérance au glucose et à l'insuline

Pour les tests de tolérance intra-péritonéaux au glucose (ipGTT) et à l'insuline (ipITT), les souris ont été pesées puis privées de nourriture durant les 16 heures précédant le début des expériences. Une heure avant l'injection de glucose (2 g/kg D-Glucose, Sigma Aldrich, St Louis, MO) ou d'insuline (0,5 U/kg, Umulin, Lilly, France) dans du PBS, les souris ont été pesées pour évaluer la perte de poids durant le jeûne, puis ont été transférées dans la pièce d'expérimentation pour habituation. Juste avant l'injection, le niveau de glucose basal a été évalué en coupant le bout de la queue et en recueillant une goutte de sang afin de mesurer les niveaux de glucose grâce à un glucomètre (ONETOUCH, Vita, France). Un échantillon de sang a également été collecté dans un tube tapissé d'acide Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA), puis centrifugé 20min, 2000 rpm à 4°C; le plasma a ensuite été prélevé puis congelé à -80°C jusqu'à la mesure de l'insuline. La glycémie a ensuite été mesurée grâce au glucomètre à 15, 30, 60, 90 et 120 min pour l'ipGTT, et à 15, 30, 45, 60 et 120 min pour l'ipITT.

Calorimétrie indirecte

Les souris ont été hébergées individuellement dans des cages métaboliques (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany) dans lesquelles la prise de nourriture et de boisson, l'activité locomotrice, et les échanges gazeux peuvent être mesurés et enregistrés. Après 72 h d'acclimatation, la consommation d'O₂ et la production de CO₂ ont été mesurées 2 fois par heure pendant une durée de 48h afin de mesurer les échanges gazeux, le quotient respiratoire (RER), et la dépense énergétique. Les valeurs ont été normalisées en fonction du poids des animaux. Les prises alimentaire et de boisson ont été mesurées de façon continue au cours de l'expérience. Simultanément, l'activité locomotrice dans la cage était déterminée en utilisant un système de faisceaux lumineux infra-rouges tridimensionnel. L'activité locomotrice totale a ensuite été exprimée en nombre de croisements de faisceau durant ces 48h. Pour l'évaluation des variations de dépense énergétique en réponse à une exposition aigue à un régime riche en graisses, un régime enrichi en graisses à 60% a été utilisé.

Tomographie par émission de positrons (PET)

Pour les études utilisant le ¹⁸F-FDG, des souris VMN-CB₁-KO et leurs congénères sauvages maintenues en régime standard ont été analysées en 3 sessions différentes. Dans la 1^{ère}, les souris ont été placées à 24°C et traitées ip avec une solution véhicule. 1 heure plus tard, les souris étaient placées dans une chambre froide (6°C) durant 3 heures. Les animaux ont ensuite été légèrement anesthésiés (avec du sévofluorane), injectés avec le ¹⁸F-FDG (15 MBq), puis placés dans la chambre froide pendant une heure afin d'évaluer l'absorption du traceur. Les scans ont été réalisés à l'aide d'un système de tomographie par émission de positrons (PET) (Explore Vista, GE). 5 jours plus tard, l'expérience a été répétée chez les mêmes

animaux traités avec un agoniste des récepteurs β_3 -adrénergiques, le CL 316, 243 [252, 253] et maintenues à 24°C. Les données d'accumulation du ^{18}F -FDG sur les images de PET des souris sont exprimées comme les valeurs d'absorption standard (SUV), représentant la quantité radioactive par gramme de tissu, divisé par la dose de radioactivité injectée par gramme d'animal. Afin d'identifier correctement l'absorption des traceurs dans le BAT, une image référence de CT était enregistrée avec les images de PET pour chaque scan comme décrit dans [254].

Analyse de l'ADN génomique

Pour évaluer la délétion effective des récepteurs CB_1 dans le VMN et déterminer si cette délétion était présente dans d'autres régions cérébrales ou structures, les souris ont été tuées par dislocation cervicale et les cerveaux et moelles épinières étaient rapidement prélevés. Différentes régions cérébrales, incluant le cortex, le striatum, le thalamus, le tronc cérébral, l'hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus ont été disséqués en utilisant une matrice coronale pour cerveau de souris (ASI Instruments, Inc., USA). Pour déterminer la présence/absence de CB_1 dans les organes périphériques impliqués dans la balance énergétique et le métabolisme du glucose, de nombreux tissus périphériques (tels que le foie, le pancréas, les muscles, les intestins, l'estomac...) ont été prélevés puis évalués par PCR en utilisant les couples de primers décrits plus haut.

Les tissus ont d'abord été digérés à 56°C sur la nuit dans un mix de tampon et de protéinase K. L'ADN a ensuite été extrait en utilisant un protocole standard d'extraction de phénolchloroforme-chloroforme-isopropanol puis re-suspendu dans de l'eau milliQ. Les bandes correspondant à la délétion génomique de CB_1 , ainsi que l'allèle de CB_1 -floxé ont été amplifiées par PCR en utilisant les primers décrits plus haut. La PCR était réalisée avec des tampons de PCR standards et dans les conditions suivantes : 95 °C, 5 min; 37 fois (95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 45 s); 72 °C, 5 min.

Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel

Afin d'évaluer la délétion de CB_1 dans les organes périphériques connus pour exprimer SF1 (e.g. hypophyse, surrénales et gonades), ces tissus ont été prélevés puis l'expression de l'ARNm de CB_1 a été déterminée grâce à un couple de primers spécifiques (Table 1). L'expression de différents gènes a également été évaluée dans l'hypothalamus, le BAT et le WAT. La liste des gènes et de leurs primers est rapportée dans la table 1.

Les tissus ont été homogénéisés dans du Trizol (Tri Reagent, Molecular Research Center, Inc., Fermentas, Cincinnati, OH). L'ARN a été isolé des tissus en utilisant un protocole standard chloroforme-isopropanol, puis traités et analysés en adaptant des méthodes publiées [255]. Brièvement, l'ADNc est synthétisé à partir de 2 μg d'ARN total à l'aide de la RevertAidTM Premium Reverse Transcriptase (Fermentas), de primers oligo-dT et d'un Random Hexamer Primer (Fermentas). La PCR quantitative en temps réel (qPCR) est ensuite réalisée grâce à un LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les réactions de qPCR été réalisées en duplicats pour chaque échantillon en utilisant des primers spécifiques de chaque gène (Table 1), 4 ng d'ADNc et du LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Meylan, France) dans un volume final de 10 μl . Les valeurs de C_p de chaque gène sont normalisés avec les valeurs de 2 gènes de référence [hypothalamus : la peptidyl propyl isomérase A (Ppia) et le complexe succinate déshydrogénase, sous-unité A (Sdha) ; BAT : la protéine contenant la vasoline (Vcp) et Sdha ; WAT : le facteur d'élongation de la translation (Eef1a1) et la protéine de liaison aux octamères contenant un domaine non-POU (Nono)] (Table 1) en utilisant l'algorithme Genorm [256]. Les données de PCR sont ensuite exportées dans le Gene Expression Analysis Software Environment (GEASE, développé par Alexandre Brochard pour l'Inserm U862, Bordeaux, France) pour être analysés. Le niveau d'expression relative est enfin calculé en utilisant la méthode comparative des $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ [257].

Table 1. Liste des couples de primers (Forward et Reverse) utilisés pour l'étude de l'expression des gènes par qPCR dans l'hypothalamus, le BAT, le WAT, les gonades, l'hypophyse et les surrénales.

Gène	Forward	Reverse
ACC-1	ATTGACCCAGACTGGCTTGAA	GTGTGAAGGCTGCTTTGTGAAC
ACC-2	TCTGTCTGCTGCCCTTCTTG	TGGGCTTTCTCCACATCA
Adiponectine	CGTTCTCTTACCTACGACCAGTA	GATGGAGGAGCACAGAGCCA
Agrp	GCTCCACTGAAGGGCATCA	CCATTACAGACTTAGACCTGGGAA
Bdnf	CCCGTCTGTACTTTACCCCTTGG	TGACTAGGGAAATGGGCTTAACA
CB ₁	GTGCTGTTGCTGTTCAATTGTG	CTTGCCATCTTCTGAGGTGTG
Crh	AAAGCAGATGGGAGTCATCCAG	GCCACCCCTCAAGAATGAATT
Cox4	CCGACTGGAGCAGCCTTTC	TCGGCGAAGCTCTCGTAAA
Eef1a1	TGAACCATCCAGGCCAAATC	GCATGCTATGTGGGCTGTGT
Fas	GTTGGAAGTCAGCTATGAAGCAATT	AGACGCCAGTGTTCGTTCTT
Leptine	GGTGAGCGGGATCAGTTTTT	TCACCCCTCAGATCTCCAA
MC4R	CAGGGATCTGGTTCCTACAGAAA	GATGAAATGAACGCTGGACCTC
Nono	CTGTCTGGTGCATTCTGAACTAT	AGCTCTGAGTTCATTTTCCCATG
Npy	CCCCAGAACAAGGCTTGAAG	TTGGAAAAGTCGGGAGAACAA
PGC-1 α	CAACCATACCAGAACAAGAACAA	AAGCTGACACCCGTGAATAAAC
Pomc	TGGGCGAGCTGATGACCT	GCCGACTGTGAAATCTGAAAGG
Ppar γ	TTGACAGGAAAGACAACGGACA	TCTTCTCCATCATTAAAGGAATTCA
Ppia	TTGGCTATAAGGGTTCCTCC	TCAAATTTCTCTCCGTAGATGG
Pré-pro-orexine	GCTGTCCGACCGTAACCTACCA	GGACAAGGATAGAAGATGGGTTCA
Pro-Mch	CCTGTGCTCGGCAACAT	AGCAACATCAAGGGCTTTTCTC
Récepteur β 3 adrénergique	CGACATGTTCTCCACAAATCA	TGGATTCTGCTCTCAAACCTAAC
Récepteur à la leptine	TGTGTCTACTGCTCGGAACAC	GGAACATCGTCCAAAACAACT
Sdha	TACAAAGTGCGGGTCGATGA	TGTTCCCAACGGCTTCT
Socs3	CTCCTGAGTTAACACTGGGAAGACA	GGAGGCTCTCGGACTACTGA
Stat3	CAGAGGGTCTCGGAAATTTAATCATT	CGTTGTTAGACTCTCCATGTTTCT
Tfam	TCGGAGACCTACCTCAGATTAAGTG	AGAGGAGGGAGGAAGCCTGAT
UCP-1	AAAAAGAGCTGATGAAGTCCAGACA	TCAGTATCTTCTCCAAGTTGCT
Vcp	TGGCCGTCTAGATCAGTCTCAT	TTTCGAGATTGGCTTTTAGG

ACC-1 : AcétylCoA-Carboxylase 1 ; ACC-2 : AcétylCoA-Carboxylase 2 ; Agrp : Agouti-gene related peptide ; Bdnf : Brain-derived neurotrophic factor ; CB₁ : Récepteur aux cannabinoïdes de type 1 ; Crh : Cortico-releasing hormone ; Cox4 : Cyclo-oxygénase IV ; Eef1a1 : Facteur d'élongation de la translation ; Fas : Fatty acid synthase ; MC4R : récepteur aux mélanocortines de type 4 ; Nono : Protéine de liaison aux octamères contenant un domaine non-POU ; Npy : Neuropeptide Y ; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α ; Pomc : pro-opiomélanocortine ; Ppar γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ; Ppia : peptidyl propyl isomérase A ; Pro-Mch : Pro-hormone de concentration de la mélanine ; Sdha : complexe succinate déshydrogénase, sous-unité A ; Socs3 : Suppressor of cytokine signaling 3 ; Stat3 : Signal transducer and activator of transcription 3 ; Tfam : Transcription factor A, mitochondrial ; UCP-1 : Uncoupling Chain Protein 1 ; Vcp : protéine contenant la vasoline

Double hybridation in situ fluorescente

Des souris VMN-CB₁-WT et VMN-CB₁-KO (2 par génotype) ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Leurs cerveaux ont été isolés, rapidement congelés dans de la carboglace puis stockés à -80° C jusqu'à la coupe, effectuée à l'aide d'un cryostat (Leica, Microm HM 500M, Microm Microtech, Francheville, France). Des ribosondes marquées au DIG pour le récepteur VGluT2, ainsi que des ribosondes marquées au FITC pour CB₁ ont été préparées comme précédemment décrit [237, 248]. L'amplification du signal a été réalisée avec le système TSATM Plus System Cyanine 3/Fluorescein (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Les tampons de blocage TNB et de lavage TNT ont été préparés en suivant les recommandations du fournisseur. Les coupes ont été analysées par microscopie à épifluorescence et un grossissement de 20X (Leica, Nanterre, France).

Immunohistochimie (IHC)

Des souris mâles VMN-CB₁-WT et VMN-CB₁-KO (n=3/4 par génotype) de 21-23 semaines ont été injectées ip avec soit 2.5mg/kg de leptine dissous dans du PBS, soit avec du

PBS. Une heure après l'injection, les souris ont été anesthésiées avec 0.1ml de Pentobarbital, puis ont reçu une perfusion transcordiale avec du PBS maintenu dans la glace, puis du paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS. Les cerveaux ont ensuite été prélevés et placés dans une solution de PFA à 4% pendant 24 heures à 4°C, puis transférés dans une solution de sucrose à 30%. Les cerveaux ont ensuite été coupés à l'aide d'un cryostat (30µm, CM 1950, Leica, Nanterre, France). Les coupes ont été placées à -20°C dans une solution antigél (Solution « maison » contenant du glycérol et du glycogène) jusqu'au traitement histologique.

Les sections utilisées par l'IHC ont été lavées dans du PBS (PH=7.4) pendant une heure avant d'être traitées avec une solution de 1% de NaOH (1M) et 1% d'H₂O₂ dans du PBS pendant 20 min, lavées dans du PBS, puis incubées dans une solution de glycine à 0.3% pendant 10 min. Après un nouveau lavage dans du PBS, les sections ont été placées dans une solution de SDS à 20% pendant 10 min, lavées dans du PBS puis incubées dans une solution de sérum de chèvre à 8% (Dako, Trappes, France), 0.4% de Triton X100 (Sigma Aldrich, St Louis, MO) pendant 2 heures. Ensuite, les coupes ont été incubées sur la nuit à 4°C dans une solution contenant du sérum de lapin anti STAT3 phosphorylée sur la Tyrosine 705 (Anticorps polyclonal pour pSTAT3 n° 9131, 1:500, Cell signaling technologies, Beverly, MA) du sérum de chèvre à 4%, et 0.4% de Triton X100. Le jour suivant, les coupes étaient placées à température ambiante pendant 15min avant d'être lavées dans une solution contenant 1% de sérum de chèvre, 0.02% de Triton X100. Les sections ont ensuite été incubées dans une solution contenant 1:250 de sérum de chèvre anti lapin biotinilé dans 4% de sérum de chèvre pendant 1 heure, puis lavées dans une solution avec 1% de sérum de chèvre, suivi par une heure d'incubation dans une solution d'un complexe avidine-biotine (Vecastain Elite ABC Kit, Vector laboratories, Burlingame, CA). Après une autre étape de lavage, les coupes ont été incubées dans une solution de diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB; Vecastain Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les sections ont enfin été lavées, déshydratées et montées sur des lames SuperFrost, puis visualisées au microscope à épifluorescence (DM500, Leica, Nanterre, France). La quantification a été effectuée grâce au logiciel Image J (NIH, Bethesda, MA).

Quantification des hormones

L'insuline et la leptine plasmatiques ont été mesurées en suivant les recommandations du fournisseur des différents kits (kit ELISA pour l'insuline : Mercodia, Uppsala, Sweden ; kit ELISA pour la leptine : Abcam, Paris, France). Puis la densité optique a été lue avec un lecteur de plaque (Microplate Reader Model 680, Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

Analyse statistique

Tous les résultats sont représentés sous forme de moyennes ± SEM. Les données ont été analysées en utilisant Statistica 9 (StatSoft). Une ANOVA à mesure répétée a été réalisée pour les études chroniques, suivies par les tests post-hocs appropriés. Dans les autres cas, une ANOVA à un facteur ou un t-test ont été utilisés. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour un $p < 0.05$.

Résultats

Génération et caractérisation des souris VMN-CB₁-KO

Les souris VMN-CB₁-KO ont été obtenues en croisant des animaux de la lignée SF1-Cre (Laboratoires Jackson, Bar Harbor, ME) avec des souris CB₁^{ff} [236] (voir Matériels et Méthodes). Afin d'évaluer la délétion spécifique de CB₁ dans le VMN des souris VMN-CB₁-KO, nous avons commencé par réaliser de nombreuses PCR dans plusieurs régions cérébrales afin de confirmer la présence de la délétion du gène de CB₁, et nous avons trouvé qu'il était uniquement présent dans l'hypothalamus au niveau du SNC des souris VMN-CB₁-KO (Fig. 1A), et en périphérie dans les gonades, les surrénales et l'hypophyse (Fig. 1A), qui sont trois organes où *sfl* est exprimé. Nous avons ensuite réalisé une double hybridation *in situ* fluorescente (FISH) pour l'ARNm de CB₁ et l'ARNm du transporteur vésiculaire du

glutamate 2 (Vglut2) sur des cerveaux de souris VMN-*CB₁*-KO et WT. L'analyse des résultats de FISH a révélé une diminution spécifique de l'ARNm de *CB₁* dans le VMN des souris VMN-*CB₁*-KO (Fig. 1F) comparé aux souris VMN-*CB₁*-WT (Fig. 1C). De plus, l'expression de l'ARNm de Vglut2 n'était pas affectée dans le VMN, excluant la possibilité d'une cytoarchitecture du VMN altérée chez les souris VMN-*CB₁*-KO (Fig. 1B et E). Nous avons ensuite réalisé des PCR quantitatives en temps réel (qPCR) sur les gonades, les surrénales et l'hypophyse afin d'évaluer l'expression de l'ARNm de *CB₁* et n'avons trouvé aucune différence significative dans l'expression du récepteur (Fig. 1H).

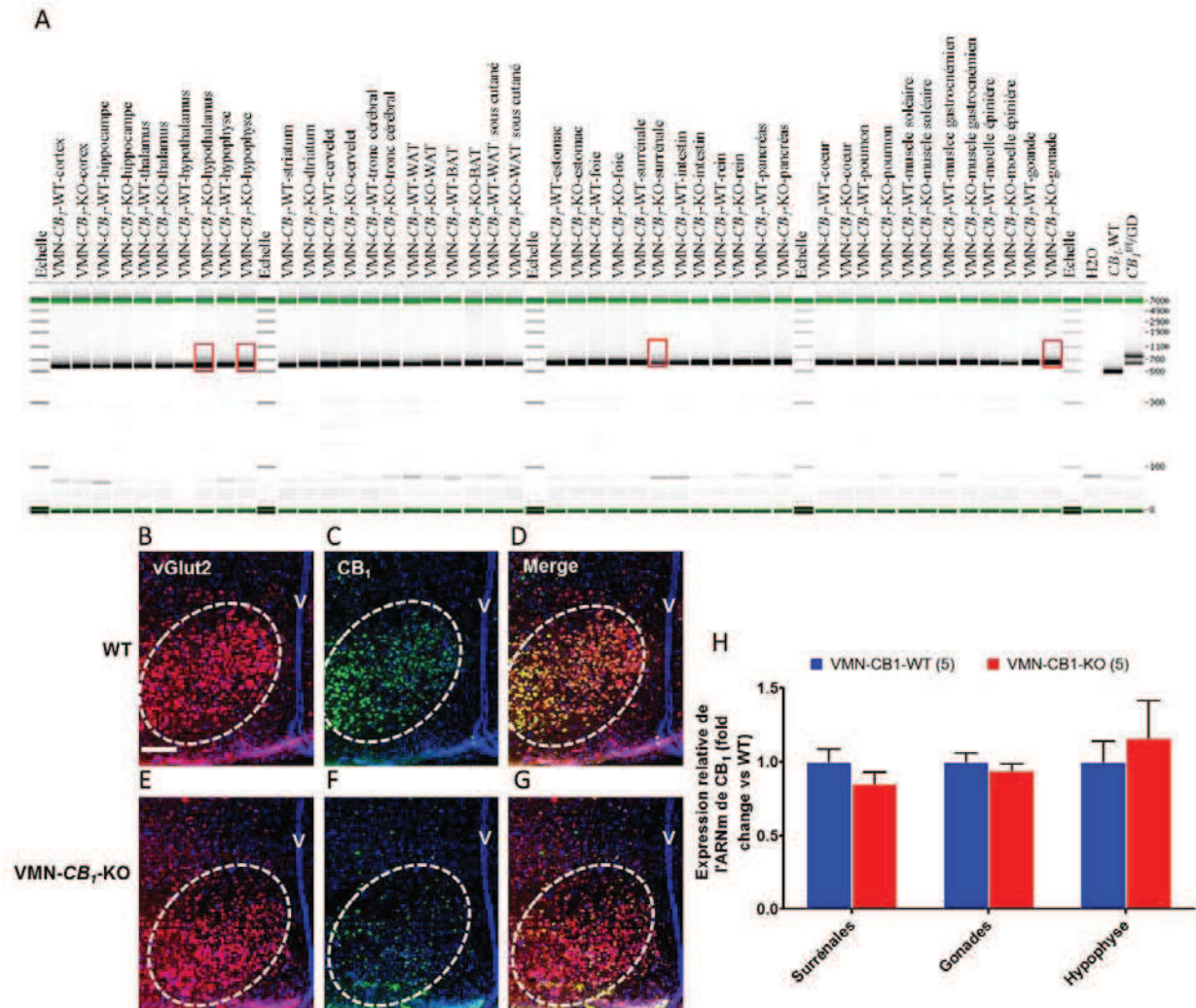


Figure 1. Analyse de la spécificité de la délétion de *CB₁* (A) Analyse d'ADN génomique réalisée sur des structures centrales et périphériques de souris VMN-*CB₁*-WT et VMN-*CB₁*-KO (n=5 souris/génotype). (B-G) Images représentatives prises au niveau du noyau ventromédian (ligne pointillée) de l'hypothalamus provenant d'études d'hybridation *in situ* fluorescente montrant l'expression de l'ARNm de Vglut2 (rouge) et *CB₁* (vert) chez des souris VMN-*CB₁*-WT (B-D) et VMN-*CB₁*-KO (E-G) (2 souris/génotype). (H) Expression de l'ARNm de *CB₁* dans les surrénales, les testicules (gonades) et l'hypophyse de souris VMN-*CB₁*-WT et VMN-*CB₁*-KO. Echelle de la barre: 100 µm. La flèche rouge indique la forme tronquée du gène de *CB₁*. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données en H sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM.

Les souris avec la délétion de *CB₁* dans les neurones SF1 sont plus minces et ont une oxydation des acides gras augmentée en régime standard

Afin de déterminer l'importance relative de l'expression et l'activation de *CB₁* au sein des neurones SF1 dans la régulation de la balance énergétique, nous avons mesuré l'évolution du poids corporel et la prise alimentaire chez les souris VMN-*CB₁*-KO et WT. La délétion de *CB₁* dans les neurones SF1 n'a pas modifié la prise de poids (Fig. 2A) ni la prise alimentaire (Fig. 2B). Cependant, l'analyse de la composition corporelle par résonance magnétique nucléaire (RMN) a révélé une augmentation significative de la masse maigre (VMN-*CB₁*-WT : 19.13 ± 0.4165g vs VMN-*CB₁*-KO : 20.32 ± 0.2495g) à 7 semaines (Fig. 2C) et une baisse significative de la masse grasse (VMN-*CB₁*-WT : 4.0695 ± 0.2566g vs VMN-*CB₁*-KO :

2.9747 ± 0.1782g) à 15 semaines (Fig. 2E) chez les souris mâles VMN-*CB₁*-KO comparés aux VMN-*CB₁*-WT.

D'un autre côté, nous n'avons observé aucune différence entre les souris femelles VMN-*CB₁*-WT et VMN-*CB₁*-KO, que ce soit en termes de prise de poids (Fig. 2A), prise alimentaire (Fig. 2B) ou composition corporelle (Fig. 2 G-J). Pour ces raisons, nous avons décidé de poursuivre l'étude uniquement chez les mâles.

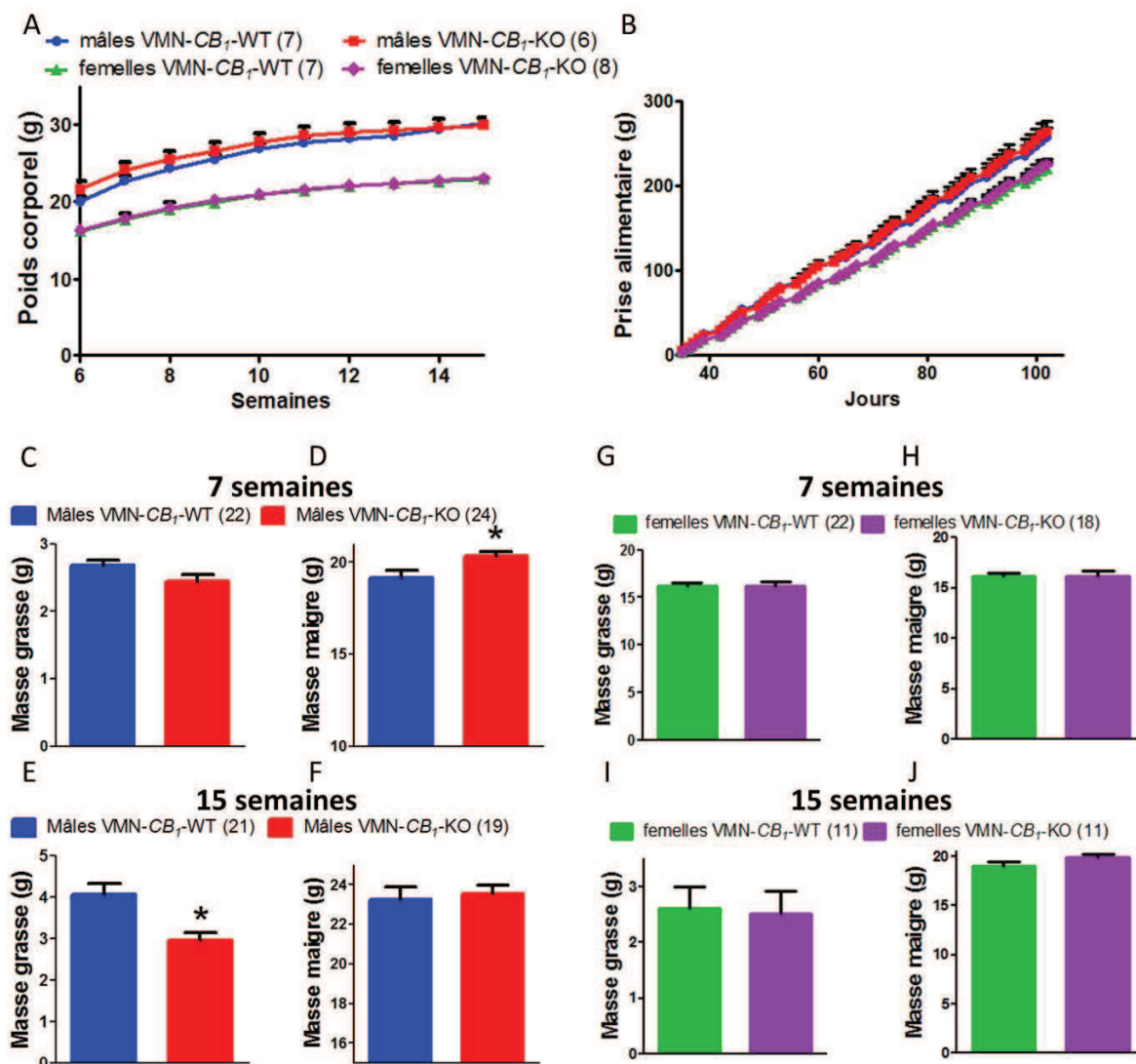


Figure 2. Prise de poids (A) et prise alimentaire (B) chez les souris mâles et femelles VMN-*CB₁*-WT et VMN-*CB₁*-KO maintenues en régime standard. Composition corporelle à 7 (C-D) et 15 semaines (E-F) chez les souris mâles VMN-*CB₁*-WT et VMN-*CB₁*-KO maintenues en régime standard. Composition corporelle à 7 (G-H) et 15 semaines (I-J) chez les souris femelles VMN-*CB₁*-WT et VMN-*CB₁*-KO maintenues en régime standard. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM ; **p* < 0.05 vs. VMN-*CB₁*-WT.

Afin de déterminer si la diminution de masse grasse observée chez les mâles adultes VMN-*CB₁*-KO pouvait provenir d'une dépense énergétique augmentée, nous avons réalisé une expérience de calorimétrie indirecte, et n'avons pas observé de différence de dépense énergétique (Fig. 3A) mais nous avons observé une baisse significative du quotient respiratoire (Fig. 3B) chez les souris VMN-*CB₁*-KO en comparaison avec leurs WT.

Le système nerveux sympathique (SNS) joue un rôle clé dans la modulation de la dépense énergétique et du métabolisme des acides gras, en stimulant la thermogénèse dans le tissu adipeux brun (BAT), et l'oxydation des acides gras dans le tissu adipeux blanc (WAT) respectivement, via l'activation des récepteurs β_3 adrénergiques (β_3 -AdrR) [258, 259]. Nous avons donc souhaité dans un premier temps, évaluer si le métabolisme basal du BAT et du

WAT étaient modifiés chez les souris VMN-*CB₁*-KO en conditions standard (régime standard et température de 22 ± 2°C) en évaluant par qPCR l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et l'activité mitochondriale.

L'analyse de l'expression des gènes dans le BAT par qPCR a montré une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de la cyclooxygénase 4 (Cox4) et du peroxisome proliferator gamma Co activator 1 alpha (PGC-1α) chez les souris VMN-*CB₁*-KO en comparaison avec les WT (Fig. 3C). Ces résultats suggèrent une activité mitochondriale augmentée dans le BAT des souris VMN-*CB₁*-KO, alors que nous n'avons pas observé de changements dans l'expression d'UCP-1, un marqueur de la thermogénèse [260, 261]. Alors que l'expression de l'ARNm du β3-AdrR a une tendance à l'augmentation (p=0.134) dans le BAT (Fig. 3C), son augmentation était significative dans le WAT chez les souris VMN-*CB₁*-KO (Fig. 3D). Dans le WAT, nous avons également observé une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'enzyme Acétyl-CoA Carboxylase 2 (ACC-2) chez les souris VMN-*CB₁*-KO, associés à une baisse de l'expression de l'ARNm de Cox4 (Fig.3D). Cependant, ces résultats auront besoin d'être confirmés en augmentant le nombre d'échantillons étudiés.

Ces résultats nous ont poussés à évaluer la réactivité du BAT. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de PET et évalué l'absorption de norépinéphrine dans le BAT lors d'une exposition au froid, ou suite à l'injection de l'agoniste β3-AdrR, le CL 316, 223 [252, 253]. L'analyse de l'absorption a révélé que lors d'une exposition au froid, les souris VMN-*CB₁*-KO ont une augmentation plus importante de l'absorption de NE dans le BAT en comparaison avec leurs WT (Fig. 3E), un effet mimé par l'injection de CL (Fig. 3F).

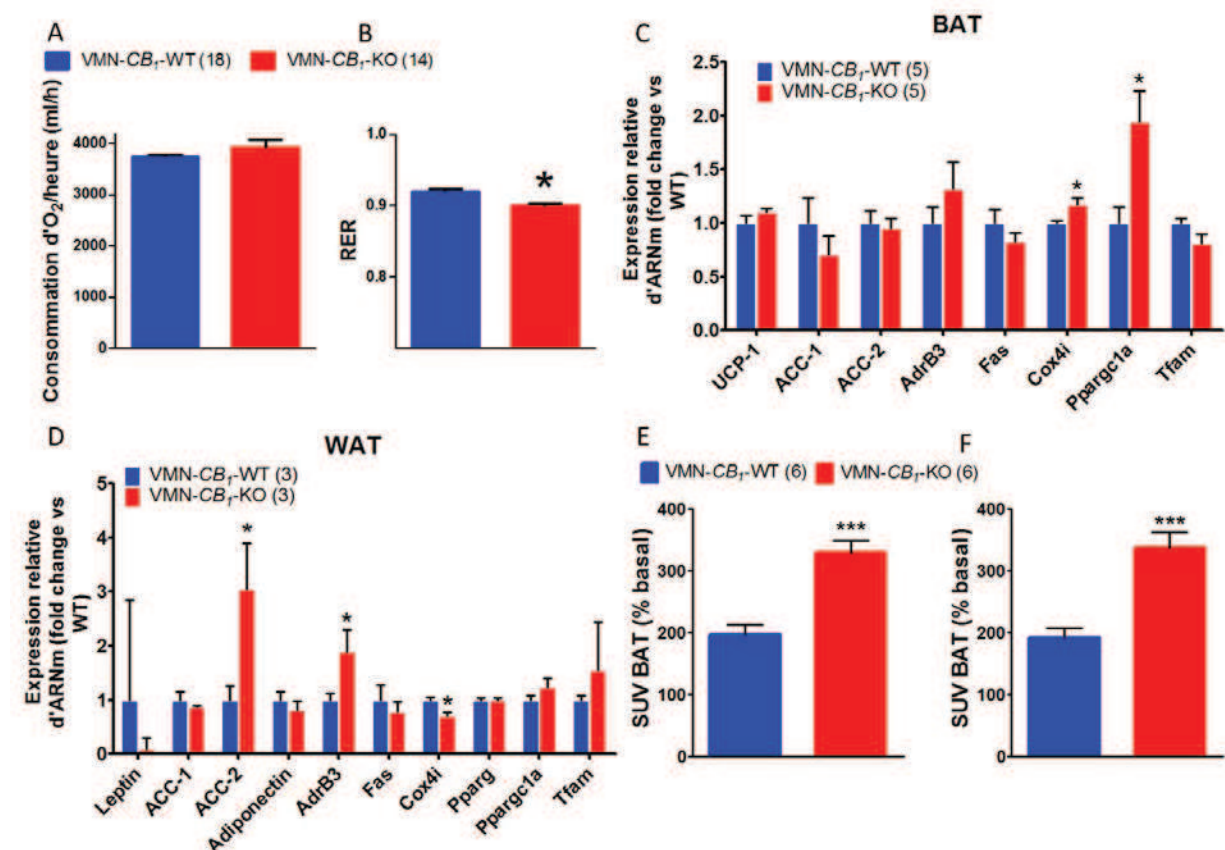


Figure 3. Consommation d'oxygène (A) et quotient respiratoire (RER) (B) chez les souris mâles VMN-*CB₁*-WT et VMN-*CB₁*-KO maintenues en régime standard. Expression relative d'ARNm évalués par qPCR dans le tissu adipeux brun (C) et le tissu adipeux blanc (D) de souris mâles VMN-*CB₁*-WT et VMN-*CB₁*-KO maintenues en régime standard. Captation de norépinéphrine augmentée dans le tissu adipeux brun des souris VMN-*CB₁*-KO lors d'une exposition au froid (E) ou après injection de l'agoniste β3 adrénergique CL 316, 223 (F). Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM ; **p* < 0.05 ; ****p* < 0.001 vs VMN-*CB₁*-WT.

Les souris mâles VMN-CB₁-KO ont une meilleure sensibilité à l'insuline en régime standard

Les souris mâles adultes VMN-CB₁-KO ont une baisse significative de la masse grasse. Cette dernière étant connue pour jouer un rôle dans l'homéostasie du glucose et la sensibilité à l'insuline [262], nous avons évalué l'homéostasie du glucose dans notre modèle en réalisant un test de tolérance au glucose intra-péritonéal (ipGTT) et un test de tolérance à l'insuline (ipITT) qui ont révélé une sensibilité au glucose accrue (Fig. 4A et B) ainsi qu'une plus grande sensibilité à l'insuline (Fig. 4C et D) chez les souris VMN-CB₁-KO en comparaison avec leurs WT.

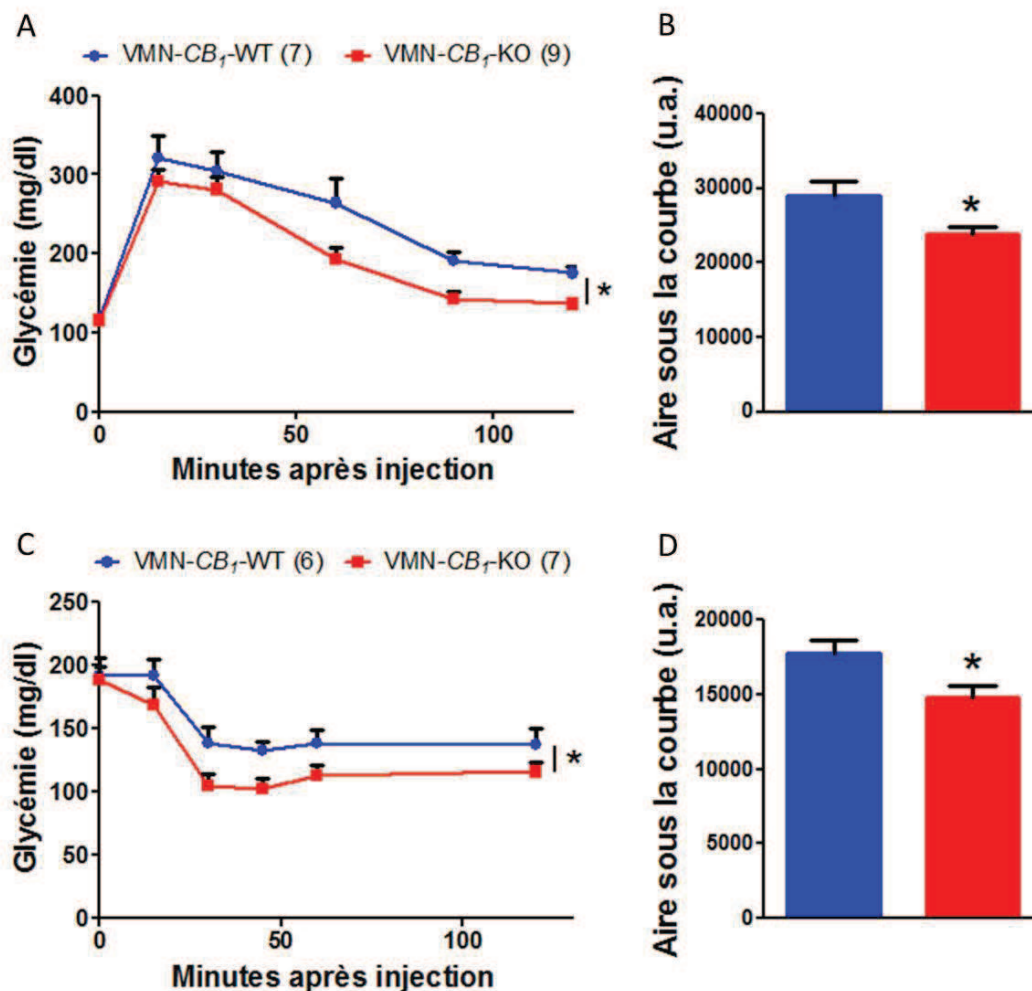


Figure 4. Evolution de la glycémie suite à une injection de 2g/kg de D-glucose lors d'un ipGTT (A) et aire sous la courbe en unités arbitraires (u.a.) (B) chez les souris mâles VMN-CB₁-WT et VMN-CB₁-KO maintenues en régime standard. Evolution de la glycémie suite à une injection de 0,5U/kg d'insuline lors d'un ipITT (C) et aire sous la courbe en unités arbitraires (u.a.) (D) chez les souris mâles VMN-CB₁-WT et VMN-CB₁-KO. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM ; * $p < 0.05$ vs VMN-CB₁-WT.

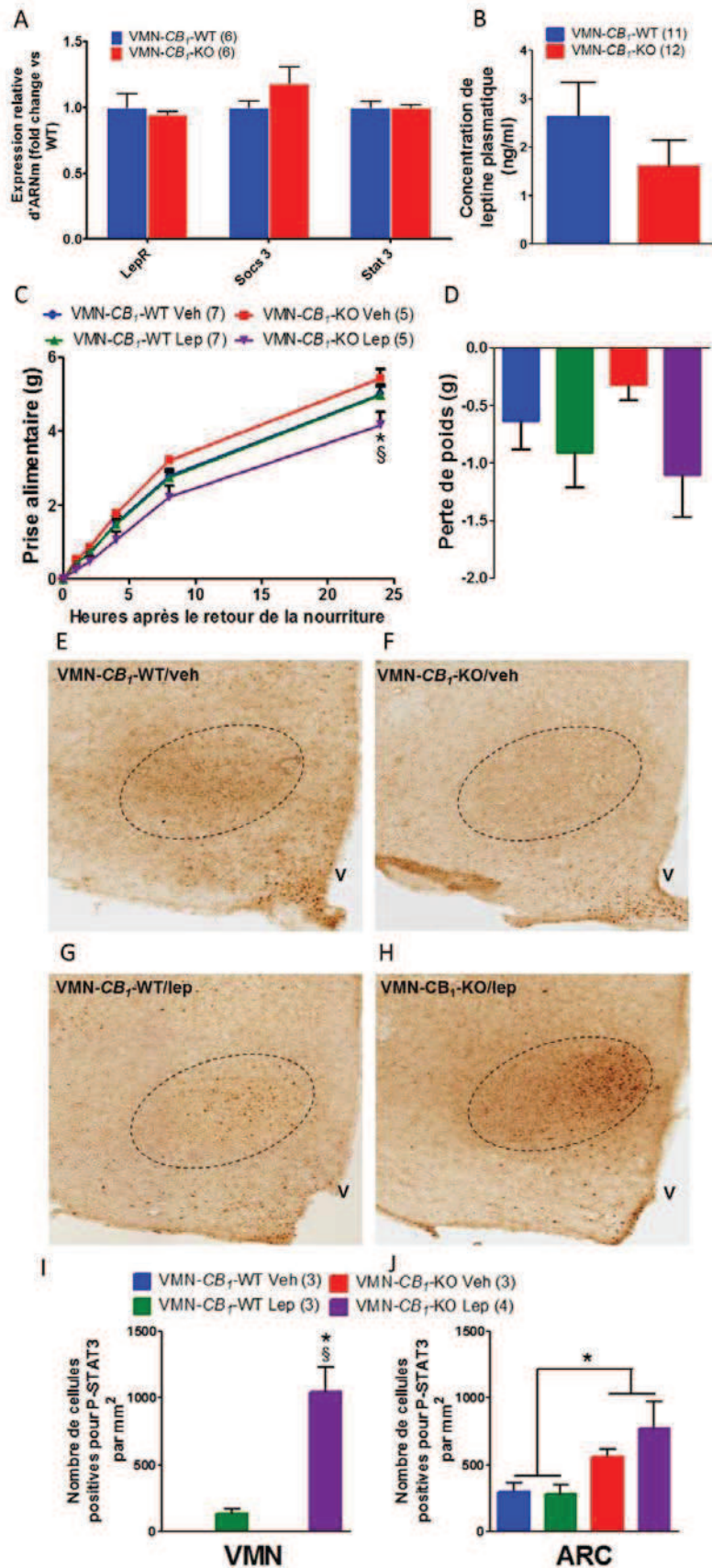


Figure 5. Expression relative d'ARNm du récepteur à la leptine (*LepR*), le suppressor of cytokine signalling 3 (*SOCS3*) et le Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (*STAT3*) évaluée par qPCR dans l'hypothalamus de souris mâles VMN-*CB1*-WT et VMN-*CB1*-KO maintenues en régime standard (A). Concentrations plasmatiques de leptine de souris mâles VMN-*CB1*-WT et VMN-*CB1*-KO maintenues en régime standard (B). Prise alimentaire après injection de véhicule (veh) ou de 2.5mg/kg de leptine (lep) chez les souris mâles VMN-*CB1*-WT et VMN-*CB1*-KO maintenues en régime standard (C). Perte de poids 24 heures après l'injection (D). Images représentatives de l'immunohistochimie (IHC) pour P-STAT3 dans le VMN de souris VMN-*CB1*-WT injectées avec le veh (E) ou la lep (G) et de souris VMN-*CB1*-KO injectées avec le veh (F) ou la lep (H). Quantification du nombre de cellules marquées par l'IHC pour P-STAT3 dans le VMN (I) et l'ARC (J) de souris VMN-*CB1*-WT et VMN-*CB1*-KO. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM ; * $p < 0.05$ vs VMN-*CB1*-WT/veh ; § $p < 0.05$ vs VMN-*CB1*-KO/veh

Les souris VMN-CB₁-KO ont une sensibilité à la leptine accrue

La leptine inhibe la production d'endocannabinoïdes dans l'hypothalamus [184]. De plus, nous avons récemment publié une étude montrant que le CB₁ hypothalamique est nécessaire à l'action anorexigène de la leptine [248]. L'évaluation de l'expression de l'ARNm des LRb, de SOCS3 ou de STAT3 dans l'hypothalamus par qPCR n'a pas révélé de différences significatives entre les deux génotypes en régime standard (Fig. 5A). De plus, les résultats préliminaires des concentrations plasmatiques de leptine n'ont pas révélé de différences significatives entre WT et KO (Fig. 5B). En prenant en compte la diminution de masse grasse caractérisant les souris mâles adultes VMN-CB₁-KO, et dans le même temps le rôle important que la signalisation de la leptine joue dans les neurones SF1 dans la régulation de la balance énergétique [90, 263], nous avons souhaité évaluer la sensibilité à la leptine dans notre modèle mutant. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de prise alimentaire où nous avons injecté une dose non anorexigène chez les WT de leptine (2.5 mg/kg) et mesuré la prise alimentaire sur 24 h. Comme attendu, l'injection de la leptine n'a pas eu d'effet sur les souris VMN-CB₁-WT mais a entraîné une baisse significative de la prise alimentaire sur 24 h chez les souris VMN-CB₁-KO (fig. 5C).

Nous nous sommes ensuite demandé si cette sensibilité augmentée à l'effet anorexigène de la leptine chez les souris VMN-CB₁-KO pouvait être associée à une sensibilité accrue à la leptine spécifiquement dans le VMN. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié les niveaux d'expression de la forme phosphorylée du Signal Transducer And Activator of Transcription 3 (P-STAT3), une cible de la cascade intracellulaire de l'activation du LRb, après injection de la même dose (2.5 mg/kg) non anorexigène de leptine utilisée précédemment pour l'expérience de prise alimentaire. Alors que l'injection du véhicule n'a pas entraîné d'activation de P-STAT3 dans aucun des deux génotypes (Fig. 5E-F et I), l'injection de leptine a induit une faible phosphorylation de STAT3 chez les souris WT (Fig. 5G et I) et une forte activation de P-STAT3 chez les souris VMN-CB₁-KO (Fig. 5H-I), spécifiquement dans la partie dorsomédiale du VMN, où le LRb est exprimé [92]. Il est également intéressant de noter que la phosphorylation de STAT3 dans l'ARC, un site majeur de l'action de la leptine, était également augmentée chez les souris VMN-CB₁-KO, indépendamment du traitement (Fig. 5J).

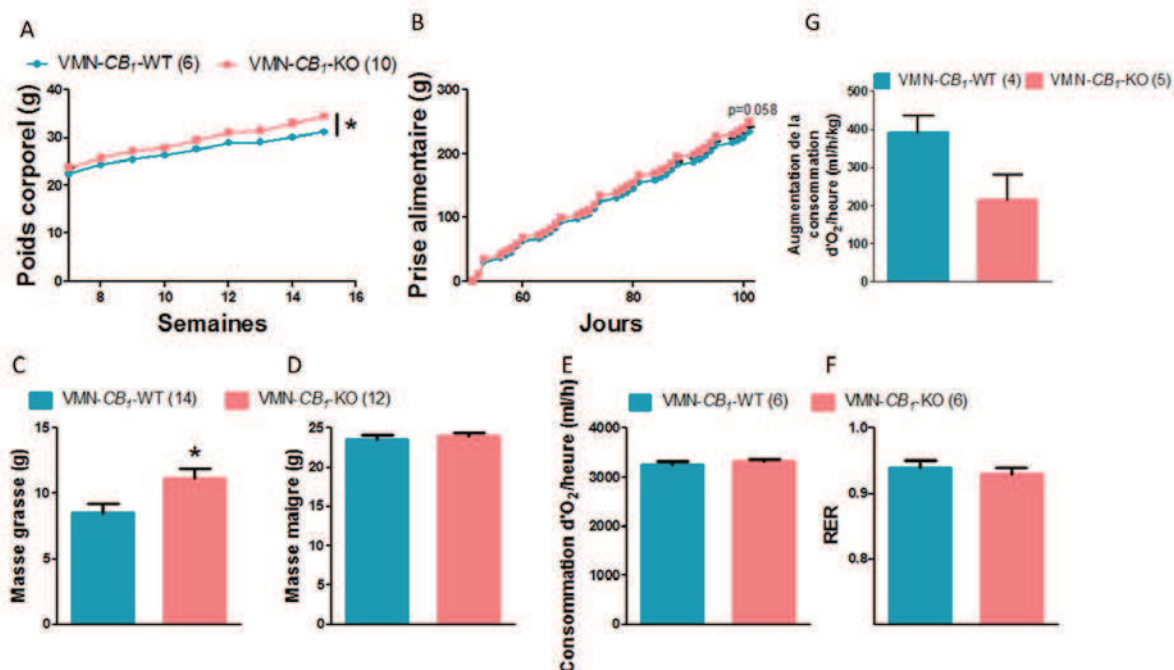


Figure 6. Prise de poids (A), prise alimentaire (B), composition corporelle à 15 semaines (C-D) chez les souris mâles VMN-CB₁-WT et VMN-CB₁-KO maintenues en régime riche en graisses (40% HFD). Consommation d'oxygène (E) et quotient respiratoire (F) chez les souris mâles VMN-CB₁-WT et VMN-CB₁-KO maintenues en régime riche en graisses (40% HFD). Variation de la consommation d'oxygène lors d'un challenge de 48h avec un régime riche en graisses (60% HFD). Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM ; *p < 0.05

Les souris VMN-CB₁-KO sont plus sensibles à l'obésité alimentaire

Il a été précédemment rapporté que la délétion de CB₁, complète ou restreinte aux neurones principaux du prosencéphale et du SNS, protège de l'obésité induite par le régime alimentaire [21, 186]. De plus, les neurones SF1 jouent un rôle dans la réponse à la DIO [88, 90, 94, 110]. En effet, une délétion du LRB dans les neurones SF1 rend les souris plus sensibles à un régime riche en graisses par un problème d'activation de la thermogénèse induite par le régime alimentaire [90]. Afin d'évaluer le rôle spécifique de CB₁ dans les neurones SF1 dans la réponse à l'obésité alimentaire, nous avons soumis nos animaux à un régime riche en graisses (40% HFD). De façon surprenante, les souris VMN-CB₁-KO prennent significativement plus de poids que leurs congénères sauvages (Fig. 6A), et ont une forte tendance ($p=0.058$) à avoir une prise alimentaire augmentée (Fig. 6B). Cette augmentation du poids corporel est reflétée par une augmentation significative de la masse grasse, comme révélé par l'analyse de composition corporelle (Fig. 6C), tandis que la masse maigre ne varie pas entre les 2 génotypes (Fig. 6D). La dépense énergétique, évaluée par calorimétrie indirecte et reflétée par la consommation d'oxygène, n'est pas différente entre WT et KO en régime riche en graisses (Fig. 6E), tout comme le RER (Fig. 6F). Cependant, les souris VMN-CB₁-KO présentent une tendance à une augmentation réduite de la consommation d'oxygène ($p = 0.074$) en réponse à une exposition aigue à un régime riche en graisses (Fig. 6G), suggérant un défaut d'adaptation au changement de composition du régime alimentaire.

De façon intéressante, nous avons pu observer, en parallèle avec l'augmentation de masse grasse, une baisse de l'expression du LepR dans l'hypothalamus des souris VMN-CB₁-KO (Fig. 7A) tandis que l'expression de neuropeptides connus pour moduler la prise alimentaire tels que NPY, AgRP ou POMC n'était pas différente entre les souris VMN-CB₁-KO et leurs congénères sauvages (Fig. 7A). De plus, les résultats préliminaires de qPCR montrent qu'il y a une baisse significative de l'expression de l'ARNm du récepteur β_3 -adrR dans le WAT des souris VMN-CB₁-KO en comparaison avec les WT (Fig. 7B).

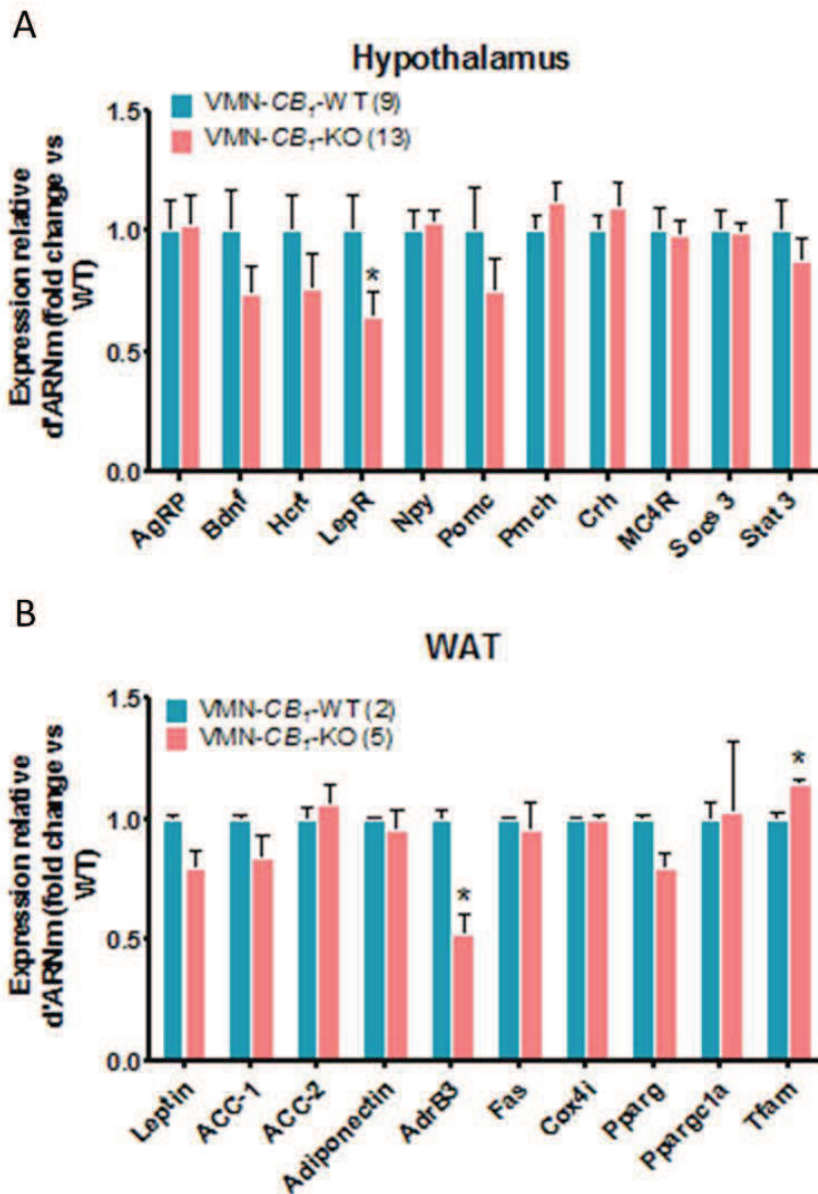


Figure 7. Expression relative d'ARNm évaluée par qPCR dans l'hypothalamus (A) et le tissu adipeux blanc (B) de souris mâles VMN- CB_1 -WT et VMN- CB_1 -KO). Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM ; * $p < 0.05$.

Enfin, les souris mâles VMN- CB_1 -KO maintenues en régime riche en graisses présentent une altération de l'homéostasie périphérique du glucose, comme le suggère l'hyperglycémie observée 15min après l'injection de glucose en comparaison avec leurs congénères sauvages (Fig. 8A-B), une réponse attendue si l'on considère l'augmentation de masse grasse chez ces animaux. Alors qu'aucune différence n'a été observée dans la réponse à l'ipITT entre souris WT et KO (Fig. 8C-D).

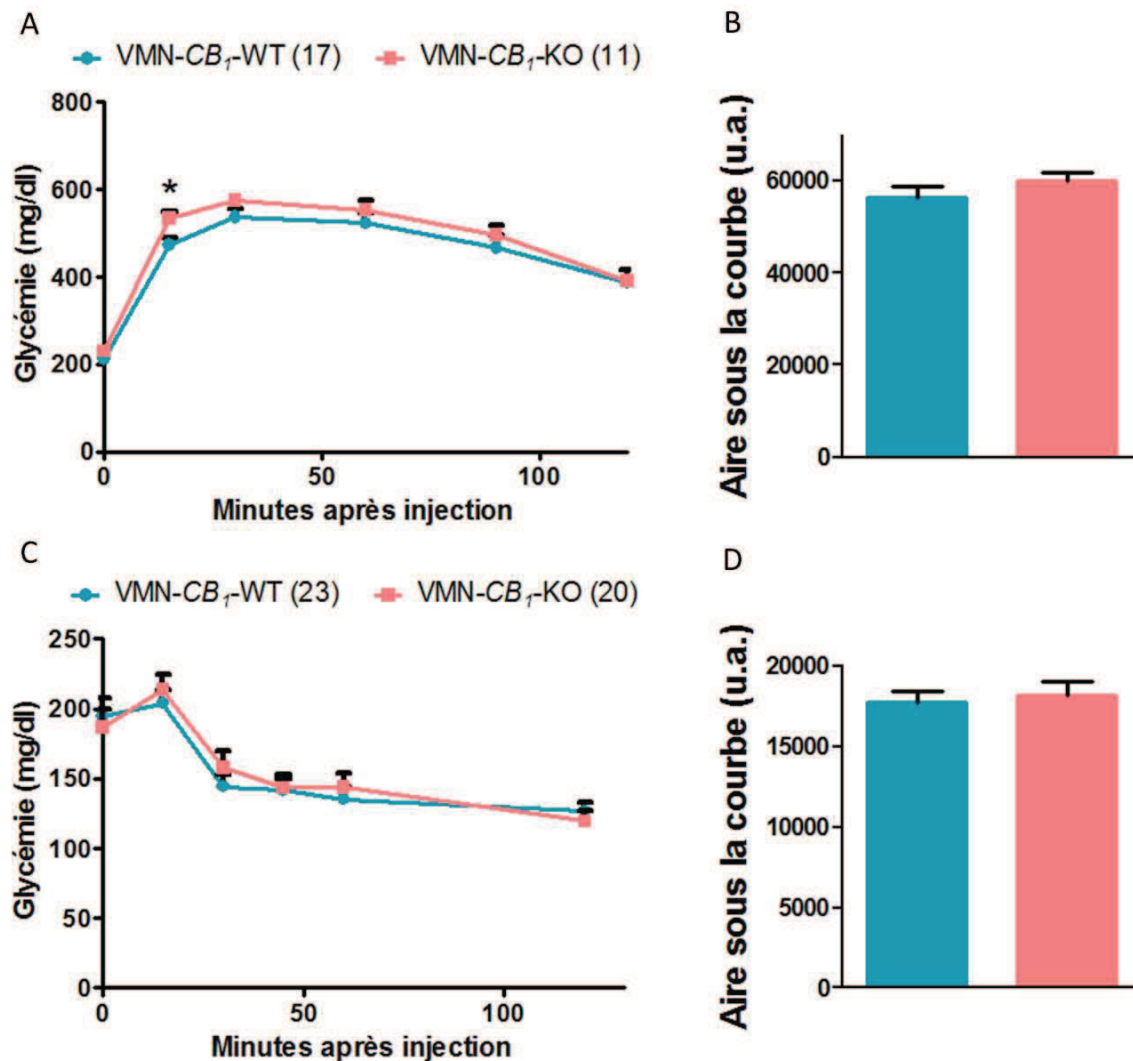


Figure 8. Evolution de la glycémie suite à une injection de 2g/kg de D-glucose lors d'un ipGTT (A) et aire sous la courbe en unités arbitraires (u.a.) (B) chez les souris mâles VMN-CB₁-WT et VMN-CB₁-KO maintenues en régime riche en graisses. Evolution de la glycémie suite à une injection de 0,5U/kg d'insuline lors d'un ipITT (C) et aire sous la courbe en unités arbitraires (u.a.) (D) chez les souris mâles VMN-CB₁-WT et VMN-CB₁-KO maintenues en régime riche en graisses. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM ; **p* < 0.05 vs VMN-CB₁-WT.

Discussion

Le VMN est un acteur important de la régulation de la balance énergétique [16]. Plus spécifiquement, les neurones exprimant SF1, un récepteur nucléaire orphelin qui dans le SNC est exclusivement exprimé dans le VMN [81], jouent un rôle prépondérant dans la prise alimentaire et la dépense énergétique [91]. Dans la présente étude, nous révélons l'importance du récepteur CB₁ exprimé par les neurones SF1 du VMN dans la régulation de la balance énergétique.

Nous avons commencé par évaluer la spécificité de la mutation par différentes approches qui ont montré que la délétion du gène du récepteur CB₁ était bien restreinte au noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMN) dans le SNC (Fig. 1A-F et G). De plus, dans les organes périphériques où SF1 est exprimé (e.g. hypophyse, gonades et surrénales), nous n'avons pas détecté d'altération de l'expression de l'ARNm de CB₁ (Fig. 1H), suggérant une expression de CB₁ intacte dans ces organes. Nous confirmons ainsi les résultats précédents de la spécificité de l'expression de SF1 dans les neurones du VMN [89, 90], et l'intérêt de la lignée SF1-Cre pour la délétion de gènes spécifiquement dans le VMN [90].

En régime standard, la délétion de CB₁ dans les neurones exprimant SF1 n'affecte pas la prise de poids (Fig. 2A), ni la prise alimentaire (Fig. 2B), mais cependant, induit une baisse

significative de la masse grasse, chez les mâles seulement (Fig. 2E). Ces résultats sont partiellement en accord avec notre précédente étude, qui a montré qu'une délétion partielle du gène de CB₁ dans l'hypothalamus de souris (la lignée Hyp-CB₁-KO, chapitre II) réduisait le gain de poids sans affecter la prise alimentaire, et cela grâce à une dépense énergétique augmentée [248].

Les neurones SF1 sont principalement glutamatergiques. Il a été montré que le récepteur CB₁ exprimé dans les neurones glutamatergiques du cerveau est responsable de l'effet oréxigène des (endo)cannabinoïdes [233]. Mais, une fois encore, la délétion de CB₁ dans le VMN n'affecte pas la prise alimentaire basale dans notre modèle. Nous avons cependant pu observer qu'à la suite d'un jeûne de 24h, ces animaux mangent significativement moins que leurs congénères sauvages (Bellochio *et al.*, 2012, en révision. Cf. Annexes) suggérant que la signalisation de CB₁ dans le VMN stimule la prise alimentaire en réponse à un jeûne. De plus, il faut noter qu'une partie des neurones exprimant CB₁ dans le VMN sont GABAergiques [101], et qu'il est supposé que CB₁ sur cette population neuronale médie les effets hypophagiques des (endo)cannabinoïdes [233]. Sachant que les neurones SF1 sont principalement glutamatergiques [264], la lignée VMN-CB₁-KO conserve donc les récepteurs CB₁ sur les neurones GABAergiques dans le VMN, et pourrait donc expliquer les réponses observées dans des conditions de prise alimentaire stimulée par le jeûne.

L'absence de CB₁ dans les neurones SF1 conduit cependant à une baisse de masse grasse à l'âge adulte (Fig. 2E). Cependant, cet effet n'est visible que chez les mâles (Fig. 2G-J), suggérant un rôle différent de CB₁ dans le VMN entre mâles et femelles. Il a été montré que le VMN est un noyau sexuellement dimorphique [265], et que son fonctionnement est sous l'influence des œstrogènes grâce à la présence des récepteurs aux œstrogènes (E α) [266]. Il est donc possible que ce dimorphisme et/ou les œstrogènes induisent des variations de physiologie entre les sexes. Il est important de noter que CB₁ n'est pas délété des neurones du VMN exprimant l'E α car ces derniers sont négatifs pour SF1 [105]. Nous avons donc poursuivi notre évaluation uniquement sur les souris mâles.

Les stocks de graisses sont proportionnels aux concentrations de leptine circulant dans le sang [267]. Cependant, à cause de la grande variabilité entre les individus, la mesure des concentrations plasmatiques de leptine n'a pas révélé de différence significative entre WT et KO (Fig. 5B). Nous comptons remédier à cela en augmentant le nombre d'individus. Il a été mis en évidence depuis une dizaine d'années une relation entre les signalisations de la leptine et des endocannabinoïdes dans l'hypothalamus [184]. En effet, l'injection de leptine chez la souris ou le rat diminue les concentrations d'endocannabinoïdes hypothalamiques pour induire son effet anorexigène [184]. Et nous avons récemment montré que la délétion partielle de CB₁ dans l'hypothalamus abolit l'effet anorexigène de cette hormone adipocytaire [248]. Les souris mâles VMN-CB₁-KO ayant des niveaux de masse grasse inférieurs, nous avons émis l'hypothèse qu'ils puissent être plus sensibles aux effets de la leptine. Grâce à une expérience de prise alimentaire réalisée à la suite d'une injection d'une dose normalement non anorexigène de leptine, nous avons pu observer une baisse significative de la prise alimentaire chez les souris VMN-CB₁-KO uniquement (Fig. 5C). Ces résultats, à l'inverse des résultats obtenus chez la lignée Hyp-CB₁-KO, révèlent une hypersensibilité à la leptine chez les souris VMN-CB₁-KO en régime standard. De plus, les résultats d'IHC évaluant la phosphorylation de STAT3 induite par l'activation du récepteur à la leptine [268], révèlent une sensibilité accrue spécifiquement dans le VMN des souris VMN-CB₁-KO en réponse à la leptine (Fig. 5E-I), et plus précisément dans sa partie dorso-médiale où sont localisés les LRb. De plus, les niveaux de phosphorylation de STAT3 sont augmentés dans l'ARC des souris VMN-CB₁-KO, indépendamment du traitement (Fig. 5J).

La signalisation de la leptine inhibe la production d'endocannabinoïdes, et donc l'activation du récepteur CB₁ [184]. Vu les rôles opposés sur la régulation de la balance énergétique joués par les LRb et CB₁, il est tentant de supposer que l'activation de CB₁ inhibe également l'action de la leptine. En l'absence de CB₁ dans le VMN des souris VMN-CB₁-KO, cette inhibition n'est plus présente et permet une activation augmentée des voies de

signalisation intracellulaires associées à l'activation des LRb. De plus, il est important de noter que la délétion du LRb dans les neurones SF1 induit un phénotype obèse [90], révélant le rôle important joué par la signalisation de la leptine au niveau des neurones SF1 dans la régulation de la balance énergétique. Il semblerait donc qu'une absence de CB₁ dans les neurones SF1 va potentialiser l'effet de la leptine en régime standard.

Sachant que le VMN joue un rôle dans le métabolisme des acides gras dans le WAT [269], et que les animaux ont montré une baisse du quotient respiratoire (Fig. 3B), nous avons évalué, par qPCR, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras. De façon intéressante, nous avons observé une augmentation par deux de l'expression du récepteur β_3 adénergique (β_3 -AdrR) dans le WAT des souris VMN-CB₁-KO (Fig. 3D), suggérant une stimulation du WAT dépendante du SNS augmentée chez ces animaux. L'activation des récepteurs β_3 adénergique stimule la phosphorylation d'AMPK (protéine kinase activée par l'AMP), qui est une enzyme fondamentale dans la régulation de l'énergie cellulaire [270]. L'AMPK va phosphoryler et inhiber l'enzyme Acétyl CoA-Carboxylase 2 (ACC-2), réduisant ainsi les concentrations de malonyl-coA, et conduisant à une augmentation de l'oxydation des acides gras [271]. L'augmentation de l'expression du β_3 -AdrR était associée à une augmentation par 3 de l'expression de l'ARNm d'ACC-2 (Fig. 3D). Ce résultat est surprenant lorsque l'on sait qu'ACC-2 inhibe l'oxydation des acides gras et qu'une délétion d'ACC-2 chez la souris augmente l'oxydation des acides gras [272]. Mais, en l'absence de données concernant la quantité d'AMPK phosphorylée dans ce tissu, ou de la phosphorylation d'ACC-2, il est difficile de tirer des conclusions sur l'effet de cette expression augmentée d'ACC-2. Cependant, cette augmentation pourrait être un mécanisme compensatoire si l'activité enzymatique de l'ACC-2 est réduite. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour permettre de préciser les altérations de l'activité des enzymes connus pour réguler l'oxydation des acides gras.

L'analyse de la consommation d'oxygène (reflétant la dépense énergétique des animaux) en régime standard n'a pas révélé de différences significatives entre les souris VMN-CB₁-KO et leurs congénères sauvages (Fig. 3A). Cependant, l'analyse de l'expression des gènes dans le BAT, un des principaux tissus thermogéniques des mammifères [260], a révélé une légère augmentation de l'expression de l'ARNm de la cyclooxygénase IV (Cox IV), le dernier complexe enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale. De plus, elle a montré une augmentation par deux de l'ARNm du peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 α (PGC-1 α). Ce gène est critique dans la régulation du métabolisme énergétique cellulaire [273] et suppose donc une activité mitochondriale augmentée au niveau du BAT des souris VMN-CB₁-KO en régime standard. En accord avec ces résultats, nous avons observé une augmentation significative de l'absorption de norépinephrine dans le BAT des souris VMN-CB₁-KO lors d'une exposition au froid (Fig. 3E) ou suite à l'injection d'un agoniste des β_3 -AdrR (Fig. 3F). Pris ensemble, ces résultats montrent une augmentation de l'activité au niveau du BAT chez les souris VMN-CB₁-KO en régime standard, un effet médié par le SNS.

En accord avec la masse grasse réduite en régime standard chez les souris VMN-CB₁-KO, elles possèdent une sensibilité accrue au glucose (Fig. 4A-B) et à l'insuline (Fig. 4C-D). Il est intéressant de noter que l'injection de leptine dans le VMN stimule l'absorption de glucose dans le BAT et les muscles [99]. Nos souris VMN-CB₁-KO en régime standard sont plus sensibles à l'action anorexigène de la leptine, un effet associé à une activation spécifique de la signalisation de la leptine dans le VMN. Donc, cela pourrait également participer à la meilleure homéostasie du glucose observée chez les souris VMN-CB₁-KO en régime standard.

Il a été précédemment montré qu'une délétion complète de CB₁ chez la souris réduit la prise alimentaire et la prise de poids [186]. De plus, une délétion de CB₁ dans les neurones principaux du prosencéphale et une partie des neurones du SNS induit un phénotype résistant à l'obésité [21]. Nous avons donc souhaité vérifier si la délétion de CB₁ restreinte aux neurones du VMN avait un effet similaire. De façon surprenante, lorsque les souris mâles VMN-CB₁-KO sont soumises à un régime enrichi en graisses, elles prennent significativement

plus de poids que leurs congénères sauvages (Fig. 6A), reflétant une augmentation de masse grasse (Fig. 6D). Cette prise de poids augmentée est associée à une forte tendance à une prise alimentaire plus importante chez ces animaux (Fig. 6B), ainsi qu'une baisse significative de l'expression de l'ARNm du récepteur à la leptine dans l'hypothalamus (Fig. 7A). Ces résultats moléculaires sont en accord avec les résultats phénotypiques car une baisse de l'expression du LRb dans le VMN va induire une prise de poids et une augmentation de masse grasse plus importantes [90, 263]. Dans notre modèle, l'augmentation de masse grasse pourrait être en partie due à un défaut d'adaptation du système adrénérgique car, alors que l'on observait une augmentation de l'expression du β 3-AdrR dans le WAT des souris VMN- CB_1 -KO en régime standard, l'inverse se produit en régime riche en graisse, à savoir l'expression de l'ARNm du β 3-AdrR dans le WAT est réduite de 50% en comparaison avec les WT (Fig. 7B). Cependant, ces résultats sont préliminaires et nécessitent d'être confirmés en augmentant le nombre d'échantillons analysés. La dépense énergétique, ainsi que le quotient respiratoire des animaux n'étaient pas différents entre les deux génotypes (Fig. 6E-F) lorsque les animaux sont maintenus en régime riche en graisse (40% HFD). Afin d'évaluer si nos animaux s'adaptent au changement de régime alimentaire en augmentant leur dépense énergétique par thermogénèse, nous avons réalisé un challenge avec un régime très riche en graisses (60% HFD) et mesurés la consommation d'oxygène. Il est intéressant de remarquer que les souris VMN- CB_1 -KO ont une forte tendance ($p = 0.074$) à moins augmenter leur consommation d'oxygène que leurs congénères WT lorsqu'elles sont soumises de façon aigue à un régime riche en graisses (Fig. 6G), suggérant un problème d'adaptation à un changement de régime alimentaire (régime standard vs HFD).

Enfin, en plus de leur poids corporel et leur masse grasse augmentés en régime gras, les souris VMN CB_1 KO commencent à présenter des signes d'altérations de l'homéostasie du glucose, comme le suggère le pic hyperglycémique observé durant le GTT (Fig. 8A).

Ces résultats pris ensemble suggèrent que CB_1 exprimé dans les neurones du VMN joue un rôle dans le stockage des graisses lors d'un régime standard, mais permettent une résistance à l'obésité alimentaire lors de l'ingestion d'un régime gras. En effet, alors que nos souris VMN- CB_1 -KO prennent significativement moins de masse grasse en régime standard, c'est l'opposé qui se passe lors de l'exposition à un régime riche en graisses. Il est enfin intéressant de noter que c'est la première lignée mutante de CB_1 qui est plus sensible à l'obésité alimentaire. Nous révélons ainsi un rôle inédit de CB_1 , qui semble avoir, au niveau des neurones SF1 du VMN, une fonction différente selon le régime alimentaire. Cet effet pourrait dépendre du lien entre CB_1 et LRb au niveau du VMN car l'expression des LRb par les neurones SF1 est un acteur important des effets de la leptine sur la balance énergétique [90, 263], et nos souris mâles VMN- CB_1 -KO présentent des altérations dans la signalisation à la leptine. En effet, alors qu'en régime standard, la délétion de CB_1 dans les neurones SF1 augmente la sensibilité à la leptine (Fig. 5), l'exposition chronique à un régime riche en graisses va réduire les niveaux d'expression du LRb dans l'hypothalamus des souris VMN- CB_1 -KO (Fig. 7A).

Ces effets semblent médiés par une modulation du SNS dépendante du régime alimentaire, mais nos résultats nécessitent d'être confirmés par une étude plus approfondie de l'oxydation des acides gras au niveau du WAT en régime standard, notamment par l'analyse de la phosphorylation d'enzymes telles que l'AMPK et l'ACC, et par une étude plus approfondie de l'activité du SNS en HFD telles que des études de PET et de calorimétrie indirecte à différentes températures ambiantes.

Chapitre IV : Le rôle du récepteur CB₁ dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus dans la régulation de la balance énergétique et l'homéostasie du glucose chez la souris.

Résumé

Le système endocannabinoïde (SEC) a émergé ces dernières années comme un acteur majeur de la régulation de la balance énergétique. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN), en parallèle avec son rôle dans l'activation de nombreux axes hormonaux, est un acteur crucial de la régulation de la balance énergétique en modulant à la fois la prise alimentaire et la dépense énergétique. Bien que la signalisation des récepteurs CB₁ soit également impliquée dans ces deux mécanismes au niveau du PVN, une compréhension totale de son rôle dans ce noyau est toujours manquante. Afin d'étudier cette question, nous avons généré une lignée de souris mutantes possédant une délétion du gène du récepteur CB₁ dans le PVN, et nous avons étudié l'impact de cette manipulation sur la régulation de la balance énergétique.

La délétion du gène du récepteur CB₁ a permis la génération de souris PVN-CB₁-KO, qui présentent une absence complète d'ARNm de CB₁ dans le PVN. Les souris PVN-CB₁-KO soumises à un régime standard, normocalorique, présentent une prise de poids inférieure à leurs congénères sauvages mais sans altération significative de la prise alimentaire. Lorsque ces souris sont soumises à un régime riche en graisses, elles prennent significativement moins de poids, principalement dû à une masse grasse plus faible, qui est le résultat d'une dépense énergétique significativement augmentée. L'augmentation de la dépense énergétique est associée à des niveaux plus élevés d'ARNm du récepteur β -adrénergique dans le tissu adipeux brun, ainsi qu'une expression augmentée de l'ARNm de marqueurs de l'activité mitochondriale tels qu'UCP-1, COX IV et Tfam. En parallèle, dans le tissu adipeux blanc, ces souris présentent des niveaux d'expression de CPT-1 β augmentés, ainsi qu'une baisse de l'expression de l'ARNm de l'Acétyl-CoA Carboxylase 1 (ACC-1), suggérant une oxydation des acides gras augmentée. Enfin, grâce à leur masse grasse diminuée lors d'un régime riche en graisses, les souris PVN-CB₁-KO sont plus sensibles à l'insuline lorsqu'on les compare à leurs congénères WT. Ces résultats pris ensemble suggèrent que la signalisation du récepteur CB₁ dans le PVN est un acteur clé de la balance énergétique, et qu'il agit principalement sur la dépense énergétique.

Introduction

Le système endocannabinoïde (SEC) est considéré, depuis quelques années, comme un acteur clé de la régulation de la balance énergétique [23] et de l'homéostasie du glucose [247]. L'activation du récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB₁) est généralement considéré comme un puissant signal oréxigène. Sa présence à tous les niveaux de la régulation de la balance énergétique en fait un acteur de choix dans cette régulation. Une délétion complète de CB₁ chez la souris réduit la prise alimentaire et la prise de poids [186]. De plus, une délétion de CB₁ dans les neurones principaux du prosencéphale et du système nerveux sympathique (SNS) induit un phénotype résistant à l'obésité [21]. Récemment, nous avons publié une étude où la délétion de CB₁ restreinte à l'hypothalamus induit également une prise de poids réduite, associée à une dépense énergétique augmentée [248]. Cependant, les noyaux hypothalamiques et/ou les populations neuronales spécifiques responsables de ces effets n'ont pas été précisément définies. Le noyau paraventriculaire (PVN) est un des principaux noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique [274-276], et les neurones du PVN expriment les récepteurs CB₁ [103, 186], où ils co-localisent avec différents neuropeptides impliqués dans la régulation de la balance énergétique, tels que la Cortico-Releasing Hormone (CRH) et le Cocaine and Amphetamine Transcript (CART) [186]. Le PVN possède de nombreuses afférences provenant de l'ARC, du VMN, du LH, du noyau du tractus solitaire (NTS) et du nerf vague [112], lui permettant d'être informé constamment du statut énergétique de l'organisme en intégrant les différents signaux périphériques (hormonaux, mécaniques, nutriments). Et grâce à ses deux populations neuronales, divisées en neurones magnocellulaires et parvocellulaires, sécrétant de nombreuses hormones et faisant contact avec l'hypophyse et le système porte hypophysaire, il peut moduler de nombreux axes hormonaux. De plus, ses projections vers le tronc cérébral et la moelle épinière lui permettent

un contrôle fin des réponses périphériques, incluant la régulation de la dépense énergétique via le SNS et la modulation de la thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun (BAT) [260, 274].

Le PVN est un régulateur majeur de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA) et des variations hormonales en réponse au stress. Grâce à ses neurones parvocellulaires neuroendocrines qui libèrent la CRH, ils stimulent la production d'ACTH au niveau de l'hypophyse, qui est ensuite libérée dans la circulation sanguine pour stimuler la production et la libération des glucocorticoïdes au niveau des surrénales [277]. Un mécanisme de rétrocontrôle s'opère au niveau du PVN où les glucocorticoïdes inhibent la libération de CRH [277]. Le SEC est impliqué dans ce rétrocontrôle [121]. En effet, les glucocorticoïdes stimulent la libération d'endocannabinoïdes par les neurones parvocellulaires, qui conduit à l'inhibition de la libération pré-synaptique de glutamate via l'activation des récepteurs CB_1 pré-synaptiques, aboutissant finalement à l'inhibition des neurones parvocellulaires [119-121]. Il a également été montré que la libération d'endocannabinoïdes stimulée par les glucocorticoïdes peut être inhibée par la leptine [122]. Cependant, le rôle de la signalisation de CB_1 dans la régulation de la balance énergétique n'est pas clair. En effet, les expériences de jeûne/prise alimentaire chez le rongeur n'ont pas permis de révéler une modification de l'expression de l'ARNm de CB_1 dans le PVN, et ce, même en l'absence de la forme longue du récepteur à la leptine (LRb) [102]. L'administration intra-péritonéale de rimonabant, un antagoniste de CB_1 , ne modifie pas l'expression de c-fos dans les neurones du PVN à 60, 120 ou 240 minutes après l'injection [124] alors que l'administration de WIN55,212-2, un agoniste de CB_1 , augmente l'immunoréactivité de c-fos dans le PVN [124]. Néanmoins, l'administration orale chronique de rimonabant chez le rat augmente les concentrations de corticostérone basales et la réactivité de l'axe HPA en réponse à un jeûne tout en améliorant le poids et la glycémie [278]. Et.

Afin d'évaluer spécifiquement le rôle du récepteur CB_1 dans le PVN dans la régulation de la balance énergétique, nous avons généré, en utilisant le système Cre/loxP, une lignée de souris mutantes possédant une délétion de CB_1 restreinte aux neurones exprimant le Single minded gene (*Sim1*) que nous avons ensuite caractérisés. Dans le SNC, ce gène est exclusivement exprimé dans le PVN, et dans une petite partie de l'amygdale [126-129]. *Sim1* est impliqué dans la régulation de la balance énergétique car la diminution de son expression spécifiquement dans le PVN augmente la prise alimentaire [135] tandis qu'une surexpression de *Sim1* restreinte au PVN diminue la prise alimentaire [135], ce qui protège partiellement ces animaux de l'obésité alimentaire [136].

Matériels et méthodes

Animaux

Pour la génération des souris $CB_1^{f/f \text{ sim-Cre}}$ (PVN- CB_1 -KO), des animaux de la lignée Sim-Cre (obtenue auprès des laboratoires Jackson, Bar Harbor, ME) ont été croisés avec des souris CB_1 -flox homozygotes ($CB_1^{f/f}$) [236] grâce à un protocole de rétrocroisement en trois étapes, comme décrit précédemment [104, 237, 251]. Brièvement, des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Sim* (Sim-Cre) ont été croisées avec des souris $CB_1^{f/f}$ pour obtenir des souris hétérozygotes CB_1 -flox exprimant la Cre-recombinase ($CB_1^{Cre;f/+}$; étape 1). Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris $CB_1^{f/f}$ afin d'obtenir des souris homozygotes $CB_1^{Cre;f/f}$ (étape 2). Enfin, les mâles de l'étape 2 ont été croisés avec des femelles $CB_1^{f/f}$ pour générer les animaux expérimentaux (étape 3). Le génotypage du locus du gène *CB1* « floxé » a été réalisé par PCR sur un prélèvement d'un petit bout de la queue comme précédemment décrit [279] à l'aide des primers suivants : forward : ' 5 -GCTGTCTCTGGTCCTCTTAAA; reverse: 5'-CTCCTGTATGCCATAGCTCTT [251].

Les souris (mâles et femelles) âgées de 6 à 7 semaines étaient hébergées en cages individuelles dans une animalerie thermo-régulée à $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, avec un cycle jour/nuit 12h/12h (début de la phase diurne à 1 a.m.). Les animaux avaient un accès *ad libitum* à l'eau

et à un régime standard pour rongeurs (Standard Rodent Diet A03, 3.2 Kcal/g, SAFE, France) sauf indication contraire. Pour les expériences chroniques en régime riche en graisses, les animaux étaient exposés à un régime enrichi en graisses à 60% (60% HFD, Research Diets, 5.24 Kcal/g, New Brunswick, NJ). Le poids corporel des animaux ainsi que leur prise de nourriture étaient mesurées 5 fois par semaine.

Toutes les expériences ont été menées dans le strict respect des recommandations de l'union européenne (2010/63/EU) et approuvées par le ministère français de l'agriculture et de la pêche (autorisation expérimentation animale n° 3309004) et par le comité éthique local. A la fin des expériences comportementales, les souris furent tuées par dislocation cervicale ou anesthésiées et perfusées, et les tissus prélevés pour une analyse ultérieure. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est détaillé dans les légendes des figures.

Analyse de la composition corporelle

La composition corporelle des animaux a été évaluée par résonance magnétique nucléaire (EchoMRI, Houston, TX) à 7 et 15 semaines d'âge.

Tests de tolérance au glucose et à l'insuline

Pour les tests de tolérance intra-péritonéaux au glucose (ipGTT) et à l'insuline (ipITT), les souris ont été pesées puis privées de nourriture durant les 16 heures précédant le début des expériences. Une heure avant l'injection de glucose (2 g/kg D-Glucose, Sigma Aldrich, St Louis, MO) ou d'insuline (0,5 U/kg, Umulin, Lilly, France) dans du PBS, les souris ont été pesées pour évaluer la perte de poids durant le jeûne, puis ont été transférées dans la pièce d'expérimentation pour habituation. Juste avant l'injection, le niveau de glucose basal a été évalué en coupant le bout de la queue et en recueillant une goutte de sang afin de mesurer les niveaux de glucose grâce à un glucomètre (ONETOUCH, Vita, France). Un échantillon de sang a également été collecté dans un tube tapissé d'acide Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA), puis centrifugé 20min, 2000 rpm à 4°C; le plasma a ensuite été prélevé puis congelé à -80°C jusqu'à la mesure de l'insuline. La glycémie a ensuite été mesurée grâce au glucomètre à 15, 30, 60, 90 et 120 min pour l'ipGTT, et à 15, 30, 45, 60 et 120 min pour l'ipITT.

L'Homeostasis Model Assessment (HOMA), un indicateur de la résistance à l'insuline, a été calculé selon la formule suivante : $HOMA = \frac{\text{Concentration plasmatique de glucose en mmol/L} \times \text{Concentration plasmatique d'insuline en mU/L}}{22.5}$.

Calorimétrie indirecte

Les souris ont été hébergées individuellement dans des cages métaboliques (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany) dans lesquelles la prise de nourriture et de boisson, l'activité locomotrice, et les échanges gazeux peuvent être mesurés et enregistrés. Après 72 h d'acclimatation, la consommation d'O₂ et la production de CO₂ ont été mesurées 2 fois par heure pendant une durée de 48h afin de mesurer les échanges gazeux, le quotient respiratoire (RER), et la dépense énergétique. Les valeurs ont été normalisées en fonction du poids des animaux. Les prises alimentaire et de boisson ont été mesurées de façon continue au cours de l'expérience. Simultanément, l'activité locomotrice dans la cage était déterminée en utilisant un système de faisceaux lumineux infra-rouges tridimensionnel. L'activité locomotrice totale a ensuite été exprimée en nombre de croisements de faisceau durant ces 48h.

Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel

Les tissus ont été homogénéisés dans du Trizol (Tri Reagent, Molecular Research Center, Inc., Fermentas, Cincinnati, OH). L'ARN a été isolé des tissus en utilisant un protocole standard chloroforme-isopropanol, puis traités et analysés en adaptant des méthodes publiées [255]. Brièvement, l'ADNc est synthétisé à partir de 2 µg d'ARN total à l'aide de la RevertAidTM Premium Reverse Transcriptase (Fermentas, Cincinnati, OH), de primers oligo-dT et d'un Random Hexamer Primer (Fermentas, Cincinnati, OH). La PCR quantitative en

temps réel (qPCR) est ensuite réalisée grâce à un LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les réactions de qPCR ont été réalisées en duplicats pour chaque échantillon en utilisant des primers spécifiques de chaque gène (Table 1), 4 ng d'ADNc et du LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Meylan, France) dans un volume final de 10 µl. Les valeurs de C_p de chaque gène sont normalisées avec les valeurs de 2 gènes de référence [BAT : la protéine contenant la vasoline (Vcp) et le facteur d'élongation de la translation (Eef1a1) ; WAT : Eef1a1 et la protéine de liaison aux octamères contenant un domaine non-POU (Nono)] en utilisant l'algorithme Genorm [256]. Les données de PCR sont ensuite exportées dans le Gene Expression Analysis Software Environment (GEASE développé par Alexandre Brochard pour l'Inserm U862, Bordeaux, France) pour être analysés. Le niveau d'expression relative est enfin calculé en utilisant la méthode comparative des $2^{-\Delta\Delta CT}$ [257].

Table 1. Liste des couples de primers (Forward et Reverse) utilisés pour l'étude de l'expression des gènes par qPCR dans le BAT et le WAT des souris PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO.

Gène	Forward	Reverse
ACC-1	ATTGACCCAGACTGGCTTGAA	GTGTGAAGGCTGCTTTGTGAAC
ACC-2	TCTGTGCTGCCCTTCTTG	TGGGCTTTCCTCCACATCA
Adiponectine	CGTTCTTTCACCTACGACCAGTA	GATGGAGGAGCACAGAGCCA
CoxIV	CCGACTGGAGCAGCCTTTC	TCGGCGAAGCTCTCGTAAA
CPT-1 β	AGCCTCTCCACCAGCCAGAT	CAGATGATTGGGATACTGTTTTGG
Eef1a1	TGAACCATCCAGGCCAAATC	GCATGCTATGTGGGCTGTGT
Fas	GTTGGAAGTCAGCTATGAAGCAATT	AGACGCCAGTGTTCTGTTCT
Nono	CTGTCTGGTGCATTCTGAACTAT	AGCTCTGAGTTCATTTCCCATG
PGC-1 α	CAACCATACCAGAACAAGAACAA	AAGCTGACACCCGTGAATAAAC
Récepteur β_3 adrénergique	CGACATGTTCTCCACAAATCA	TGGATTCTGCTCTCAAATAACC
Tfam	TCGGAGACCTACCTCAGATTAAGTG	AGAGGAGGGAGGAAGCCTGAT
UCP-1	AAAAAGAGCTGATGAAGTCCAGACA	TCAGTATCTTCTCCAAGTTGCT
Vcp	TGGCCGTCTAGATCAGCTCAT	TTTCGCAGATTGGCTTTTAGG

ACC-1 : AcétylCoA-Carboxylase 1 ; ACC-2 : AcétylCoA-Carboxylase 2 ; CoxIV : Cyclo-oxygénase IV ; CPT-1 β : Carnitine palmitoyltransférase 1 beta ; Eef1a1 : Facteur d'élongation de la translation ; Fas : Fatty acid synthase ; Nono : Protéine de liaison aux octamères contenant un domaine non-POU ; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α ; Tfam : Transcription factor A, mitochondrial ; UCP-1 : Uncoupling Chain Protein 1 ; Vcp : protéine contenant la vasoline

Double hybridation in situ fluorescente

Des souris PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO (2 par génotype) ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Leurs cerveaux ont été isolés, rapidement congelés dans de la carboglace puis stockés à -80° C jusqu'à la coupe, effectuée à l'aide d'un cryostat (14 µm, Microm HM 500M, Microm Microtech, Francheville, France). Des ribosondes marquées au DIG pour le récepteur VGluT2, ainsi que des ribosondes marquées au FITC pour CB_1 ont été préparées comme précédemment décrit [237, 248]. L'amplification du signal a été réalisée avec le système TSATM Plus System Cyanine 3/Fluorescein (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Les tampons de blocage TNB et de lavage TNT ont été préparés en suivant les recommandations du fournisseur. Les coupes ont été analysées par microscopie à épifluorescence et un grossissement de 20X (Leica, Nanterre, France).

Quantification des hormones et des métabolites

L'insuline plasmatique a été mesurée en suivant les recommandations du fournisseur pour le kit ELISA de souris (Mercodia, Uppsala, Sweden). La corticostérone plasmatique a été mesurée juste avant la phase nocturne en suivant les recommandations du fournisseur pour le kit ELISA de souris (AbCam, Paris, France). Puis la densité optique a été lue avec un lecteur de plaque (Microplate Reader Model 680, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France).

Analyse statistique

Tous les résultats sont représentés sous forme de moyennes \pm SEM. Les données ont été analysées en utilisant Statistica 9 (StatSoft). Une ANOVA à mesure répétée a été réalisée pour les études chroniques, suivies par les tests post-hocs appropriés. Dans les autres cas, une ANOVA à un facteur a été utilisée. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour un $p < 0.05$.

Resultats

Génération et caractérisation des souris PVN-CB₁-KO

Pour générer les souris mutantes conditionnelles avec une délétion spécifique de CB₁ dans les neurones Sim du PVN, un gène critique dans le développement des lignées endocrines du PVN [128], des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *sim1* (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) ont été croisées avec des souris CB₁^{ff} [104] en suivant le protocole de croisement précédemment décrit [279]. Cela a abouti à la génération des souris expérimentales et leurs congénères sauvages CB₁^{Sim-Cre;ff} et CB₁^{ff}, nommées PVN-CB₁-KO et PVN-CB₁-WT, respectivement. Ces animaux sont caractérisés par une absence d'expression de l'ARNm de CB₁ dans le PVN (Fig. 1A-F) [279], mais également par une délétion partielle dans l'amygdale [279], sans altération dans les autres régions cérébrales [279].

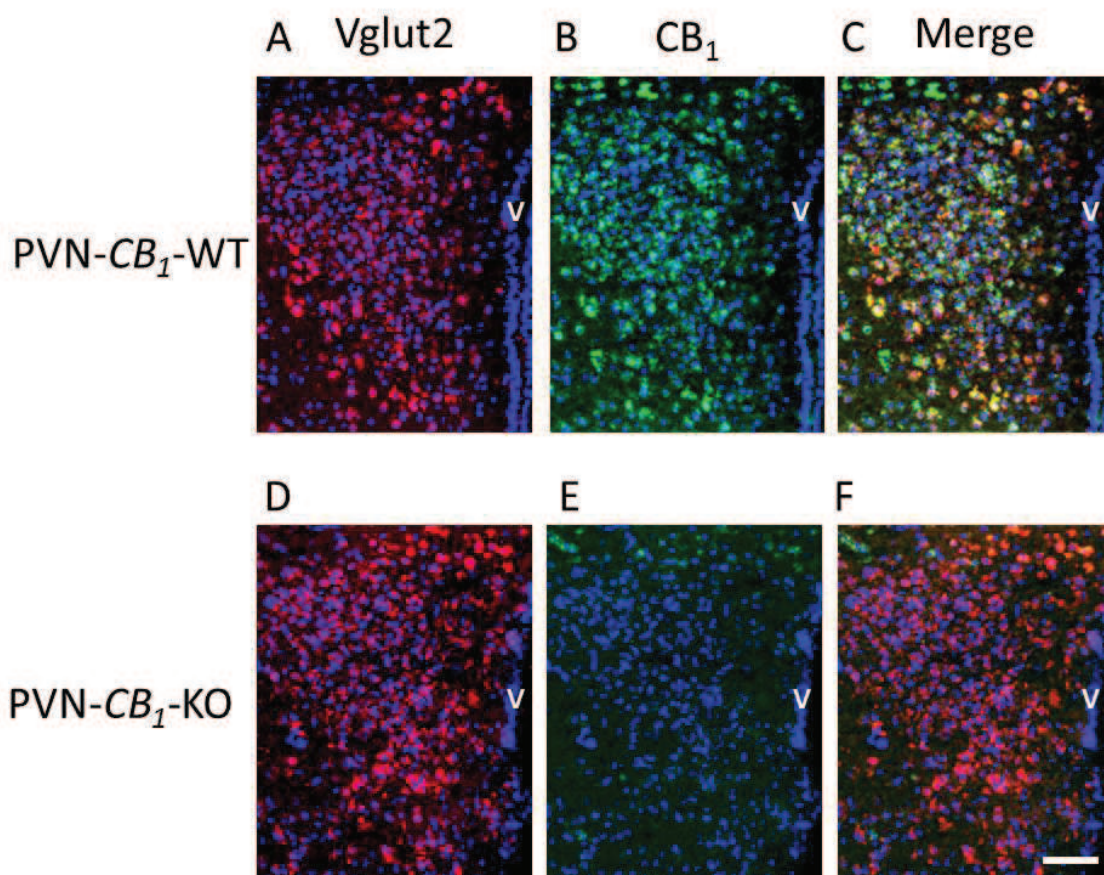


Figure 1. Images représentatives prises au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus provenant d'études d'hybridation *in situ* fluorescente montrant l'expression de l'ARNm de Vglut2 (rouge) et CB₁ (vert) chez des souris PVN-CB₁-WT (A-C) et PVN-CB₁-KO (D-F)(2 souris/génotype). n=2 souris/génotype).

La délétion de CB₁ exprimé dans les neurones Sim réduit la prise de poids chez les mâles en régime standard

Afin de déterminer l'importance relative de la signalisation de CB₁ au sein des neurones Sim dans la régulation de la balance énergétique, nous avons mesuré l'évolution du poids corporel (BW) et la prise alimentaire chez les souris PVN-CB₁-KO et leurs congénères sauvages. La délétion de CB₁ dans les neurones Sim a entraîné une baisse significative de la prise de poids chez les souris mâles PVN-CB₁-KO (Fig. 2A), mais pas chez les femelles (Fig. 2A). Toutefois, la prise alimentaire n'était pas modifiée entre WT et KO, que ce soit chez les mâles ($p = 0.178$) ou les femelles (Fig. 2B).

La délétion de CB₁ exprimé dans les neurones Sim ne modifie pas la composition corporelle ni la dépense énergétique en régime standard

Afin d'évaluer si cette baisse de poids chez les mâles pouvait provenir d'une différence de composition corporelle, nous avons évalué cette dernière par résonance magnétique nucléaire (RMN). Mais la RMN n'a pas révélé de différence significative entre les souris mâles PVN-CB₁-KO et WT, que ce soit à 7 semaines (Fig. 2C-D), ou à 15 semaines (Fig. 2E-F). De plus, la composition corporelle des femelles ne variait pas entre WT et KO, quel que soit l'âge (Fig. 2C-F). N'ayant pas observé de différences chez les femelles, nous avons ensuite poursuivi notre étude uniquement sur les mâles.

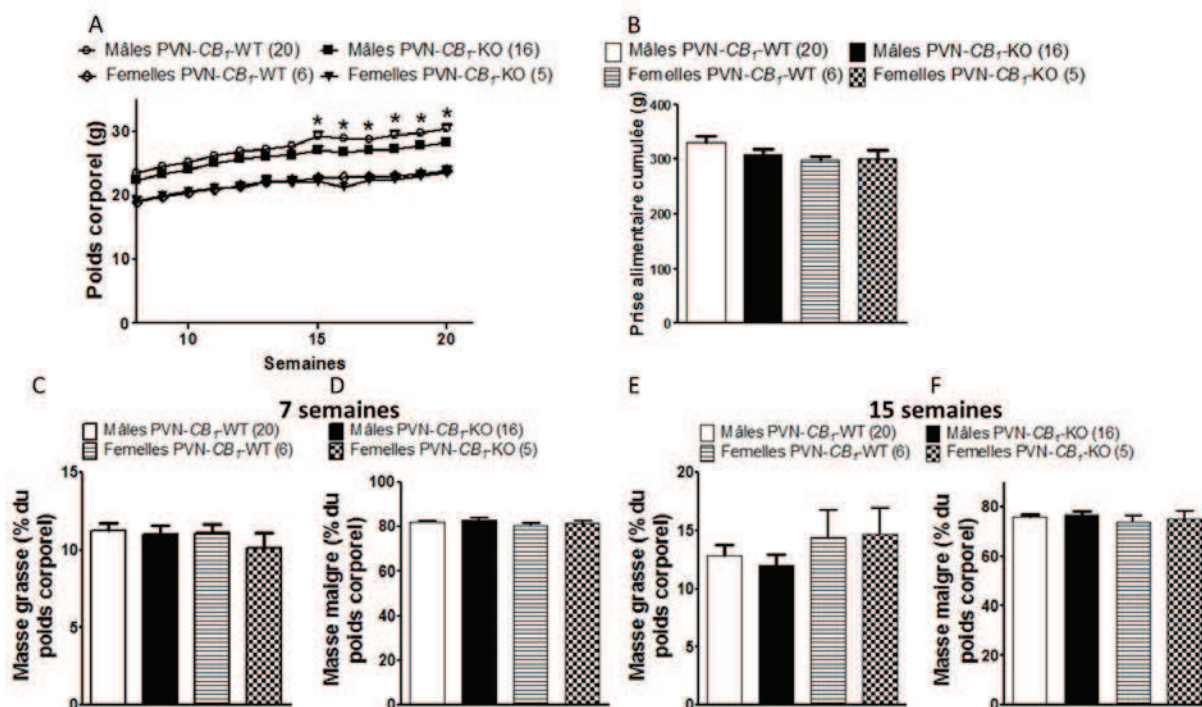


Figure 2. Prise de poids (A) et prise alimentaire (B) chez les souris PVN-CB₁-WT et PVN-CB₁-KO, mâles et femelles, maintenues en régime standard. Analyse de la composition corporelle exprimée en pourcentage de poids corporel représentant la masse grasse (C) et la masse maigre (D) à 7 semaines, et la masse grasse (E) et la masse maigre (F) à 15 semaines chez les souris mâles et femelles PVN-CB₁-WT et PVN-CB₁-KO maintenues en régime standard. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM. * : $p < 0.05$ vs PVN-CB₁-WT.

La diminution de prise de poids chez les souris PVN-CB₁-KO pourrait être due à une augmentation de la dépense énergétique, comme cela a été précédemment rapporté dans d'autres modèles mutants pour CB₁ [21, 186, 248]. L'expérience de calorimétrie indirecte réalisée à 15 semaines d'âge, lorsque les poids des souris PVN-CB₁-KO et leurs WT deviennent statistiquement différents, a montré une légère tendance à l'augmentation de la consommation d'oxygène chez les mâles PVN-CB₁-KO (VO_2 WT=3344.6 \pm 86.64 vs KO=3566.81 \pm 107.71, $p = 0.117$) (Fig. 3A). Le quotient respiratoire n'était pas différent entre WT et KO (Fig. 3B). Et nous n'avons pas observé de différence significative de l'activité locomotrice (Fig. 3C).

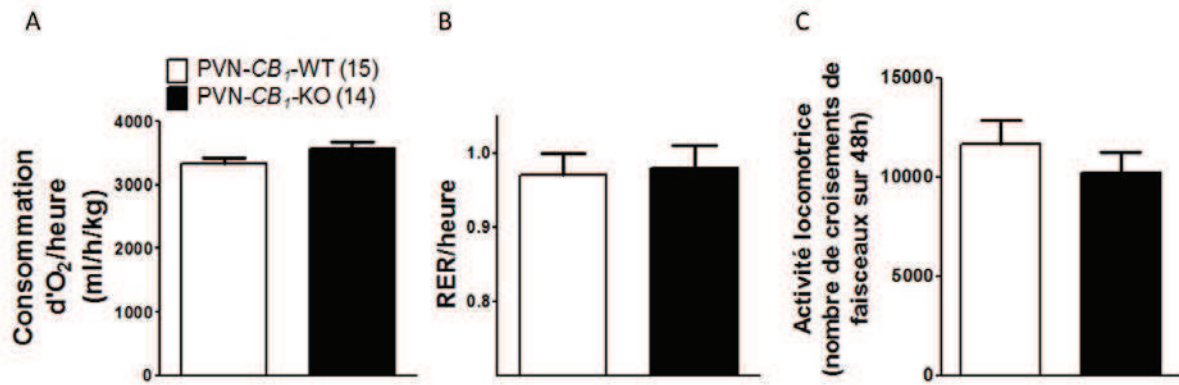


Figure 3. Consommation d'oxygène moyenne par heure (A) et quotient respiratoire (RER) moyen par heure (B) sur 48h et activité locomotrice totale sur 48h (C) chez les souris PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO mâles maintenues en régime standard. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM.

La délétion de CB_1 exprimé dans les neurones Sim ne modifie pas les concentrations basales de corticostérone en régime standard

Le PVN joue un rôle critique dans la régulation de l'axe HPA, et les CB_1 exprimés dans ce noyau jouent un rôle dans la régulation négative de l'axe HPA par les glucocorticoïdes. Donc, les souris CB_1 -KO ont un axe HPA hyper-réactif, avec une élévation du pic de corticostérone au début de la nuit [119]. Nous avons donc souhaité évaluer si nos animaux présentaient une altération de l'axe HPA. La mesure des concentrations de corticostérone plasmatique n'a pas révélé de différences significatives, même si les souris KO semblent présenter des niveaux inférieurs de corticostérone (Corticostérone PVN- CB_1 -WT : 208.67 ± 20.1526 vs Corticostérone PVN- CB_1 -KO : 162.48 ± 14.1504 , $p = 0.074$). En accord avec ces résultats, le poids des surrénales entre PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO était identique [279].

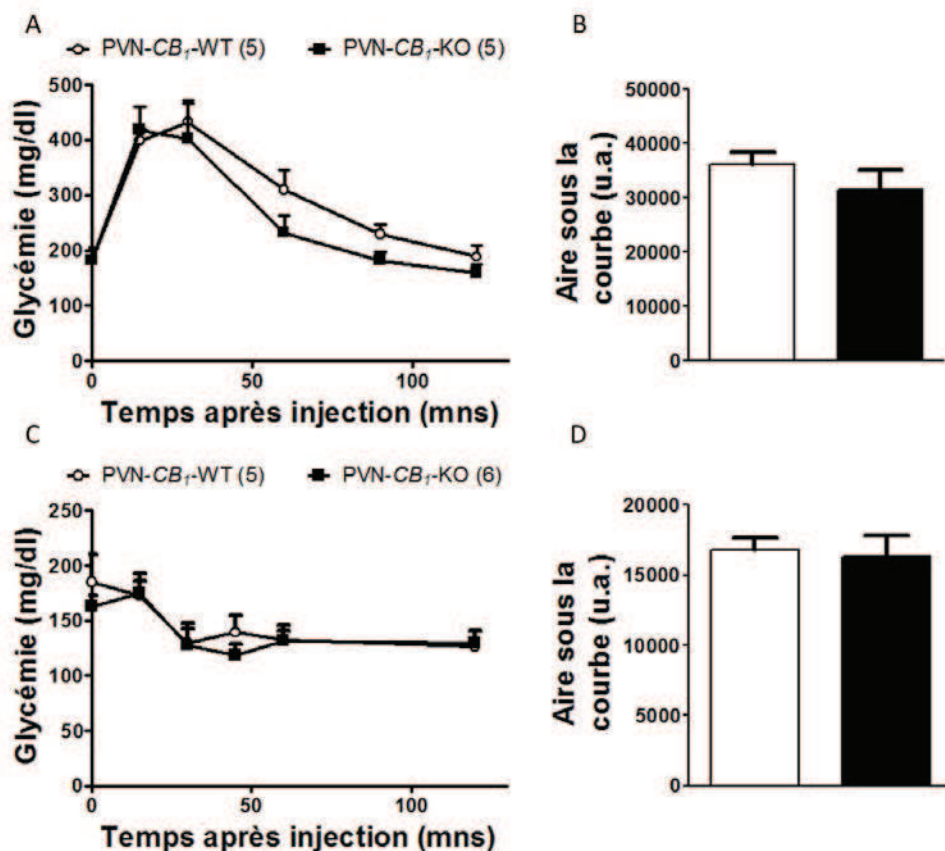


Figure 4. Etude de la sensibilité au glucose et à l'insuline lors d'un régime standard. Evolution de la glycémie suite à une injection de 2g/kg de D-glucose lors d'un ipGTT (A) et aire sous la courbe en unités arbitraires (u.a.) (B) chez les souris PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO. Evolution de la glycémie suite à une injection de 0,5U/kg d'insuline lors d'un ipITT (C) et aire sous la courbe en unités arbitraires (u.a.) (D) chez les souris PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM ; * : $p < 0.05$ vs PVN- CB_1 -WT.

La délétion de CB_1 exprimé dans les neurones Sim ne modifie pas la régulation de la glycémie en régime standard

Pour évaluer le rôle du récepteur CB_1 exprimé par les neurones Sim dans la régulation de la glycémie, nous avons réalisé un test de tolérance au glucose (ipGTT) et un test de tolérance à l'insuline (ipITT). La délétion de CB_1 dans les neurones Sim n'a pas modifié la réponse au GTT (Fig. 4A-B), ni entraîné de différence dans la réponse à l'ITT (Fig. 4C-D).

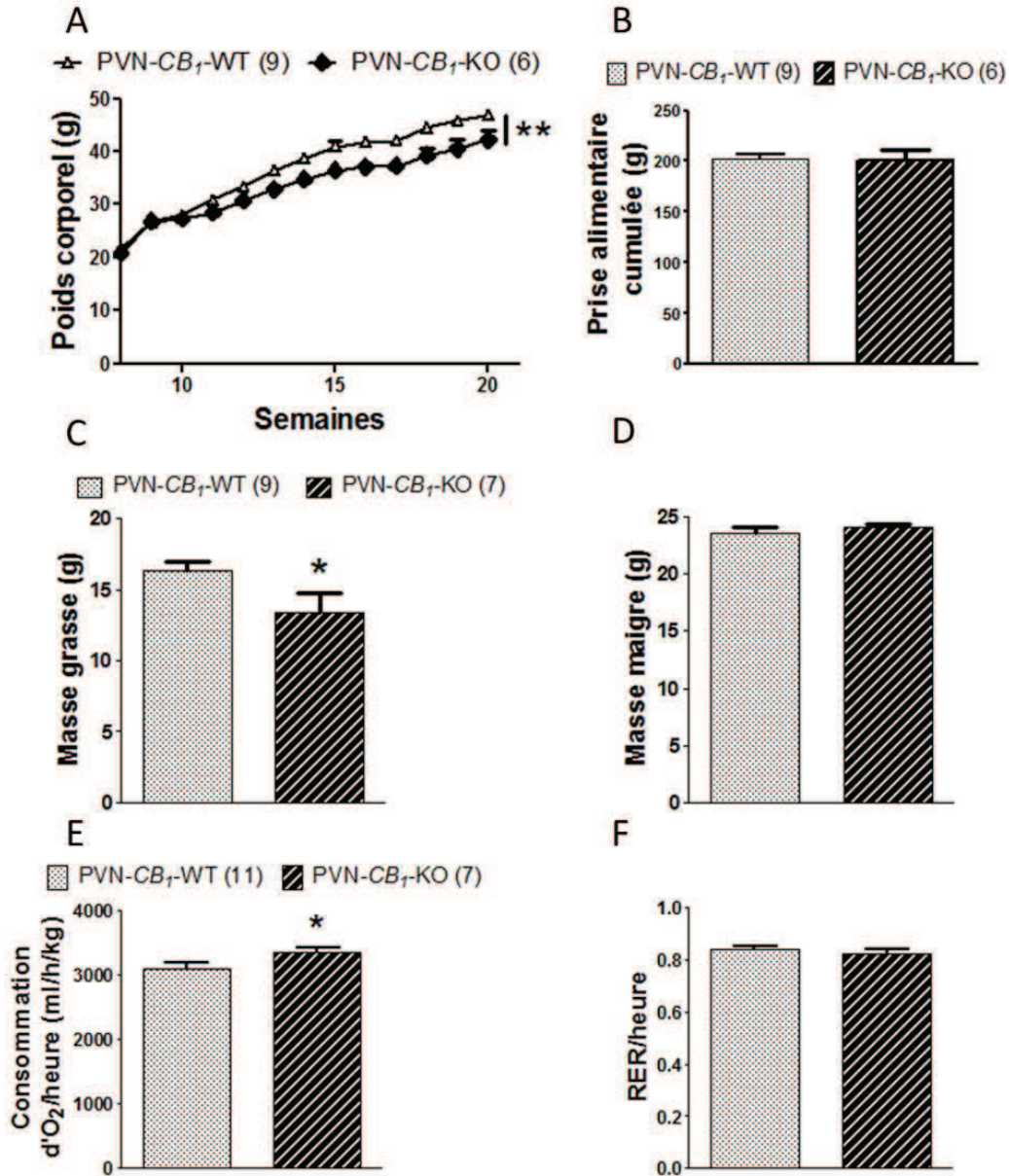


Figure 5. Résistance à la DIO chez les souris PVN- CB_1 -KO. Prise de poids (A), prise alimentaire (B), composition corporelle à 15 semaines (C-D) chez les souris PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO soumises à un régime riche en graisses (60% HFD). Consommation d'oxygène (E) et quotient respiratoire (RER) (F) moyens lors de l'expérience de calorimétrie indirecte réalisée à 15 semaines d'âge et après 7 semaines de HFD. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

La délétion de CB_1 dans les neurones Sim protège de l'obésité alimentaire

Des études ont précédemment rapporté que la délétion de CB_1 , complète ou restreinte aux neurones principaux du prosencéphale et du SNS, protège de l'obésité induite par le régime alimentaire [21, 186]. Afin d'évaluer le rôle spécifique de la signalisation de CB_1 dans les neurones Sim dans la réponse à la DIO, nous avons soumis nos animaux à un régime riche en graisses (60% HFD). Et nous avons observé que les mâles PVN- CB_1 -KO prennent significativement moins de poids que leurs congénères sauvages lorsqu'ils sont soumis à une

HFD (Fig. 5A). De façon intéressante, il n'y a pas de différence dans la prise alimentaire entre les deux génotypes (Fig. 5B). Cette prise de poids réduite est due à une masse grasse réduite (Fig. 5C), sans modification de la masse maigre (Fig. 5D). Cette baisse de masse grasse est le résultat d'une dépense énergétique significativement augmentée chez les souris PVN- CB_1 -KO (Fig. 5E), sans altération du quotient respiratoire (Fig. 5F).

Changements moléculaires dans les tissus adipeux chez les souris PVN- CB_1 -KO en régime riche en graisse

L'analyse de l'expression de l'ARNm dans le tissu adipeux brun a montré une augmentation significative de l'expression de l'Uncoupling Chain Protein 1 (UCP-1), de la cyclooxygénase IV (Cox IV), et du Transcription factor A, mitochondrial (Tfam), révélant une potentielle augmentation de l'activité mitochondriale dans ce tissu chez les souris PVN- CB_1 -KO (Fig. 6A). De façon intéressante, ces modifications d'expression étaient associées à une augmentation de l'expression du récepteur β_3 adénergique (β_3 -AdR) chez les souris PVN- CB_1 -KO en comparaison avec leur congénères WT (Fig. 6A).

De la même façon, dans le tissu adipeux blanc, nous avons pu observer une augmentation de l'expression de la carnitine palitoyltransférase β (CPT-1 β) (Fig. 6B) et une légère mais significative baisse de l'expression de l'ACC-1 (Fig. 6B).

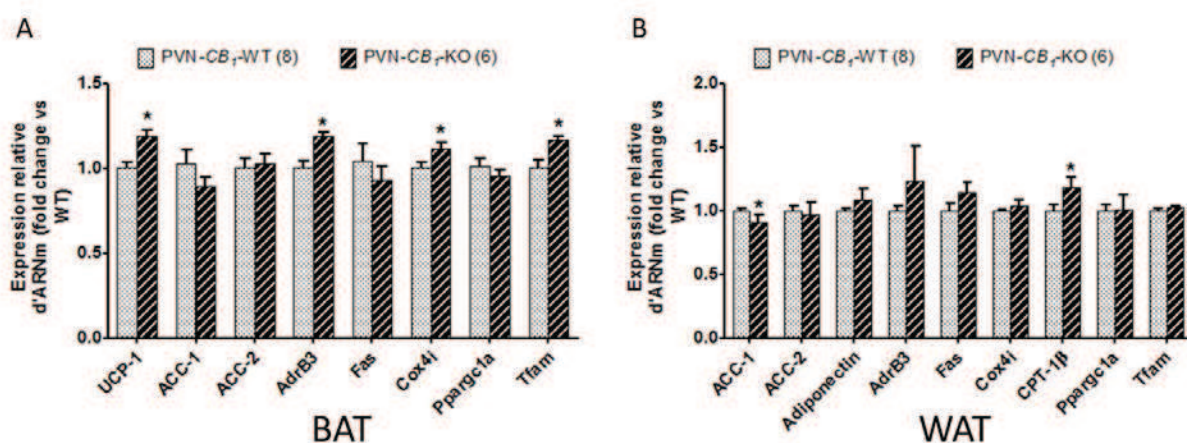


Figure 6. Analyse de l'expression de l'ARNm de gènes par qPCR dans le tissu adipeux brun (A) et le tissu adipeux blanc (B) des souris mâles PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO en régime riche en graisses. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM ; * $p < 0.05$

Sensibilité accrue à l'insuline chez les souris PVN- CB_1 -KO en régime riche en graisse

Pour déterminer si la baisse de masse grasse pouvait améliorer la régulation de la glycémie, nous avons répété les GTT et ITT chez les souris mâles PVN- CB_1 -KO après douze semaines de HFD. Le GTT n'a pas révélé de différences significatives entre les souris PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO (Fig. 7A-B). Cependant, l'ITT a révélé une sensibilité accrue à l'insuline chez les souris PVN- CB_1 -KO (Fig. 7C-D). En accord avec ces résultats, l'Homeostasis Model Assessment (HOMA) était significativement inférieur chez les souris KO (Fig. 7E).

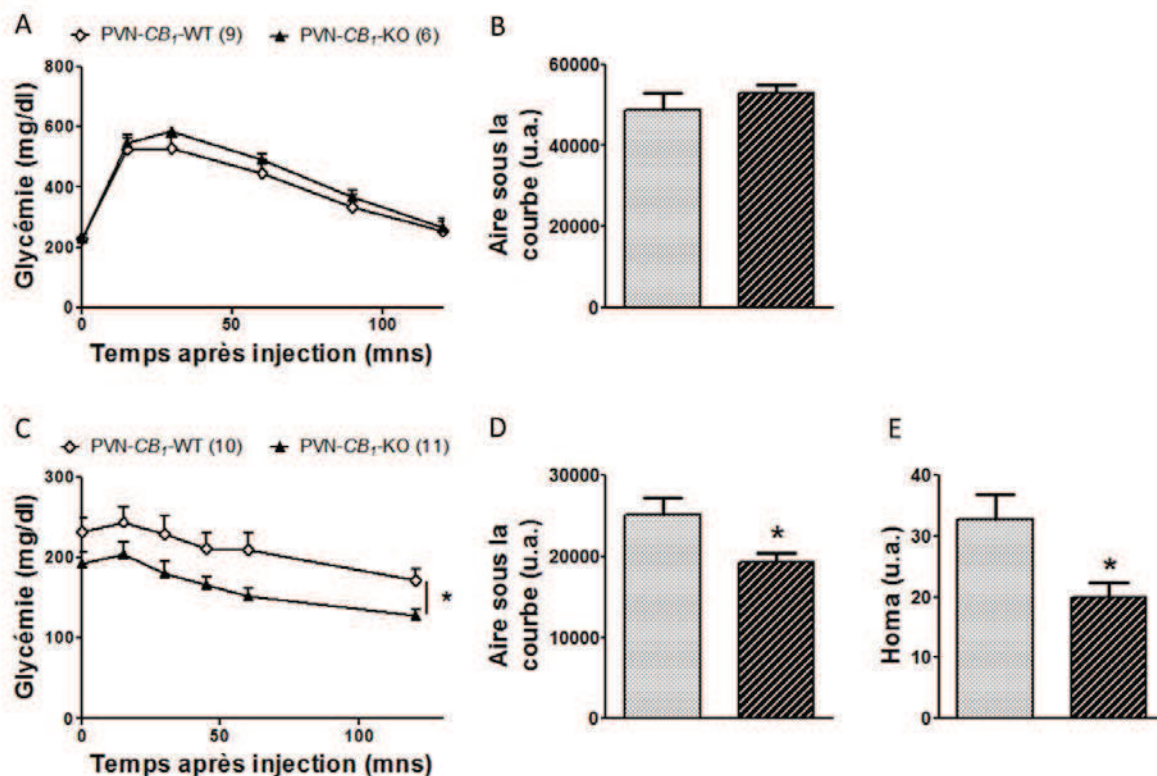


Figure 7. Etude de la sensibilité au glucose et à l'insuline lors d'un régime riche en graisses. Evolution de la glycémie suite à une injection de 2g/kg de D-glucose lors d'un ipGTT (A) et aire sous la courbe en unités arbitraires (u.a.) (B) chez les souris PVN-*CB₁*-WT et PVN-*CB₁*-KO. Evolution de la glycémie suite à une injection de 0,5U/kg d'insuline lors d'un ipITT (C) et aire sous la courbe en unités arbitraires (u.a.) (D) chez les souris PVN-*CB₁*-WT et PVN-*CB₁*-KO. HOMA (E). Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux utilisés. Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM ; * $p < 0.05$ vs VMN-*CB₁*-WT.

Discussion

Le PVN, grâce à sa position stratégique et ses nombreuses connexions, est un acteur important dans la régulation de la balance énergétique [274]. Il est un site important de l'action des mélanocortines [280] et du NPY [281], ainsi qu'un acteur clé de l'activation du BAT par le biais du SNS [274]. De plus, dans le PVN, *CB₁* co-localise avec plusieurs neuropeptides impliqués dans la régulation de la balance énergétique comme CART et CRH [186]. Cependant, le rôle du SEC au niveau du PVN n'est pas clair. En utilisant une approche génétique, nous avons généré une lignée de souris mutantes possédant une délétion conditionnelle du gène de *CB₁* dans les neurones exprimant *Sim*, un gène qui au sein de l'hypothalamus est exclusivement exprimé par les neurones du PVN. Comme attendu, l'analyse par double FISH a révélé une absence complète de l'expression de l'ARNm de *CB₁* dans le PVN des souris PVN-*CB₁*-KO (Fig. 1E).

Nous avons ensuite évalué le phénotype métabolique de ces souris en régime standard. La délétion de *CB₁* dans les neurones *Sim* conduit à une prise de poids diminuée (Fig. 2A), mais sans modification significative de la prise alimentaire (Fig. 2B) chez les souris mâles PVN-*CB₁*-KO. Il est encore une fois intéressant de noter que la suppression de la signalisation de *CB₁* par la délétion du gène de ce récepteur modifie la prise de poids sans affecter significativement la prise alimentaire, comme chez les souris Hyp-*CB₁*-KO. Alors que des études précédentes ont montré qu'une injection intra-PVN de THC chez le rat augmente significativement la prise alimentaire chez ces animaux, et cet effet est atténué par le rimonabant [220]. De plus, une étude récente a montré que chez le rat, une injection intra-PVN d'AEA augmentait la prise alimentaire [125]. Cependant, à la différence des études mentionnées ci-dessus, et du fait que l'expression de *CB₁* est majoritairement pré-synaptique, nous évaluons le rôle de *CB₁* au niveau des projections des neurones du PVN, et non au niveau des terminaisons faisant synapse dans le PVN. Il est donc possible que les différentes populations neuronales ciblées aient des effets différents sur la prise alimentaire. De plus, l'analyse de la composition corporelle n'a pas révélé de différence significative entre les

souris PVN-*CB₁*-KO et WT (Fig. 2C-F). Il semble donc que la baisse de poids observée chez les souris PVN-*CB₁*-KO soit plutôt due à une baisse de la croissance qu'à une baisse de masse grasse par augmentation de la thermogénèse et/ou de l'oxydation des acides gras. Cependant, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour confirmer/infirmier cette hypothèse.

Il faut toutefois noter que les souris PVN-*CB₁*-KO ont une tendance ($p = 0.117$) à avoir une consommation d'oxygène augmentée (Fig. 3A). Mais ce phénomène n'était pas significatif, à la différence des souris Hyp-*CB₁*-KO qui présentent une augmentation significative de la dépense énergétique en régime standard [248]. Cependant, il est tentant de suggérer, au vu des résultats de cette étude, que le PVN médie une partie des effets observés sur la dépense énergétique des souris Hyp-*CB₁*-KO.

Le PVN est un acteur clé de la régulation de l'axe HPA [277], et *CB₁* au niveau de ce noyau est impliqué dans la contre régulation de l'axe HPA par les glucocorticoïdes en inhibant la synthèse et la libération de la CRH [121]. Nous avons donc souhaité évalué si la délétion de *CB₁* dans les neurones Sim pouvait affecter la régulation de l'axe HPA. La mesure de la concentration plasmatique de corticostérone juste avant la phase nocturne, lorsque cette concentration est au zénith, n'a pas révélé de différence significative entre WT et KO. Cependant, il faut noter une tendance à une concentration de corticostérone plus faible ($p=0.074$) chez les souris PVN-*CB₁*-KO juste avant la phase nocturne, à l'inverse des souris *CB₁*-KO qui présentent une concentration de corticostérone plus élevée que les WT [119]. Ajouté au fait que les souris PVN-*CB₁*-KO ont des surrénales de poids identique à celle de leurs congénères sauvages [279], il ne semble pas que la délétion de *CB₁* dans les neurones exprimant Sim ait un impact majeur sur le fonctionnement de l'axe corticotrope. Cependant, une étude plus détaillée de la réactivité de l'axe HPA est nécessaire avant de pouvoir confirmer ces résultats.

Il faut enfin noter que l'ablation de *CB₁* au niveau du PVN ne modifie pas la régulation de la glycémie chez les souris PVN-*CB₁*-KO en régime standard. En effet, nous n'avons pas observé de différences de réponse au test de tolérance au glucose (Fig. 4A-B) ni au test de tolérance à l'insuline (Fig. 4C-D) entre souris WT et KO.

Néanmoins, lorsque nous avons soumis ces animaux à un régime riche en graisses (60% HFD), les souris PVN-*CB₁*-KO prennent significativement moins de poids que leurs congénères sauvages (Fig. 5A) sans modification de la prise alimentaire (Fig. 5B). Ces résultats sont en accord avec les études précédentes où la délétion de *CB₁* restreinte aux neurones du prosencéphale ainsi qu'une partie des neurones du SNS, induit une résistance à l'obésité alimentaire sans modifier la prise alimentaire [21, 232]. Cette baisse de prise de poids est due à une baisse significative de la masse grasse (Fig. 5C) sans modification de la masse maigre (Fig. 5D). De la même façon que dans l'étude de Quarta et collaborateurs [21], nous avons observé une dépense énergétique significativement plus importante chez les souris PVN-*CB₁*-KO, reflétée par la consommation d'oxygène augmentée chez ces souris (Fig. 5E). Le quotient respiratoire est quant à lui similaire entre souris WT et KO (Fig. 5F). Il semble donc que cette baisse de poids et de masse grasse soit principalement due à une activité augmentée du SNS vers le BAT, et une augmentation de la thermogénèse au niveau du BAT. En accord avec cette hypothèse, nous avons pu observer que lorsque ces animaux sont soumis à un régime riche en graisses, l'expression de l'ARNm du récepteur β 3-adrénergique est significativement plus importante dans le BAT des souris PVN-*CB₁*-KO, comparé à leurs congénères sauvages (Fig. 6A). β 3-AdrR est le principal récepteur médiant les effets du SNS sur le BAT [260]. Une augmentation de l'expression de ce récepteur suggère une activation supérieure de la thermogénèse dans ce tissu. En conséquence, nous avons pu observer une augmentation significative de l'expression de l'ARNm d'UCP-1 (Fig. 6A). L'expression de l'ARNm de Cox IV et du Tfam sont également plus élevés (Fig. 6A) chez les souris PVN-*CB₁*-KO soumises à un régime riche en graisses, suggérant une activité mitochondriale augmentée dans le BAT de ces animaux. Tous ces résultats sont en faveur d'une protection de la DIO grâce à la délétion de *CB₁* dans les neurones du PVN, et ce, par une augmentation de la dépense énergétique probablement médiée par le SNS. Le récepteur

CB₁ est exprimé au niveau des terminaisons nerveuses des neurones du PVN faisant synapse avec le tronc cérébral et la moelle épinière. Ces neurones sont impliqués dans l'activation du SNS, et donc dans la stimulation de la thermogénèse dans le BAT [274]. L'activation de CB₁ au niveau de ces terminaisons nerveuses va donc inhiber le SNS et l'absence de CB₁ dans notre modèle permet une activation augmentée du SNS par les neurones du PVN, protégeant partiellement ces animaux de la DIO.

Le SNS stimule également l'oxydation des acides gras dans le WAT [259]. CPT-1 β est une protéine mitochondriale permettant le transfert des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie [282] et nous avons observé une augmentation significative de l'expression de la CPT-1 β dans le WAT des souris PVN-CB₁-KO. Ces résultats suggèrent donc une augmentation de l'internalisation des acides gras dans les mitochondries, et donc une augmentation de l'oxydation des acides gras dans ce tissu qui pourrait favoriser une réduction de masse grasse, comme nous avons pu l'observer chez nos souris PVN-CB₁-KO. Cette masse grasse réduite est d'ailleurs associée à une sensibilité accrue à l'insuline, révélée par un index HOMA réduit (Fig. 7E) et une meilleure réponse à l'ITT (Fig. 7C-D).

En résumé, les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent que le récepteur CB₁ exprimé au niveau des neurones du PVN exerce une inhibition tonique de l'activation du SNS lors d'un régime riche en graisses, et que l'activation du récepteur CB₁ au niveau de ces neurones inhibe la thermogénèse au niveau du BAT. Cependant, plusieurs expériences sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Premièrement, nous ne pouvons exclure une influence des projections du PVN vers l'hypophyse et leur rôle dans la libération hormonale. Une étude de la réactivité de l'axe corticotrope, ainsi que d'autres axes tels que l'axe thyroïdote nous permettrait de les exclure du schéma, et sera donc nécessaire pour renforcer nos conclusions. Il serait également important de vérifier si les effets observés sur le poids corporel, la masse grasse, la dépense énergétique et l'oxydation des acides gras sont bien médiés par le SNS dans notre modèle. Dans cette optique, nous planifions de bloquer pharmacologiquement le β 3-AdrR chez les souris PVN-CB₁-KO durant un régime riche en graisses afin de voir si cela permet de les ramener au même niveau que les contrôles.

Chapitre V : Discussion Générale.

Grâce à ses différentes populations neuronales exprimant différents récepteurs et sécrétant divers neuropeptides et neurotransmetteurs, l'hypothalamus est constamment informé du statut énergétique de l'organisme et peut ainsi en retour moduler les comportements de prise alimentaire ainsi que la dépense énergétique et le métabolisme des graisses, principalement grâce à la modulation de l'activité du système nerveux sympathique (SNS). En parallèle, le système endocannabinoïde (SEC) a émergé ces dernières années comme un acteur clé de la régulation de la balance énergétique [19, 24, 33, 201, 211, 283]. Cependant, alors que CB₁ et ses ligands endogènes sont présents au niveau hypothalamique [103, 186], peu d'études ont tenté d'élucider le rôle spécifique de CB₁ dans cette structure, et en particulier dans les différents noyaux hypothalamiques connus pour jouer un rôle dans la régulation de la balance énergétique. **Mon projet de thèse a eu pour objectif de tenter de comprendre quel pouvait être le rôle du CB₁ hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique, ceci par la caractérisation comportementale, métabolique et moléculaire de trois modèles de souris transgéniques.**

Le CB₁ hypothalamique et son rôle dans la prise de poids et la composition corporelle en régime standard

Les études précédentes ont montré que le récepteur CB₁ joue un rôle dans la prise de poids car les souris CB₁-KO prennent significativement moins de poids et de masse grasse [186], et le blocage de CB₁ à l'aide d'antagonistes réduit également la prise de poids [180, 187, 188]. Les CB₁ exprimés au niveau neuronal jouent un rôle important dans la médiation des effets du SEC sur la prise de poids car une délétion de CB₁ dans les neurones principaux du prosencéphale et du SNS induit également un phénotype résistant à l'obésité [21]. Nous révélons, grâce à notre étude de la lignée Hyp-CB₁-KO (Chapitre II) [248], que CB₁ exprimé par les neurones hypothalamiques joue un rôle important dans la prise de poids en régime standard car une délétion partielle de CB₁ dans l'hypothalamus réduit la prise de poids des animaux [248]. Une partie de ces effets sur la prise de poids chez les souris Hyp-CB₁-KO pourrait être médié par une population neuronale du PVN, car la délétion de CB₁ des neurones Sim réduit également la prise de poids des souris mâles PVN-CB₁-KO en régime standard (Chapitre IV), et présentent une tendance à une dépense énergétique augmentée. Cependant, les souris mâles PVN-CB₁-KO ne présentent pas de différence dans leur composition corporelle en comparaison avec leurs WT

. A l'inverse, la délétion de CB₁ exprimé par les neurones SF1 du VMN n'a pas affecté la prise de poids des souris mâles VMN-CB₁-KO en régime standard mais a induit une baisse significative de leur masse grasse, avec en parallèle une légère augmentation de la masse maigre (Chapitre III). Il semble donc qu'il existe, au sein de l'hypothalamus, des populations neuronales spécifiques où l'activation de CB₁ va induire des effets différents sur la prise de poids et la composition corporelle.

CB₁ hypothalamique et prise alimentaire en régime standard

Le SEC est considéré comme jouant un rôle dans la prise alimentaire et l'activation de CB₁ est généralement considérée comme un puissant signal oréxigène [186, 283], bien que les études publiées récemment semblent révéler un rôle plus complexe, où l'activation de CB₁ sur des populations neuronales spécifiques induit des effets opposés sur la prise alimentaire [233]. Nous avons donc évalué la prise alimentaire dans nos trois modèles de souris mutantes conditionnelles pour CB₁. De façon surprenante, nous n'avons pas observé de modifications évidentes de la prise alimentaire en régime standard, quelle que soit la lignée. C'est un résultat intrigant, si l'on considère la littérature sur le rôle de la signalisation du récepteur CB₁ hypothalamique dans la régulation de la prise alimentaire. Il a été montré que l'administration de l'endocannabinoïde AEA dans le VMN ou dans le PVN augmente rapidement la prise alimentaire chez le rat d'une manière CB₁-dépendante [125, 219]. Et l'administration de l'agoniste du récepteur CB₁ THC dans le PVN induit également une hyperphagie par activation du récepteur CB₁ [220]. De plus, l'effet oréxigène de l'hormone gastrique ghréline

est associée à une augmentation des concentrations d'endocannabinoïdes hypothalamiques et requiert une signalisation intacte du récepteur CB₁ [241, 242]. À côté de ça, les souris CB₁-KO sont légèrement hypophagiques, un effet dont la cause possible est le changement des niveaux d'expression de nombreux neuropeptides hypothalamiques connus pour réguler la prise alimentaire [186].

Chez les souris Hyp-CB₁-KO (Chapitre II), l'absence de changements significatifs dans la prise alimentaire pourrait s'expliquer si l'on tient compte de l'approche utilisée pour déléter le gène du récepteur CB₁. En effet, cette technique ne permet pas d'éliminer sélectivement l'expression du récepteur CB₁ au sein d'un type neuronal hypothalamique spécifique. Mais sachant que des populations neuronales hypothalamiques ont des rôles opposés dans la modulation de la prise alimentaire [224], et l'effet opposé de la modulation de la prise alimentaire CB₁-dépendante des signalisations glutamatergique et GABAergique [233], la présente étude n'exclue pas un rôle des récepteurs CB₁ localisés sur une population cellulaire hypothalamique spécifique dans la régulation du comportement alimentaire. Cela suggère plutôt que lorsque l'expression du récepteur CB₁ est significativement diminuée dans l'hypothalamus, sans tenir compte du type cellulaire ciblé par une telle approche, cela n'affecte pas la prise alimentaire, ni en conditions basales, ni en condition stimulée (e.g. induite par le jeûne).

De façon intéressante, nous avons observé que durant la première heure de réalimentation induite par le jeûne, le rimonabant était aussi efficace à générer une hypophagie chez les souris Hyp-CB₁-WT que chez leurs congénères Hyp-CB₁-KO. Cependant, cet effet était perdu à 24h chez les souris Hyp-CB₁-KO. Il semble donc que l'hypophagie induite par le rimonabant met en jeu deux composantes biologiques bien distinctes, et qu'elles agissent d'une manière dépendante du temps. La première, rapidement mise en jeu par l'administration périphérique du composé, est soit médiée par des sous-populations hypothalamiques spécifiques, soit d'origine extra-hypothalamique car la délétion partielle des récepteurs CB₁ de l'hypothalamus ne l'a pas modifié. En accord avec ces résultats, une étude publiée en 2002 [196] a révélé un rôle de la signalisation de CB₁ périphérique dans les effets rapides sur la prise alimentaire observées juste après l'injection de rimonabant. Ces effets périphériques pourraient être médiés par les CB₁ présents sur les neurones du SNS car l'action du rimonabant est abolie une heure après l'injection chez les souris possédant la délétion de CB₁ dans les neurones du SNS [21]. La deuxième composante est d'origine hypothalamique car ses effets sur la prise alimentaire et la perte de poids sont abolis chez les souris Hyp-CB₁-KO 24h après l'administration de la substance.

L'absence de modifications de la prise alimentaire dans ce modèle est d'autant plus intrigante si l'on prend en compte que ces souris sont insensibles à l'effet anorexigène de la leptine, une hormone adipocytaire jouant le rôle de signal d'adiposité en conditions physiologiques. Il existe donc, chez les souris Hyp-CB₁-KO, une modification de l'équilibre de la balance énergétique car elles prennent significativement moins de poids en mangeant une quantité de nourriture similaires à leurs congénères WT.

Les résultats de notre étude sur la lignée VMN-CB₁-KO (Chapitre III) montrent que CB₁ exprimé par les neurones SF1 ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la prise alimentaire *ad libitum* en régime standard. C'est un résultat intéressant si l'on considère que la stimulation des neurones du VMN (principalement glutamatergiques) réduit la prise alimentaire [16, 74] et que le récepteur CB₁ exprimé dans les neurones glutamatergiques du cerveau est responsable de l'effet oréxigène des (endo)cannabinoïdes [233]. En effet, d'un point de vue purement anatomo-fonctionnel, l'activation de CB₁ sur les neurones SF1 (glutamatergiques) devrait inhiber la libération de glutamate, et donc les signaux de satiété. Or, l'absence de CB₁ dans les neurones SF1 n'affecte pas la prise alimentaire en régime standard chez les souris mutantes, ce qui suggère que CB₁ exprimé par les neurones SF1 n'exerce pas un rôle majeur dans la régulation de la prise alimentaire en régime standard.

Cependant, à l'inverse des résultats obtenus chez la lignée Hyp- CB_1 -KO, il est important de noter que nos souris sont plus sensibles aux effets anorexigènes de la leptine et présentent une sensibilité augmentée à la leptine spécifiquement dans le VMN. De plus, nous avons pu observer que ces animaux mangent significativement moins que leurs congénères sauvages après un jeûne de 24h (Bellocchio et al., 2012, en révision. Cf. Annexes) suggérant que la signalisation de CB_1 dans le VMN stimule la prise alimentaire en réponse à un jeûne. Nos animaux étant nourris *ad libitum*, ils ne se retrouvent jamais en situation de réel jeûne. De plus, il faut noter qu'une partie des neurones exprimant CB_1 dans le VMN sont GABAergiques [101], et qu'il est supposé que CB_1 sur cette population neuronale médie les effets hypophagiques des (endo)cannabinoïdes [233]. Sachant que les neurones SF1 sont principalement glutamatergiques [264], la lignée VMN- CB_1 -KO conserve donc les récepteurs CB_1 sur les neurones GABAergiques dans le VMN, et pourrait donc expliquer les réponses observées dans des conditions de prise alimentaire stimulée par le jeûne. Des expériences de restriction alimentaire pourraient permettre de préciser le rôle de la signalisation de CB_1 exprimé par les neurones SF1 dans la régulation de la prise alimentaire.

Enfin, la délétion de CB_1 exprimé par les neurones Sim n'a pas non plus affecté significativement la prise alimentaire, bien que les mâles PVN- CB_1 -KO aient une légère tendance à manger moins que leurs WT ($p=0.178$). Des études précédentes ont montré qu'une injection intra-PVN de THC ou d'AEA chez le rat augmente significativement la prise alimentaire chez ces animaux [125, 220], un effet atténué par le rimonabant [220]. Cependant, à la différence des études mentionnées ci-dessus, et du fait que l'expression de CB_1 est majoritairement pré-synaptique, nous évaluons le rôle de CB_1 au niveau des projections des neurones du PVN, et non au niveau des terminaisons faisant synapse dans le PVN. Il est donc possible que les différentes populations neuronales ciblées aient des effets différents sur la prise alimentaire. De plus, tout comme les souris VMN- CB_1 -KO, on ne peut exclure des phénomènes de compensation et de réorganisation lors du développement qui pourraient expliquer l'absence de modifications significatives de la prise alimentaire observée en conditions basales.

Le CB_1 hypothalamique joue un rôle dans la dépense énergétique en régime standard

L'analyse de la dépense énergétique chez les souris Hyp- CB_1 -KO montre que la cause de la baisse de prise de poids suite à la délétion partielle du gène du récepteur CB_1 dans l'hypothalamus est une dissipation de l'énergie accrue. Ces résultats sont en accord avec des travaux récents suggérant que la délétion du gène du récepteur CB_1 dans les neurones principaux du prosencéphale (incluant l'hypothalamus) et les neurones sympathiques modifie la régulation de la balance énergétique en augmentant l'activité sympathique générale [21]. En conséquence, nous avons trouvé une expression augmentée de l'ARNm du récepteur β_3 -adrénergique (β_3 -AdrR) et d'UCP-1 dans le BAT de nos souris Hyp- CB_1 -KO. Le β_3 -AdrR est le principal récepteur médiant les effets du SNS sur le BAT [258], et UCP-1 est un marqueur de la thermogénèse dans le BAT, suggérant une activation sympathique et une thermogénèse augmentées dans ce tissu chez les souris Hyp- CB_1 -KO. Ainsi, les présents résultats suggèrent que les récepteurs CB_1 hypothalamiques exercent un contrôle général de la dépense énergétique, probablement en modulant indirectement l'activité du SNS.

Cette interprétation est en accord avec de nombreuses études récentes mettant en évidence une relation fonctionnelle entre la signalisation du récepteur CB_1 et le SNS. En effet, une administration aigue ou chronique d'antagonistes ou d'agonistes inverses de CB_1 augmente la dépense énergétique et l'activité sympathique, un effet nécessaire à l'induction de la thermogénèse dans le BAT, et de la lipolyse dans le WAT [21, 22, 235, 246]. Pris collectivement, les données précédentes et actuelles suggèrent que l'expression du récepteur CB_1 dans l'hypothalamus est nécessaire pour contrôler la dépense énergétique et pour maintenir le poids corporel, probablement par la régulation de l'activité noradrénergique périphérique.

Comme déjà mentionné plus haut, l'analyse de la composition corporelle des souris mâles VMN- CB_1 -KO a révélé une baisse significative de la masse grasse. Ce phénotype pourrait être le résultat de l'augmentation de sensibilité à la leptine observée chez ces animaux. La signalisation de la leptine inhibe la production et la libération d'endocannabinoïdes, et donc l'activation du récepteur CB_1 [184]. Si l'on considère les rôles opposés sur la régulation de la balance énergétique joués par les LRb et CB_1 , il est tentant de supposer que l'activation de CB_1 inhibe également l'action de la leptine. En l'absence de CB_1 dans le VMN des souris VMN- CB_1 -KO, cette inhibition n'est plus présente et permet une activation augmentée des voies de signalisation intracellulaires associées à l'activation des LRb. De plus, il est important de noter que la délétion du LRb dans les neurones SF1 induit un phénotype obèse [90], révélant le rôle important joué par la signalisation de la leptine au niveau des neurones SF1 dans la régulation de la balance énergétique. Il semblerait donc qu'une absence de CB_1 dans les neurones SF1 va potentialiser l'effet de la leptine en régime standard. Sachant que le VMN joue un rôle dans le métabolisme des acides gras dans le WAT [269], nous avons également évalué, par qPCR, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras. De façon intéressante, nous avons observé une augmentation par deux de l'expression du β_3 -AdR dans le WAT des souris VMN- CB_1 -KO, suggérant une stimulation du WAT dépendante du SNS augmentée chez ces animaux. Cette augmentation était associée à une augmentation par 3 de l'expression de l'ARNm d'ACC-2. Ce résultat est surprenant car ACC-2 inhibe l'oxydation des acides gras mais, en l'absence de données concernant la quantité d'AMPK et/ou d'ACC-2 phosphorylées dans ce tissu, il est difficile de spéculer sur l'effet de cette expression augmentée d'ACC-2. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour permettre de préciser les altérations de l'activité des enzymes connus pour réguler l'oxydation des acides gras.

Cependant, l'analyse de la consommation d'oxygène en régime standard n'a pas révélé de différences significatives entre les souris VMN- CB_1 -KO et leurs congénères sauvages, mais ces animaux ont une baisse significative de leur quotient respiratoire, suggérant une augmentation de l'utilisation des lipides comme substrat énergétique. De façon intéressante, l'analyse de l'expression des gènes dans le BAT a montré une augmentation par deux de l'ARNm du peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 α (PGC-1 α), un gène critique dans la régulation du métabolisme énergétique cellulaire [273], qui suppose un métabolisme augmenté au niveau du BAT des souris VMN- CB_1 -KO en régime standard. En parallèle, nous avons observé une légère augmentation de l'expression de l'ARNm de la cyclooxygénase IV (Cox IV), le dernier complexe enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale, confirmant une activité mitochondriale légèrement plus importante dans le BAT des souris mâles VMN- CB_1 -KO en régime standard. L'analyse par tomographie par émission de positrons (PET) de l'absorption de norépinephrine dans le BAT a confirmé cette hypothèse car nous avons observé une augmentation significative de l'absorption de norépinephrine dans le BAT des souris VMN- CB_1 -KO lors d'une exposition au froid ou suite à l'injection d'un agoniste des β_3 -AdR. Pris ensemble, ces résultats montrent une augmentation de l'activité au niveau du BAT, et une augmentation de l'expression du β_3 -AdR dans le WAT des souris VMN- CB_1 -KO en régime standard, suggérant une réactivité accrue du SNS dans ces deux tissus.

Comme déjà mentionné plus haut, la délétion de CB_1 dans les neurones Sim n'affecte pas la composition corporelle. En accord avec ces résultats, la dépense énergétique et le RER étaient identiques entre souris mâles PVN- CB_1 -WT et PVN- CB_1 -KO en régime standard. Cependant, des analyses complémentaires, comme l'étude des axes hormonaux et de la croissance en taille des souris seront nécessaires pour mieux comprendre le phénotype observé.

Pris ensemble, ces résultats montrent que CB_1 exprimé au niveau des neurones hypothalamiques joue un rôle dans la régulation de l'activité du SNS sur les tissus adipeux (blanc et brun), et suggèrent que l'activation de CB_1 au niveau hypothalamique induit une inhibition de la thermogénèse au niveau du BAT pour préserver l'énergie et maintenir une

balance énergétique positive. De la même façon, au niveau du WAT, l'activation des CB₁ hypothalamiques réduit l'oxydation des acides gras en inhibant le SNS et ainsi promouvoir le stockage des graisses. Cependant, ces effets semblent médiés par différentes populations neuronales comme le suggère la caractérisation de nos modèles animaux.

CB₁ hypothalamique et régulation de la glycémie en régime standard

Nous avons souhaité évaluer, en parallèle avec les prises de poids et de nourriture, l'homéostasie du glucose dans nos différents modèles. Alors que la délétion de CB₁ dans les neurones Sim ne modifie pas la réponse aux tests de tolérance au glucose (ipGTT) et à l'insuline (ipITT), la délétion restreinte aux neurones SF1 du VMN a entraîné, en accord avec la masse grasse réduite, une sensibilité accrue au glucose et à l'insuline. Il est intéressant de noter que l'injection de leptine dans le VMN stimule l'absorption de glucose dans le BAT et les muscles [99]. Nos souris VMN-CB₁-KO en régime standard sont plus sensibles à l'action anorexigène de la leptine, un effet associé à une activation spécifique de la signalisation de la leptine (augmentation de la phosphorylation de STAT3) dans le VMN. Donc, cela pourrait également participer à la meilleure homéostasie du glucose observée chez les souris VMN-CB₁-KO en régime standard.

Table 1. Tableau récapitulatif des effets observés dans les trois lignées étudiées en régime standard.

	Régime standard		
	Hyp-CB₁-KO	VMN-CB₁-KO	PVN-CB₁-KO
Poids corporel	-	=	-
Prise alimentaire	=	=	=
Composition corporelle	- masse grasse; = masse maigre	- masse grasse; = masse maigre	= masse grasse; = masse maigre
Dépense énergétique	+	=	=
Quotient respiratoire	=	-	=
Tissu adipeux brun	+ β3-AdR; + UCP-1	+ CoxIV; + PGC-1α; réactivité augmentée	/
Tissu adipeux blanc	/	+ ACC-2; + β3-AdR	/
Test de tolérance au glucose	/	Sensibilité augmentée	=
Test de tolérance à l'insuline	/	Sensibilité augmentée	=
Sensibilité à la leptine	Insensible	Sensibilité augmentée dans le VMN	=
Réponse au Rimonabant	Insensible à l'action à long terme	=	=

ACC-2 : AcétylCoA-Carboxylase 2 ; CoxIV : Cyclo-oxygénase IV ; β3-AdR : Récepteur β3 - adrénérique ; PGC-1α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α ; UCP-1 : Uncoupling Chain Protein 1 ; = : pas de différence avec les WT ; + supérieur aux WT ; - : Inférieur aux WT ; / : non évalué

CB₁ hypothalamique et obésité alimentaire

L'inhibition du récepteur CB₁ a révélé des effets bénéfiques pour le traitement de l'obésité et de ses désordres métaboliques associés [284]. De plus, la délétion de CB₁ chez la souris rend ces animaux résistants à l'obésité alimentaire [21]. Cependant, les effets secondaires psychiatriques observés après l'utilisation du rimonabant ont conduit à son retrait du marché [285] et poussé les recherches vers la découverte et la caractérisation d'antagonistes de CB₁ ayant un effet majoritairement périphérique [204]. Ainsi, le traitement

potentiel de l'obésité par la modulation du SEC du SNC a été abandonné. Or, il semble clair que le SEC, au niveau du SNC, joue également un rôle dans les effets bénéfiques du rimonabant car ses effets sur la prise alimentaire sont abolis chez les souris ayant une délétion de CB₁ dans les neurones principaux du prosencéphale et du SNS [21]. De plus, ces animaux, tout comme les souris *CB₁-KO*, sont résistants à l'obésité alimentaire [21], révélant le rôle important de CB₁ sur ces populations neuronales dans la régulation de la balance énergétique.

Les résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse ont permis de révéler un nouveau rôle du SEC dans la régulation de la balance énergétique. En effet, les souris *VMN-CB₁-KO* (Chapitre III), alors qu'elles présentaient un phénotype plus mince que leurs WT et une sensibilité à la leptine, l'insuline et au glucose accrues en régime standard, ont pris significativement plus de poids que leurs congénères WT lorsqu'elles étaient soumises à un régime riche en graisses (40% HFD). C'est la 1^{ère} lignée mutante conditionnelle de CB₁ qui prend significativement plus de poids que ses congénères WT en régime riche en graisses. De plus, cet effet dépendant du régime alimentaire suggère que CB₁ au niveau des neurones SF1 exerce un rôle différent selon la composition du régime alimentaire (e.g. faible ou forte quantité de graisses). Cette prise de poids augmentée chez les souris mâles *VMN-CB₁-KO* est due à une augmentation de la masse grasse, et est associée à une forte tendance à une prise alimentaire plus importante. Cette dernière est associée à la baisse significative de l'expression de l'ARNm du récepteur à la leptine dans l'hypothalamus de ces animaux. Ces résultats moléculaires sont en accord avec les résultats phénotypiques précédemment décrits, car une baisse de l'expression du LRB dans le VMN induit une prise de poids et de masse grasse plus importantes [90, 263].

Dans notre modèle, l'augmentation de masse grasse pourrait être en partie due à un défaut d'adaptation du système adrénergique car, alors que l'on observait une augmentation de l'expression du β 3-AdR dans le WAT des souris *VMN-CB₁-KO* en régime standard, l'inverse se produit en régime riche en graisse, à savoir l'expression de l'ARNm du β 3-AdR dans le WAT est réduite de 50% en comparaison avec les WT. Cependant, ces résultats sont préliminaires et nécessitent d'être confirmés en augmentant le nombre d'échantillons analysés. De plus, les souris *VMN-CB₁-KO* ont une forte tendance ($p=0.074$) à moins augmenter leur consommation d'oxygène que leurs congénères WT lorsqu'elles sont soumises de façon aigüe à un régime fortement enrichi en graisses (60% HFD), suggérant un problème d'adaptation à un changement de régime alimentaire (e.g. régime standard vs HFD). Enfin, en plus de leur poids corporel et leur masse grasse augmentés en régime gras, les souris *VMN-CB₁-KO* commencent à présenter des signes d'altérations de l'homéostasie du glucose, comme le suggère le pic hyperglycémique observé durant le GTT.

A l'inverse des souris *VMN-CB₁-KO*, les souris *PVN-CB₁-KO* prennent significativement moins de poids que leurs congénères sauvages lorsqu'elles sont soumises à un régime très enrichi en graisses (60% HFD), sans modification de la prise alimentaire. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes où la délétion de CB₁ restreinte aux neurones du prosencéphale ainsi qu'une partie des neurones du SNS induit une résistance à la DIO sans modifier la prise alimentaire [21, 232]. De la même façon que dans l'étude de Quarta et collaborateurs [21], nous avons observé une dépense énergétique significativement plus importante chez les souris *PVN-CB₁-KO*, reflétée par leur consommation d'oxygène augmentée. Le quotient respiratoire est quant à lui similaire entre souris WT et KO. Il semble donc que cette baisse de poids et de masse grasse soit principalement due à une activité augmentée du SNS vers le BAT et une augmentation de la thermogénèse au niveau du BAT, permettant une dissipation d'énergie accrue au niveau de ce tissu chez les souris mâles *PVN-CB₁-KO* en régime riche en graisses.

En accord avec cette hypothèse, nous avons pu observer que lorsque ces animaux sont soumis à un régime riche en graisses, l'expression de l'ARNm du récepteur β 3-adrénergique est significativement plus importante dans le BAT des souris *PVN-CB₁-KO*, comparé à leurs congénères sauvages. Comme je l'ai déjà mentionné, β 3-AdR est le principal récepteur médiant les effets du SNS sur le BAT. Une augmentation de l'expression de ce récepteur

suggère une activation supérieure de la thermogénèse dans ce tissu. En conséquence, nous avons pu observer une augmentation significative de l'expression de l'ARNm d'UCP-1, indicateur d'une thermogénèse augmentée dans le BAT de ces animaux. L'expression de l'ARNm de Cox IV et du Tfam sont également plus élevés chez les souris PVN- CB_1 -KO soumises à un régime riche en graisses en comparaison avec leurs WT, suggérant une activité mitochondriale augmentée dans le BAT de ces animaux. Tous ces résultats sont en faveur d'une protection de la DIO grâce à la délétion de CB_1 dans les neurones du PVN, et ce, par une augmentation de la dépense énergétique probablement médiée par le SNS.

Une partie des terminaisons nerveuses provenant des neurones du PVN fait synapse avec le tronc cérébral et la moelle épinière, et ces neurones sont impliqués dans l'activation du SNS, et donc dans la stimulation de la thermogénèse dans le BAT [274]. Donc, d'un point de vue anatomo-fonctionnel, il semble logique de supposer que l'activation de CB_1 au niveau de ces terminaisons nerveuses inhibe le SNS. L'absence de CB_1 au niveau des terminaisons nerveuses des neurones Sim dans notre modèle permet une activation augmentée du SNS par les neurones du PVN, protégeant partiellement ces animaux de la DIO par une stimulation augmentée de la thermogénèse dans le BAT.

Le SNS stimule également l'oxydation des acides gras dans le WAT et chez nos souris PVN- CB_1 -KO, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de la CPT-1 β dans le WAT des souris PVN- CB_1 -KO en comparaison avec leurs WT lors d'une exposition chronique à un régime riche en graisses. CPT-1 β étant une protéine mitochondriale permettant le transfert des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie [282], ces résultats suggèrent une augmentation de l'internalisation des acides gras dans les mitochondries, et donc une augmentation de l'oxydation des acides gras dans ce tissu. Ce « turnover » augmenté des acides gras dans le WAT favorise une masse grasse réduite chez nos souris PVN- CB_1 -KO. Cette masse grasse réduite est d'ailleurs associée à une sensibilité accrue à l'insuline, révélée par un index HOMA réduit et une meilleure réponse à l'ITT.

CB₁ hypothalamique et genre

Il est intéressant de noter que tous les phénotypes observés ne l'ont été que chez les souris mâles, et que nous n'avons observé aucune différence entre WT et KO chez les femelles, quelle que soit la lignée. Ces résultats sont en accord avec la littérature où même la délétion totale de CB_1 chez la souris donne un phénotype beaucoup moins fort chez les femelles en comparaison avec les mâles [186]. On ne peut évidemment pas exclure l'influence des hormones sexuelles qui sont importantes dans le VMN et le PVN, et pourraient expliquer l'absence de phénotype observé chez les femelles. Et le VMN étant sexuellement dimorphique, il est possible que son rôle soit différent entre mâles et femelles. Cependant, conformément à la littérature, l'influence de l'activation de CB_1 semble plus faible chez la femelle [186], et nos résultats sont en accord avec cette idée. Mais des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour pouvoir réellement affirmer que les CB_1 hypothalamiques ne jouent pas un rôle chez la femelle. Par exemple, des expériences de prise de poids et prise alimentaire après ovariectomie, pour vérifier le rôle que pourraient avoir les hormones sexuelles sur le phénotype. Synchroniser le cycle menstruel de toutes les femelles serait également intéressant afin de voir si, en fonction de la période du cycle, CB_1 joue un rôle ou non dans la prise alimentaire et de poids chez la femelle.

Table 2. Tableau récapitulatif des effets observés dans les deux lignées étudiées en régime riche en graisses.

	Régime enrichi en graisses	
	VMN-CB₁-KO	PVN-CB₁-KO
Poids corporel	+	-
Prise alimentaire	tendance à l'augmentation	=
Composition corporelle	+ masse grasse; = masse maigre	- masse grasse; = masse maigre
Dépense énergétique	=	+
Quotient respiratoire	=	=
Hypothalamus	- LepR	/
Tissu adipeux brun	+ CoxIV; + PGC-1 α ; réactivité augmentée	+ CoxIV; + UCP-1; + Tfam; + β 3-AdrR
Tissu adipeux blanc	- β 3-AdrR	+ CPT-1 β ; - ACC-1
Test de tolérance au glucose	Pic hyperglycémique à 15 minutes post-injection	=
Test de tolérance à l'insuline	=	=

ACC-1 : AcétylCoA-Carboxylase 1 ; CPT-1 β : Carnitine palmitoyltransférase 1 beta ; CoxIV : Cyclo-oxygénase IV ; β 3-AdrR : Récepteur β 3-adrénergique ; LepR : Récepteur à la leptine ; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α ; Tfam : Transcription factor A, mitochondrial ; UCP-1 : Uncoupling Chain Protein 1 ; = : pas de différence avec les WT ; + supérieur aux WT ; - : Inférieur aux WT ; / : non évalué

Remarques finales

Pris ensemble, les résultats obtenus avec les lignées Hyp-CB₁-KO, VMN-CB₁-KO et PVN-CB₁-KO révèlent que CB₁ présent sur différentes populations neuronales de l'hypothalamus exerce des rôles différents, voire opposés sur la régulation de la balance énergétique, et que ces rôles peuvent être dépendants du régime alimentaire.

En régime standard, les CB₁ hypothalamiques semblent promouvoir la prise de poids et le stockage des graisses. Plus spécifiquement, CB₁ présent sur les neurones SF1 augmente le stockage des graisses en stimulant le SNS au niveau du WAT, un effet potentiellement médié par l'interaction avec la signalisation du LRb. Cette augmentation de masse grasse diminue la sensibilité au glucose et à l'insuline. Alors que d'autres populations neuronales telles que les neurones exprimant Sim vont médier les effets de l'activation de CB₁ sur le BAT en réduisant la thermogénèse et le métabolisme dans ce tissu, toujours pas le biais du SNS.

Lors d'un régime riche en graisses, CB₁ exprimé par les neurones Sim conserve son rôle d'inhibiteur de l'activité du SNS vers le BAT et le WAT pour réduire la dépense énergétique et l'oxydation des acides gras, respectivement, augmentant ainsi le stockage des graisses et réduisant la sensibilité à l'insuline. Mais les récepteurs CB₁ exprimés par les neurones SF1 vont, en régime riche en graisses, protéger de l'obésité alimentaire en permettant l'adaptation de la thermogénèse à un régime riche en graisses, en favorisant l'action de signaux d'adiposité par l'intermédiaire du LRb et en augmentant l'activité du SNS vers le BAT et le WAT pour augmenter la thermogénèse et l'oxydation des acides gras, respectivement.

Il semblerait donc que le blocage de CB₁ au niveau hypothalamique ait des effets différents sur la balance énergétique selon la population neuronale qui exprime le récepteur.

Ces effets vont également être dépendants du sexe et du régime alimentaire. Ces résultats pourraient être utilisés pour le développement et la caractérisation de nouvelles molécules ayant un rôle plus ciblé, telle que la modulation du fonctionnement d'un type neuronal spécifique (par exemple les neurones Sim), pour traiter l'obésité et ses complications métaboliques associées.

Bibliographie

1. Herman, M.A. and B.B. Kahn, *Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1767-75.
2. Bauman, A.E., et al., *Correlates of physical activity: why are some people physically active and others not?* Lancet, 2012. **380**(9838): p. 258-71.
3. Lucassen, E.A., K.I. Rother, and G. Cizza, *Interacting epidemics? Sleep curtailment, insulin resistance, and obesity*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1264**(1): p. 110-34.
4. Hill, J.O. and J.C. Peters, *Environmental contributions to the obesity epidemic*. Science, 1998. **280**(5368): p. 1371-4.
5. Mayer, J. and D.W. Thomas, *Regulation of food intake and obesity*. Science, 1967. **156**(3773): p. 328-37.
6. Seeley, R.J. and S.C. Woods, *Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(11): p. 901-9.
7. Kennedy, G.C., *The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1953. **140**(901): p. 578-96.
8. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
9. Gautron, L. and J.K. Elmquist, *Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2087-93.
10. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin*. Nature, 1998. **394**(6695): p. 790-3.
11. Ryan, K.K., S.C. Woods, and R.J. Seeley, *Central nervous system mechanisms linking the consumption of palatable high-fat diets to the defense of greater adiposity*. Cell Metab, 2012. **15**(2): p. 137-49.
12. Woods, S.C., *Metabolic signals and food intake. Forty years of progress*. Appetite, 2012.
13. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links*. Cell, 2012. **148**(5): p. 852-71.
14. Mayer, J., *Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis*. Ann N Y Acad Sci, 1955. **63**(1): p. 15-43.
15. Houpt, T.R. and H.E. Hance, *Stimulation of food intake in the rabbit and rat by inhibition of glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose*. J Comp Physiol Psychol, 1971. **76**(3): p. 395-400.
16. King, B.M., *The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight*. Physiol Behav, 2006. **87**(2): p. 221-44.
17. Wadikar, D.D. and K.S. Premavalli, *Appetite control and obesity*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012. **52**(10): p. 949-56.
18. Piomelli, D., *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(11): p. 873-84.
19. Bermudez-Silva, F.J., P. Cardinal, and D. Cota, *The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance*. J Psychopharmacol, 2012. **26**(1): p. 114-24.
20. Quarta, C., et al., *Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels*. Trends Mol Med, 2011. **17**(9): p. 518-26.
21. Quarta, C., et al., *CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance*. Cell Metab, 2010. **11**(4): p. 273-85.
22. Bajzer, M., et al., *Cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonism enhances glucose utilisation and activates brown adipose tissue in diet-induced obese mice*. Diabetologia, 2011. **54**(12): p. 3121-31.

23. Cota, D., *Role of the endocannabinoid system in energy balance regulation and obesity*. Front Horm Res, 2008. **36**: p. 135-45.
24. Cota, D., *CBI receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health*. Diabetes Metab Res Rev, 2007. **23**(7): p. 507-17.
25. Flament-Durand, J., *The hypothalamus: anatomy and functions*. Acta Psychiatr Belg, 1980. **80**(4): p. 364-75.
26. Liu, J., Mershon, J. (2008) *Neurosecretory Peptides*. The Global Library of Women's Medicine.
27. Perez MH, R.D., *Les fonctions de l'hypothalamus*. 1994.
28. Leshan, R.L., et al., *Leptin receptor signaling and action in the central nervous system*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14 Suppl 5**: p. 208S-212S.
29. Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents*. Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-13.
30. Del Prete, A., M. Iadevaia, and C. Loguercio, *The role of gut hormones in controlling the food intake: what is their role in emerging diseases?* Endocrinol Nutr, 2012. **59**(3): p. 197-206.
31. Thorens, B., *Sensing of glucose in the brain*. Handb Exp Pharmacol, 2012(209): p. 277-94.
32. Yeo, G.S. and L.K. Heisler, *Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics*. Nat Neurosci, 2012. **15**(10): p. 1343-9.
33. Cota, D., K. Proulx, and R.J. Seeley, *The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation*. Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2158-68.
34. Belgardt, B.F., T. Okamura, and J.C. Bruning, *Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 22): p. 5305-14.
35. Schwartz, M.W., et al., *Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus*. J Clin Invest, 1996. **98**(5): p. 1101-6.
36. De Jonghe, B.C., M.R. Hayes, and K.K. Bence, *Melanocortin control of energy balance: evidence from rodent models*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(15): p. 2569-88.
37. 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.
38. Williams, K.W., et al., *Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons*. J Neurosci, 2010. **30**(7): p. 2472-9.
39. Hentges, S.T., et al., *Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons*. J Neurosci, 2009. **29**(43): p. 13684-90.
40. Yaswen, L., et al., *Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin*. Nat Med, 1999. **5**(9): p. 1066-70.
41. Gropp, E., et al., *Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding*. Nat Neurosci, 2005. **8**(10): p. 1289-91.
42. Graham, M., et al., *Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 273-4.
43. Krude, H., et al., *Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 155-7.
44. Cone, R.D., et al., *The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation*. Recent Prog Horm Res, 1996. **51**: p. 287-317; discussion 318.
45. Pritchard, L.E., A.V. Turnbull, and A. White, *Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity*. J Endocrinol, 2002. **172**(3): p. 411-21.
46. Balthasar, N., et al., *Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure*. Cell, 2005. **123**(3): p. 493-505.

47. Huszar, D., et al., *Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice*. Cell, 1997. **88**(1): p. 131-41.
48. Erickson, J.C., G. Hollopeter, and R.D. Palmiter, *Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1704-7.
49. Erickson, J.C., K.E. Clegg, and R.D. Palmiter, *Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y*. Nature, 1996. **381**(6581): p. 415-21.
50. Qian, S., et al., *Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(14): p. 5027-35.
51. Bewick, G.A., et al., *Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype*. FASEB J, 2005. **19**(12): p. 1680-2.
52. Pinto, S., et al., *Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin*. Science, 2004. **304**(5667): p. 110-5.
53. Yang, Y., et al., *Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop*. Cell, 2011. **146**(6): p. 992-1003.
54. Diano, S., et al., *Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1121-7.
55. Gyengesi, E., et al., *Corticosterone regulates synaptic input organization of POMC and NPY/AgRP neurons in adult mice*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5395-402.
56. Horvath, T.L., et al., *Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14875-80.
57. Balthasar, N., et al., *Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis*. Neuron, 2004. **42**(6): p. 983-91.
58. Kaelin, C.B., et al., *Transcriptional regulation of agouti-related protein (Agrp) in transgenic mice*. Endocrinology, 2004. **145**(12): p. 5798-806.
59. Hill, J.W., et al., *Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility*. Cell Metab, 2010. **11**(4): p. 286-97.
60. van de Wall, E., et al., *Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion*. Endocrinology, 2008. **149**(4): p. 1773-85.
61. Konner, A.C., et al., *Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 438-49.
62. 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.
63. Blevins, J.E. and D.G. Baskin, *Hypothalamic-brainstem circuits controlling eating*. Forum Nutr, 2010. **63**: p. 133-40.
64. 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.
65. Ibrahim, N., et al., *Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels*. Endocrinology, 2003. **144**(4): p. 1331-40.
66. Wang, R., et al., *The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides*. Diabetes, 2004. **53**(8): p. 1959-65.
67. Chen, Y., et al., *Lowering glucose level elevates [Ca²⁺]_i in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons through P/Q-type Ca²⁺ channel activation and GSK3beta inhibition*. Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(5): p. 594-605.
68. Muroya, S., et al., *Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y*. Neurosci Lett, 1999. **264**(1-3): p. 113-6.

69. Cota, D., et al., *Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake*. Science, 2006. **312**(5775): p. 927-30.
70. Blouet, C., et al., *Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit*. J Neurosci, 2009. **29**(26): p. 8302-11.
71. *Nutrition Classics. The Anatomical Record, Volume 78, 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat*. Nutr Rev, 1983. **41**(4): p. 124-7.
72. Sakaguchi, T., G.A. Bray, and G. Eddlestone, *Sympathetic activity following paraventricular or ventromedial hypothalamic lesions in rats*. Brain Res Bull, 1988. **20**(4): p. 461-5.
73. Brobeck, J.R., *Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions*. Physiol Rev, 1946. **26**(4): p. 541-59.
74. Melega, W.P., et al., *Hypothalamic deep brain stimulation reduces weight gain in an obesity-animal model*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30672.
75. Morrison, S.F., C.J. Madden, and D. Tupone, *Central control of brown adipose tissue thermogenesis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**(5).
76. Perkins, M.N., et al., *Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus*. Nature, 1981. **289**(5796): p. 401-2.
77. Minokoshi, Y., M. Saito, and T. Shimazu, *Sympathetic denervation impairs responses of brown adipose tissue to VMH stimulation*. Am J Physiol, 1986. **251**(5 Pt 2): p. R1005-8.
78. Bamshad, M., C.K. Song, and T.J. Bartness, *CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue*. Am J Physiol, 1999. **276**(6 Pt 2): p. R1569-78.
79. Rothman, S.M., et al., *Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1264**(1): p. 49-63.
80. Ikeda, Y., et al., *Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(5): p. 654-62.
81. Ikeda, Y., et al., *The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(4): p. 478-86.
82. Shinoda, K., et al., *Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice*. Dev Dyn, 1995. **204**(1): p. 22-9.
83. Davis, A.M., et al., *Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus*. J Neurobiol, 2004. **60**(4): p. 424-36.
84. Budefeld, T., S.A. Tobet, and G. Majdic, *Altered position of cell bodies and fibers in the ventromedial region in SF-1 knockout mice*. Exp Neurol, 2011. **232**(2): p. 176-84.
85. Dellovade, T.L., et al., *Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes*. J Comp Neurol, 2000. **423**(4): p. 579-89.
86. Jo, Y.H., *Endogenous BDNF regulates inhibitory synaptic transmission in the ventromedial nucleus of the hypothalamus*. J Neurophysiol, 2012. **107**(1): p. 42-9.
87. Tran, P.V., et al., *Diminished hypothalamic bdnf expression and impaired VMH function are associated with reduced SF-1 gene dosage*. J Comp Neurol, 2006. **498**(5): p. 637-48.
88. Unger, T.J., et al., *Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity*. J Neurosci, 2007. **27**(52): p. 14265-74.
89. Bingham, N.C., et al., *Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line*. Genesis, 2006. **44**(9): p. 419-24.

90. Dhillon, H., et al., *Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis*. *Neuron*, 2006. **49**(2): p. 191-203.
91. Kim, K.W., et al., *SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: a key regulator of homeostasis*. *Mol Cell Endocrinol*, 2011. **336**(1-2): p. 219-23.
92. Elmquist, J.K., et al., *Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(2): p. 741-6.
93. Bjorbaek, C., et al., *Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance*. *Mol Cell*, 1998. **1**(4): p. 619-25.
94. Zhang, R., et al., *Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight*. *Endocrinology*, 2008. **149**(11): p. 5654-61.
95. Klockener, T., et al., *High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons*. *Nat Neurosci*, 2011. **14**(7): p. 911-8.
96. Kishi, T., et al., *Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat*. *J Comp Neurol*, 2003. **457**(3): p. 213-35.
97. Begriche, K., G.M. Sutton, and A.A. Butler, *Homeostatic and non-homeostatic functions of melanocortin-3 receptors in the control of energy balance and metabolism*. *Physiol Behav*, 2011. **104**(4): p. 546-54.
98. de Backer, M.W., et al., *Melanocortin receptor-mediated effects on obesity are distributed over specific hypothalamic regions*. *Int J Obes (Lond)*, 2011. **35**(5): p. 629-41.
99. Toda, C., et al., *Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues*. *Diabetes*, 2009. **58**(12): p. 2757-65.
100. Kim, K.W., et al., *Steroidogenic factor 1 regulates expression of the cannabinoid receptor 1 in the ventromedial hypothalamic nucleus*. *Mol Endocrinol*, 2008. **22**(8): p. 1950-61.
101. Reguero, L., et al., *GABAergic and cortical and subcortical glutamatergic axon terminals contain CB1 cannabinoid receptors in the ventromedial nucleus of the hypothalamus*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e26167.
102. Jelsing, J., P.J. Larsen, and N. Vrang, *The effect of leptin receptor deficiency and fasting on cannabinoid receptor 1 mRNA expression in the rat hypothalamus, brainstem and nodose ganglion*. *Neurosci Lett*, 2009. **463**(2): p. 125-9.
103. Marsicano, G. and B. Lutz, *Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain*. *Eur J Neurosci*, 1999. **11**(12): p. 4213-25.
104. Marsicano, G., et al., *The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories*. *Nature*, 2002. **418**(6897): p. 530-4.
105. Yi, C.X., T. Scherer, and M.H. Tschoop, *Cajal revisited: does the VMH make us fat?* *Nat Neurosci*, 2011. **14**(7): p. 806-8.
106. Song, Z., et al., *Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus*. *Diabetes*, 2001. **50**(12): p. 2673-81.
107. Levin, B.E., et al., *Ventromedial hypothalamic glucokinase is an important mediator of the counterregulatory response to insulin-induced hypoglycemia*. *Diabetes*, 2008. **57**(5): p. 1371-9.
108. de Vries, M.G., M.A. Lawson, and J.L. Beverly, *Hypoglycemia-induced noradrenergic activation in the VMH is a result of decreased ambient glucose*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. **289**(4): p. R977-81.
109. Zhu, W., et al., *Glucose prevents the fall in ventromedial hypothalamic GABA that is required for full activation of glucose counterregulatory responses during hypoglycemia*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **298**(5): p. E971-7.

110. Tong, Q., et al., *Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia*. *Cell Metab*, 2007. **5**(5): p. 383-93.
111. Sims, J.S. and J.F. Lorden, *Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels*. *Behav Brain Res*, 1986. **22**(3): p. 265-81.
112. Valassi, E., M. Scacchi, and F. Cavagnini, *Neuroendocrine control of food intake*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008. **18**(2): p. 158-68.
113. Woods, S.C., *Signals that influence food intake and body weight*. *Physiol Behav*, 2005. **86**(5): p. 709-16.
114. Singru, P.S., et al., *Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety*. *Endocrinology*, 2007. **148**(2): p. 638-46.
115. Sanchez, E., et al., *Differential effects of refeeding on melanocortin-responsive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus*. *Endocrinology*, 2008. **149**(9): p. 4329-35.
116. Singru, P.S., et al., *Refeeding-Activated Glutamatergic Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus (PVN) Mediate Effects of Melanocortin Signaling in the Nucleus Tractus Solitarius (NTS)*. *Endocrinology*, 2012. **153**(8): p. 3804-14.
117. Nguyen, A.D., et al., *Y1 and y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e40191.
118. Wang, J., et al., *Neuropeptide Y Loses Its Orexigenic Effect in Rats with Lesions of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus*. *Endocr Res*, 2012.
119. Cota, D., et al., *Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function*. *Endocrinology*, 2007. **148**(4): p. 1574-81.
120. Cota, D., *The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity*. *J Neuroendocrinol*, 2008. **20 Suppl 1**: p. 35-8.
121. Crosby, K.M. and J.S. Bains, *The intricate link between glucocorticoids and endocannabinoids at stress-relevant synapses in the hypothalamus*. *Neuroscience*, 2012. **204**: p. 31-7.
122. Malcher-Lopes, R., et al., *Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release*. *J Neurosci*, 2006. **26**(24): p. 6643-50.
123. Tasker, J.G., *Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration*. *Obesity (Silver Spring)*, 2006. **14 Suppl 5**: p. 259S-265S.
124. Jelsing, J., et al., *Localization and phenotypic characterization of brainstem neurons activated by rimonabant and WIN55,212-2*. *Brain Res Bull*, 2009. **78**(4-5): p. 202-10.
125. Chapman, C.D., et al., *Paraventricular nucleus anandamide signaling alters eating and substrate oxidation*. *Neuroreport*, 2012. **23**(7): p. 425-9.
126. Fan, C.M., et al., *Expression patterns of two murine homologs of Drosophila single-minded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome*. *Mol Cell Neurosci*, 1996. **7**(1): p. 1-16.
127. Ema, M., et al., *Two new members of the murine Sim gene family are transcriptional repressors and show different expression patterns during mouse embryogenesis*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(10): p. 5865-75.
128. Michaud, J.L., et al., *Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1*. *Genes Dev*, 1998. **12**(20): p. 3264-75.
129. Acampora, D., et al., *Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene*. *Genes Dev*, 1999. **13**(21): p. 2787-800.
130. Michaud, J.L., et al., *Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(14): p. 1465-73.

131. Kublaoui, B.M., et al., *Sim1 haploinsufficiency impairs melanocortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(10): p. 2483-92.
132. Kublaoui, B.M., et al., *Oxytocin deficiency mediates hyperphagic obesity of Sim1 haploinsufficient mice*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(7): p. 1723-34.
133. Tolson, K.P., et al., *Postnatal Sim1 deficiency causes hyperphagic obesity and reduced Mc4r and oxytocin expression*. J Neurosci, 2010. **30**(10): p. 3803-12.
134. Duplan, S.M., et al., *Impact of Sim1 gene dosage on the development of the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus*. Eur J Neurosci, 2009. **30**(12): p. 2239-49.
135. Yang, C., et al., *Adenoviral-mediated modulation of Sim1 expression in the paraventricular nucleus affects food intake*. J Neurosci, 2006. **26**(26): p. 7116-20.
136. Kublaoui, B.M., et al., *SIM1 overexpression partially rescues agouti yellow and diet-induced obesity by normalizing food intake*. Endocrinology, 2006. **147**(10): p. 4542-9.
137. Bellinger, L.L. and L.L. Bernardis, *The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies*. Physiol Behav, 2002. **76**(3): p. 431-42.
138. Mountjoy, K.G., et al., *Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(10): p. 1298-308.
139. Enriori, P.J., et al., *Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance*. J Neurosci, 2011. **31**(34): p. 12189-97.
140. Pinos, H., et al., *Effects of undernourishment on the hypothalamic orexinergic system*. Physiol Behav, 2011. **102**(1): p. 17-21.
141. Zhu, G., et al., *Roles of dorsomedial hypothalamic cholecystokinin signaling in the controls of meal patterns and glucose homeostasis*. Physiol Behav, 2012. **105**(2): p. 234-41.
142. Bi, S., Y.J. Kim, and F. Zheng, *Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control*. Neuropeptides, 2012.
143. Yokosuka, M., et al., *Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake*. Physiol Behav, 1998. **64**(3): p. 331-8.
144. Guan, X.M., et al., *Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice*. Neuroreport, 1998. **9**(15): p. 3415-9.
145. 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.
146. Xin, X., L.H. Storlien, and X.F. Huang, *Hypothalamic c-fos-like immunoreactivity in high-fat diet-induced obese and resistant mice*. Brain Res Bull, 2000. **52**(4): p. 235-42.
147. Leininger, G.M., *Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via the lateral hypothalamus*. Physiol Behav, 2011. **104**(4): p. 572-81.
148. Petrovich, G.D., *Learning and the motivation to eat: forebrain circuitry*. Physiol Behav, 2011. **104**(4): p. 582-9.
149. Gomori, A., et al., *Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(3): p. E583-8.
150. Ludwig, D.S., et al., *Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2001. **107**(3): p. 379-86.
151. Shearman, L.P., et al., *Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats*. Eur J Pharmacol, 2003. **475**(1-3): p. 37-47.
152. Shimada, M., et al., *Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 670-4.

153. Alon, T. and J.M. Friedman, *Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons*. J Neurosci, 2006. **26**(2): p. 389-97.
154. Bittencourt, J.C., *Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain*. Gen Comp Endocrinol, 2011. **172**(2): p. 185-97.
155. Vrang, N., et al., *Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine-amphetamine-regulated transcript neurons*. J Neurosci, 1999. **19**(10): p. RC5.
156. 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.
157. Yoshimichi, G., et al., *Orexin-A regulates body temperature in coordination with arousal status*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(5): p. 468-76.
158. Yasuda, T., et al., *Dual regulatory effects of orexins on sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats*. Endocrinology, 2005. **146**(6): p. 2744-8.
159. Marston, O.J., et al., *Neuropeptide Y cells represent a distinct glucose-sensing population in the lateral hypothalamus*. Endocrinology, 2011. **152**(11): p. 4046-52.
160. Albrecht, U., *Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks*. Neuron, 2012. **74**(2): p. 246-60.
161. Eskin, A., *Identification and physiology of circadian pacemakers. Introduction*. Fed Proc, 1979. **38**(12): p. 2570-2.
162. Mikuriya, T.H., *Marijuana in medicine: past, present and future*. Calif Med, 1969. **110**(1): p. 34-40.
163. Mechoulam, R. and Y. Gaoni, *Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids*. Tetrahedron, 1965. **21**(5): p. 1223-9.
164. Mechoulam, R. and Y. Gaoni, *A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish*. J Am Chem Soc, 1965. **87**: p. 3273-5.
165. Howlett, A.C., *Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds*. Life Sci, 1984. **35**(17): p. 1803-10.
166. Howlett, A.C., J.M. Qualy, and L.L. Khachatrian, *Involvement of G_i in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs*. Mol Pharmacol, 1986. **29**(3): p. 307-13.
167. Devane, W.A., et al., *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol Pharmacol, 1988. **34**(5): p. 605-13.
168. Matsuda, L.A., et al., *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature, 1990. **346**(6284): p. 561-4.
169. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature, 1993. **365**(6441): p. 61-5.
170. Battista, N., et al., *The endocannabinoid system: an overview*. Front Behav Neurosci, 2012. **6**: p. 9.
171. Bermudez-Silva, F.J., et al., *The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning?* Pharmacol Biochem Behav, 2010. **95**(4): p. 375-82.
172. Gong, J.P., et al., *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain*. Brain Res, 2006. **1071**(1): p. 10-23.
173. Devane, W.A., et al., *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1946-9.
174. Mechoulam, R., et al., *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(1): p. 83-90.
175. Di Marzo, V., *The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation*. Pharmacol Res, 2009. **60**(2): p. 77-84.

176. Richard, D., B. Guesdon, and E. Timofeeva, *The brain endocannabinoid system in the regulation of energy balance*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(1): p. 17-32.
177. Chicca, A., et al., *Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes*. J Biol Chem, 2012.
178. Sidhpura, N. and L.H. Parsons, *Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior*. Neuropharmacology, 2011. **61**(7): p. 1070-87.
179. Rinaldi-Carmona, M., et al., *SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor*. FEBS Lett, 1994. **350**(2-3): p. 240-4.
180. Colombo, G., et al., *Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716*. Life Sci, 1998. **63**(8): p. PL113-7.
181. Croci, T., et al., *In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CBI receptors in human ileum*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(7): p. 1393-5.
182. Izzo, A.A., et al., *Defaecation, intestinal fluid accumulation and motility in rodents: implications of cannabinoid CBI receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999. **359**(1): p. 65-70.
183. Williams, C.M. and T.C. Kirkham, *Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CBI) receptors*. Psychopharmacology (Berl), 1999. **143**(3): p. 315-7.
184. Di Marzo, V., et al., *Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake*. Nature, 2001. **410**(6830): p. 822-5.
185. Jo, Y.H., et al., *Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit*. Neuron, 2005. **48**(6): p. 1055-66.
186. Cota, D., et al., *The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 423-31.
187. Ravinet Trillou, C., et al., *Anti-obesity effect of SR141716, a CBI receptor antagonist, in diet-induced obese mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **284**(2): p. R345-53.
188. Hildebrandt, A.L., D.M. Kelly-Sullivan, and S.C. Black, *Antiobesity effects of chronic cannabinoid CBI receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice*. Eur J Pharmacol, 2003. **462**(1-3): p. 125-32.
189. Bensaid, M., et al., *The cannabinoid CBI receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(4): p. 908-14.
190. Yoshida, R., et al., *Endocannabinoids selectively enhance sweet taste*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(2): p. 935-9.
191. Niki, M., et al., *Reciprocal modulation of sweet taste by leptin and endocannabinoids*. Results Probl Cell Differ, 2010. **52**: p. 101-14.
192. Matias, I., et al., *Endocannabinoids measurement in human saliva as potential biomarker of obesity*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42399.
193. Zbucki, R.L., et al., *Cannabinoids enhance gastric X/A-like cells activity*. Folia Histochem Cytobiol, 2008. **46**(2): p. 219-24.
194. Muccioli, G.G., et al., *The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis*. Mol Syst Biol, 2010. **6**: p. 392.
195. DiPatrizio, N.V., et al., *Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(31): p. 12904-8.
196. Gomez, R., et al., *A peripheral mechanism for CBI cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding*. J Neurosci, 2002. **22**(21): p. 9612-7.
197. Liu, J., et al., *Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice*. Gastroenterology, 2012. **142**(5): p. 1218-1228 e1.

198. Jourdan, T., et al., *Antagonism of peripheral hepatic cannabinoid receptor-1 improves liver lipid metabolism in mice: evidence from cultured explants*. *Hepatology*, 2012. **55**(3): p. 790-9.
199. Chanda, D., et al., *Cannabinoid receptor type 1 (CB1R) signaling regulates hepatic gluconeogenesis via induction of endoplasmic reticulum-bound transcription factor cAMP-responsive element-binding protein H (CREBH) in primary hepatocytes*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(32): p. 27971-9.
200. Heyman, E., et al., *The role of the endocannabinoid system in skeletal muscle and metabolic adaptations to exercise: potential implications for the treatment of obesity*. *Obes Rev*, 2012.
201. Di Marzo, V., F. Piscitelli, and R. Mechoulam, *Cannabinoids and endocannabinoids in metabolic disorders with focus on diabetes*. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(203): p. 75-104.
202. Perwitz, N., et al., *Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes*. *Diabetes Obes Metab*, 2010. **12**(2): p. 158-66.
203. Tam, J., et al., *Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance*. *Cell Metab*, 2012. **16**(2): p. 167-79.
204. Kirilly, E., X. Gonda, and G. Bagdy, *CB1 receptor antagonists: new discoveries leading to new perspectives*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012. **205**(1): p. 41-60.
205. Pang, Z., et al., *The central cannabinoid CB1 receptor is required for diet-induced obesity and rimonabant's antiobesity effects in mice*. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. **19**(10): p. 1923-34.
206. Herkenham, M., *Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections*. *NIDA Res Monogr*, 1991. **112**: p. 129-45.
207. Wittmann, G., et al., *Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus*. *J Comp Neurol*, 2007. **503**(2): p. 270-9.
208. Meister, B., *Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight*. *Physiol Behav*, 2007. **92**(1-2): p. 263-71.
209. van Dijk, G., et al., *The lateral hypothalamus: a site for integration of nutrient and fluid balance*. *Behav Brain Res*, 2011. **221**(2): p. 481-7.
210. Dockray, G.J., *The versatility of the vagus*. *Physiol Behav*, 2009. **97**(5): p. 531-6.
211. Di Marzo, V., A. Ligresti, and L. Cristino, *The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation*. *Int J Obes (Lond)*, 2009. **33 Suppl 2**: p. S18-24.
212. Hentges, S.T., M.J. Low, and J.T. Williams, *Differential regulation of synaptic inputs by constitutively released endocannabinoids and exogenous cannabinoids*. *J Neurosci*, 2005. **25**(42): p. 9746-51.
213. Hentges, S.T., *Synaptic regulation of proopiomelanocortin neurons can occur distal to the arcuate nucleus*. *J Neurophysiol*, 2007. **97**(5): p. 3298-304.
214. Verty, A.N., et al., *Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and melanocortin MCR-4 receptors in regulating food intake*. *Endocrinology*, 2004. **145**(7): p. 3224-31.
215. Matias, I., et al., *Regulation of hypothalamic endocannabinoid levels by neuropeptides and hormones involved in food intake and metabolism: insulin and melanocortins*. *Neuropharmacology*, 2008. **54**(1): p. 206-12.
216. Verty, A.N., et al., *Involvement of hypothalamic peptides in the anorectic action of the CB receptor antagonist rimonabant (SR 141716)*. *Eur J Neurosci*, 2009. **29**(11): p. 2207-16.

217. Osei-Hyiaman, D., et al., *Cocaine- and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamide*. *Neuroendocrinology*, 2005. **81**(4): p. 273-82.
218. Herkenham, M., et al., *Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study*. *J Neurosci*, 1991. **11**(2): p. 563-83.
219. Jamshidi, N. and D.A. Taylor, *Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats*. *Br J Pharmacol*, 2001. **134**(6): p. 1151-4.
220. Verty, A.N., I.S. McGregor, and P.E. Mallet, *Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol*. *Neuropharmacology*, 2005. **49**(8): p. 1101-9.
221. Di, S., et al., *Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism*. *J Neurosci*, 2003. **23**(12): p. 4850-7.
222. Patel, S., et al., *Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. *Endocrinology*, 2004. **145**(12): p. 5431-8.
223. Huang, H., et al., *Cannabinoids excite hypothalamic melanin-concentrating hormone but inhibit hypocretin/orexin neurons: implications for cannabinoid actions on food intake and cognitive arousal*. *J Neurosci*, 2007. **27**(18): p. 4870-81.
224. Morton, G.J., et al., *Central nervous system control of food intake and body weight*. *Nature*, 2006. **443**(7109): p. 289-95.
225. Lam, T.K., G.J. Schwartz, and L. Rossetti, *Hypothalamic sensing of fatty acids*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(5): p. 579-84.
226. Kalsbeek, A., et al., *Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1212**: p. 114-29.
227. Dieguez, C., et al., *Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins*. *Neuroendocrinology*, 2011. **94**(1): p. 1-11.
228. Lam, C.K., M. Chari, and T.K. Lam, *CNS regulation of glucose homeostasis*. *Physiology (Bethesda)*, 2009. **24**: p. 159-70.
229. Morrison, S.F., K. Nakamura, and C.J. Madden, *Central control of thermogenesis in mammals*. *Exp Physiol*, 2008. **93**(7): p. 773-97.
230. Wilson, R.I. and R.A. Nicoll, *Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses*. *Nature*, 2001. **410**(6828): p. 588-92.
231. Breivogel, C.S. and S.R. Childers, *The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors*. *Neurobiol Dis*, 1998. **5**(6 Pt B): p. 417-31.
232. Ravinet Trillou, C., et al., *CBI cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. **28**(4): p. 640-8.
233. Bellocchio, L., et al., *Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(3): p. 281-3.
234. Herling, A.W., et al., *Increased energy expenditure contributes more to the body weight-reducing effect of rimonabant than reduced food intake in candy-fed wistar rats*. *Endocrinology*, 2008. **149**(5): p. 2557-66.
235. Molhoj, S., et al., *Effect of the cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant on lipolysis in rats*. *Eur J Pharmacol*, 2010. **646**(1-3): p. 38-45.
236. Marsicano, G., et al., *CBI cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity*. *Science*, 2003. **302**(5642): p. 84-8.
237. Monory, K., et al., *The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus*. *Neuron*, 2006. **51**(4): p. 455-66.
238. Air, E.L., et al., *Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats*. *Endocrinology*, 2002. **143**(6): p. 2449-52.
239. Cota, D., et al., *The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity*. *J Neurosci*, 2008. **28**(28): p. 7202-8.

240. Jelsing, J., P.J. Larsen, and N. Vrang, *Identification of cannabinoid type 1 receptor expressing cocaine amphetamine-regulated transcript neurons in the rat hypothalamus and brainstem using in situ hybridization and immunohistochemistry*. Neuroscience, 2008. **154**(2): p. 641-52.
241. Tucci, S.A., et al., *The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(5): p. 520-3.
242. Kola, B., et al., *The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1797.
243. Scammell, T.E., et al., *Focal deletion of the adenosine A1 receptor in adult mice using an adeno-associated viral vector*. J Neurosci, 2003. **23**(13): p. 5762-70.
244. Kirik, D., et al., *Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system*. J Neurosci, 2000. **20**(12): p. 4686-700.
245. Berthoud, H.R., *Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss?* Curr Opin Neurobiol, 2011. **21**(6): p. 888-96.
246. Verty, A.N., A.M. Allen, and B.J. Oldfield, *The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(2): p. 254-61.
247. Nogueiras, R., et al., *The endocannabinoid system: role in glucose and energy metabolism*. Pharmacol Res, 2009. **60**(2): p. 93-8.
248. Cardinal, P., et al., *Hypothalamic CB1 Cannabinoid Receptors Regulate Energy Balance in Mice*. Endocrinology, 2012. **153**(9): p. 4136-43.
249. Majdic, G., et al., *Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity*. Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 607-14.
250. Kim, K.W., et al., *Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(26): p. 10673-8.
251. Dubreucq, S., et al., *Genetic dissection of the role of cannabinoid type-1 receptors in the emotional consequences of repeated social stress in mice*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(8): p. 1885-900.
252. Bloom, J.D., et al., *Disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate (CL 316,243). A potent beta-adrenergic agonist virtually specific for beta 3 receptors. A promising antidiabetic and antiobesity agent*. J Med Chem, 1992. **35**(16): p. 3081-4.
253. Yoshida, T., et al., *Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL 316,243, a highly specific beta 3-adrenoceptor agonist, in yellow KK mice*. Life Sci, 1994. **54**(7): p. 491-8.
254. Galie, M., et al., *Epithelial and mesenchymal tumor compartments exhibit in vivo complementary patterns of vascular perfusion and glucose metabolism*. Neoplasia, 2007. **9**(11): p. 900-8.
255. Favereaux, A., et al., *Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain*. EMBO J, 2011. **30**(18): p. 3830-41.
256. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
257. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
258. Bartness, T.J., C.H. Vaughan, and C.K. Song, *Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2010. **34 Suppl 1**: p. S36-42.

259. Bartness, T.J., et al., *Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **318**(1-2): p. 34-43.
260. Richard, D. and F. Picard, *Brown fat biology and thermogenesis*. Front Biosci, 2011. **16**: p. 1233-60.
261. Nicholls, D.G., *A history of UCP1*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 6): p. 751-5.
262. Kahn, S.E., et al., *Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and Islet beta-cell function as explanations for metabolic diversity*. J Nutr, 2001. **131**(2): p. 354S-60S.
263. Bingham, N.C., et al., *Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome*. Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2138-48.
264. Vong, L., et al., *Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons*. Neuron, 2011. **71**(1): p. 142-54.
265. Morris, J.A., C.L. Jordan, and S.M. Breedlove, *Sexual differentiation of the vertebrate nervous system*. Nat Neurosci, 2004. **7**(10): p. 1034-9.
266. Cao, J. and H.B. Patisaul, *Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors alpha and beta and Kiss1 in neonatal male and female rats*. J Comp Neurol, 2011. **519**(15): p. 2954-77.
267. Frederich, R.C., et al., *Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action*. Nat Med, 1995. **1**(12): p. 1311-4.
268. Banks, A.S., et al., *Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14563-72.
269. Chao, H., et al., *Type 2 corticotropin-releasing factor receptor in the ventromedial nucleus of hypothalamus is critical in regulating feeding and lipid metabolism in white adipose tissue*. Endocrinology, 2012. **153**(1): p. 166-76.
270. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 251-62.
271. Hoehn, K.L., et al., *Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity*. Cell Metab, 2010. **11**(1): p. 70-6.
272. Abu-Elheiga, L., et al., *Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2*. Science, 2001. **291**(5513): p. 2613-6.
273. Liang, H. and W.F. Ward, *PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism*. Adv Physiol Educ, 2006. **30**(4): p. 145-51.
274. Richard, D., *Energy expenditure: a critical determinant of energy balance with key hypothalamic controls*. Minerva Endocrinol, 2007. **32**(3): p. 173-83.
275. Maniam, J. and M.J. Morris, *The link between stress and feeding behaviour*. Neuropharmacology, 2012. **63**(1): p. 97-110.
276. Pandit, R., et al., *Neurobiology of overeating and obesity: the role of melanocortins and beyond*. Eur J Pharmacol, 2011. **660**(1): p. 28-42.
277. Wamsteeker, J.I. and J.S. Bains, *A synaptocentric view of the neuroendocrine response to stress*. Eur J Neurosci, 2010. **32**(12): p. 2011-21.
278. Doyon, C., et al., *Effects of rimonabant (SR141716) on fasting-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuronal activation in lean and obese Zucker rats*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3403-10.
279. Dubreucq, S., et al., *Cannabinoid type 1 receptors located on single-minded 1-expressing neurons control emotional behaviors*. Neuroscience, 2012. **204**: p. 230-44.
280. Balthasar, N., *Genetic dissection of neuronal pathways controlling energy homeostasis*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14 Suppl 5**: p. 222S-227S.
281. Kamiji, M.M. and A. Inui, *Neuropeptide y receptor selective ligands in the treatment of obesity*. Endocr Rev, 2007. **28**(6): p. 664-84.
282. Schreurs, M., F. Kuipers, and F.R. van der Leij, *Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome*. Obes Rev, 2010. **11**(5): p. 380-8.

283. Cota, D., et al., *Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27**(3): p. 289-301.
284. Cota, D., et al., *Antagonizing the cannabinoid receptor type 1: a dual way to fight obesity*. J Endocrinol Invest, 2003. **26**(10): p. 1041-4.
285. Nathan, P.J., et al., *Neuropsychiatric adverse effects of centrally acting antiobesity drugs*. CNS Neurosci Ther, 2011. **17**(5): p. 490-505.

Annexes

Hypothalamic CB₁ Cannabinoid Receptors Regulate Energy Balance in Mice

Pierre Cardinal, Luigi Bellocchio, Samantha Clark, Astrid Cannich, Matthias Klugmann, Beat Lutz, Giovanni Marsicano, and Daniela Cota

Energy Balance and Obesity Group (P.C., S.C., D.C.) and Endocannabinoids and Neuroadaptation Group (L.B., A.C., G.M.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 862, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, and Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale (P.C., L.B., S.C., A.C., G.M., D.C.), Unité 862, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; and Institute of Physiological Chemistry (M.K., B.L.), University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, D-55128 Mainz, Germany

Cannabinoid type 1 (CB₁) receptor activation is generally considered a powerful orexigenic signal and inhibition of the endocannabinoid system is beneficial for the treatment of obesity and related metabolic diseases. The hypothalamus plays a critical role in regulating energy balance by modulating both food intake and energy expenditure. Although CB₁ receptor signaling has been implicated in the modulation of both these mechanisms, a complete understanding of its role in the hypothalamus is still lacking. Here we combined a genetic approach with the use of adeno-associated viral vectors to delete the CB₁ receptor gene in the adult mouse hypothalamus and assessed the impact of such manipulation on the regulation of energy balance. Viral-mediated deletion of the CB₁ receptor gene in the hypothalamus led to the generation of Hyp-CB₁-KO mice, which displayed an approximately 60% decrease in hypothalamic CB₁ receptor mRNA levels. Hyp-CB₁-KO mice maintained on a normocaloric, standard diet showed decreased body weight gain over time, which was associated with increased energy expenditure and elevated β_3 -adrenergic receptor and uncoupling protein-1 mRNA levels in the brown adipose tissue but, surprisingly, not to changes in food intake. Additionally, Hyp-CB₁-KO mice were insensitive to the anorectic action of the hormone leptin (5 mg/kg) and displayed a time-dependent hypophagic response to the CB₁ inverse agonist rimonabant (3 mg/kg). Altogether these findings suggest that hypothalamic CB₁ receptor signaling is a key determinant of energy expenditure under basal conditions and reveal its specific role in conveying the effects of leptin and pharmacological CB₁ receptor antagonism on food intake. (*Endocrinology* 153: 4136–4143, 2012)

The hypothalamus is one of the main brain regions involved in the regulation of energy balance (1). Hormonal and nutrient signals are processed in the hypothalamus and inform the brain about the current and stored levels of fuel available for the organism (2, 3). In turn, hypothalamic neuronal circuits use this information to regulate caloric intake, energy expenditure, and peripheral lipid and glucose metabolism (4–7).

Among the chemical mediators involved in fine-tuning the activity of hypothalamic circuits, the endocannabinoids

play a central role. These fatty acid derivatives act as retrograde signals at the cannabinoid type 1 (CB₁) receptor to decrease neurotransmitter release at nerve terminals (8). Although hypothalamic CB₁ receptor expression is among the lowest in the brain (9), their activation shows high efficiency and leads to profound biological effects by modulating the activity of a wide variety of hypothalamic neuronal populations (10).

Extensive evidence suggests that CB₁ receptor activation is a powerful orexigenic signal and that inhibition of

the endocannabinoid system (ECS) is beneficial for the treatment of obesity and related metabolic diseases (10, 11). Mice lacking CB_1 (CB_1 -KO) are lean and resistant to diet-induced obesity (12, 13). Accordingly, synthetic compounds like the CB_1 inverse agonist rimonabant have shown potential for the treatment of obesity (10, 11).

During the past few years, we along with others have helped to determine that the ECS participates in the regulation of energy balance by engaging both central and peripheral mechanisms. However, although it is now established that CB_1 receptor signaling in the periphery participates in the metabolism and storage of nutrients (10, 11), a complete understanding of its role in the hypothalamus is still lacking. In addition, the relationship between CB_1 receptor signaling and food intake regulation might be more complex than what was initially thought because the well-known orexigenic effect of endocannabinoids depends on actions at CB_1 receptors located at the terminals of cortical glutamatergic neurons, whereas CB_1 receptor signaling on γ -aminobutyric acid–releasing (GABAergic) neurons suppresses food intake (14).

Recent studies have also suggested that the sustained body weight loss induced by chronic administration of CB_1 receptor antagonists or inverse agonists is mainly due to increased energy expenditure via stimulation of the sympathetic nervous system and consequent activation of lipolysis and fatty acid oxidation (15–18). Accordingly, conditional mutant mice lacking CB_1 in the forebrain, including the hypothalamus, and in sympathetic neurons are resistant to diet-induced obesity due to increased lipid oxidation and thermogenesis that result from an enhanced sympathetic tone (18).

In the present study, we sought to verify the overall impact of hypothalamic CB_1 receptor signaling on energy balance and in particular clarify how CB_1 receptor function in this brain structure might affect food intake and energy expenditure, the two main mechanisms through which hypothalamic circuits guarantee the maintenance of energy balance.

Materials and Methods

Animals

Fourteen-week-old male CB_1 -floxed (CB_1^{ff}) littermates (19) were used for the study. The mice were housed individually in standard plastic rodent cages, maintained on a 12-h light, 12-h dark cycle (lights off at 1300 h) with *ad libitum* access to pelleted chow (Standard Rodent Diet A03, 3.2 Kcal/g; SAFE, Augy, France) and water, unless otherwise specified.

All experiments were conducted in strict compliance with the European Union recommendations (2010/63/EU) and were approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (an-

imal experimentation authorization 3309004). At the end of the behavioral experiments, mice were killed by cervical dislocation and tissues processed for further analysis. The number of animals used for each experiment is detailed in the figure legends.

Adeno-associated virus-mediated deletion of the CB_1 receptor gene in the hypothalamus

Recombinant adeno-associated viral vectors expressing Cre recombinase (rAAV-Cre) or green fluorescent protein (rAAV-GFP) were prepared as previously described (20). CB_1^{ff} mice were anesthetized with ketamine and xylazine (0.01 ml/g body weight of a mixture of 2 ml of 5% ketamine, 0.5 ml of 2% xylazine, and 7.5 ml saline) and received an analgesic dose of buprenorphine (0.1 ml/mouse). 0.5 μ l of either rAAV-Cre or rAAV-GFP (titers 2×10^{12} viral genomes per milliliter) was injected bilaterally at 0.05 μ l/min by 9-mm-long injectors placed in 8-mm stainless steel guide cannulae in a stereotaxic apparatus, aiming at the ventromedial nucleus of hypothalamus (1.5 mm posterior to bregma, 0.5 mm lateral from midline, 5.7 mm below the surface of the skull). Both Hyp- CB_1 -WT and Hyp- CB_1 -KO mice quickly recovered from surgery, and their food intake and body weight were recorded daily for the length of the study. Feed efficiency was calculated over the period of the study as body weight gained per kilocalorie of energy intake.

Fluorescent *in situ* hybridization

Brains were isolated, quickly frozen on dry ice, and stored at -80 C until sectioning with a cryostat (14 μ m, Microm HM 500M; Microm Microtech, Francheville, France). Digoxigenin-labeled riboprobes against the mouse CB_1 receptor were prepared, and *in situ* hybridization was carried out as described (20). For signal amplification we used the TSA Plus System cyanine 3/fluorescein (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Blocking buffer TNB and wash buffer TNT were prepared according to the manufacturer's protocol. Slides were analyzed by epifluorescence microscopy (Leica, Nanterre, France).

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Hypothalamus and thalamus were bilaterally punched from the frozen brains using a cryocut and cylindrical brain punchers (Fine Science Tools, Foster City, CA; internal diameter 1.0 mm and 2.0 mm, respectively). Length of punches was approximately 1.7 mm (start: 0.58 mm from bregma). mRNA was extracted from punches and CB_1 receptor expression was measured by qPCR, as previously described (18). qPCR was also carried out on mRNA extracted from brown adipose tissue to assess levels of expression of uncoupling protein-1 (UCP-1) and β_3 -adrenergic receptors. Primers for *UCP-1* (GenBank accession no. NM_009463) were: AA-*adrenergic receptor* AAAGAGCTGATGAAGTCCAGACA (forward) and TCAGTATCTCTTCCCTCCAAGTTGCT (reverse); for β_3 -adrenergic receptor (GenBank accession no. NM_013462): CGA-CATGTTCCCTCCACAAATCA (forward) and TGGATTCCT-GCTCTCAAATAACC (reverse). The two housekeeping genes used were: *Ywhaz* (tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenase activation protein, ζ polypeptide) (GenBank accession no. NM_011740): CTTGTGAGGCTGTGACACA-AACA (forward) and CAAGAGTGTGCACGCAGACA (reverse); and *NonO* (non-Pit-Oct-Unc domain containing, octamer binding protein) (GenBank accession no. NM_023144):

CTGTCTGGTGCATTCCTGAACTAT (forward) and AGCTC-TGAGTTCATTTTCCCATG (reverse).

Food intake responses to rimonabant and leptin

For the food intake study with the CB₁ receptor inverse agonist rimonabant, mice were food deprived for 24 h and then given free access to a preweighed amount of standard chow. Thirty minutes before refeeding, the animals were injected ip with rimonabant (3 mg/kg, kindly obtained from the National Institute of Mental Health Chemical Synthesis and Drug Supply Program, Bethesda, MD) or vehicle (1.25% dimethyl sulfoxide, 1.25% Tween-80 in saline).

For the food intake study with leptin, the hoppers with chow were removed from the cages 1 h before the administration of the hormone [mouse recombinant leptin 5 mg/kg, ip, obtained from Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program (Torrance, CA)] or PBS, which occurred 4 h before the onset of the dark, when food hoppers were returned to the cages (21, 22).

Food intake was recorded 1, 2, and 24 h afterward. Body weight was measured immediately before and 24 h after the treatments. The leptin food intake study was performed twice, with a within-subject design in which mice received both treatments in counterbalanced order.

Indirect calorimetry

Mice were individually housed in metabolic chambers (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany) in which fluid, food intake, in-cage locomotor activity, and gas exchange could be monitored. After 72 h of acclimatization, O₂ consumption and CO₂ production were measured four times every 60 min for a total of 48 h to measure the gas exchange, respiratory quotient (RQ), and energy expenditure. Energy expenditure values were normalized to the body weight of the animals. Food and water intake were measured continuously by integration of scales inside the sealed cage environment. Simultaneously, home-cage locomotor activity was determined using a tridimensional infrared light beam system. Total locomotor activity was expressed as beam breaks in 48 h.

Statistics

Statistical analysis was performed using Statistica version 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK). All values are reported as means ± SEM. Data from qPCR, feed efficiency, and 24 h body weight changes were analyzed by ANOVA or by two-tailed Student's *t* tests. Body weight gain and changes in food intake across time were analyzed by repeated-measures ANOVA. Significant ANOVA were followed by Fisher least significant differences *post hoc* test. *P* < 0.05 denoted statistical significance.

Results

Effects of hypothalamic CB₁ receptor deletion on energy balance

To obtain a generalized deletion of the CB₁ receptor gene in hypothalamic neurons, we injected a Cre recombinase-expressing recombinant adeno-associated virus

(rAAV-Cre) into the hypothalamus of adult CB₁^{fl/fl} mice (19).

CB₁^{fl/fl} mice were randomly distributed into two groups with similar body weight (rAAV-GFP group: 27.05 ± 1.01 g; rAAV-Cre group: 26.43 ± 0.7 g, *P* > 0.05) before the intrahypothalamic delivery of rAAV-Cre or rAAV-GFP. The injection of rAAV-Cre led to the generation of Hyp-CB₁-KO mice, which were characterized by a 57.6 ± 9.34% decrease of CB₁ receptor mRNA expression in the hypothalamus compared with Hyp-CB₁-WT littermates generated by administering rAAV-GFP (Fig. 1A). No alteration in CB₁ receptor mRNA expression was observed in the adjacent thalamic punches after rAAV-Cre administration, suggesting that the procedure was adequately selective and targeted CB₁ receptor expression in the hypothalamus only (Fig. 1A). Deletion within the hypothalamus was widespread and not limited to a specific hypothalamic nucleus, as further confirmed by fluorescent *in situ* hybridization analysis (Fig. 1B). As previously reported in the literature (12, 23), CB₁ receptor mRNA was not expressed in the arcuate nucleus of Hyp-CB₁-WT mice (Fig. 1B).

Hyp-CB₁-KO mice showed a significant decrease in body weight gain compared with Hyp-CB₁-WT littermates (Fig. 2A, *P* = 0.01) on standard diet, whereas no significant changes in food intake were observed during the period of the study (Fig. 2B). In particular, at wk 9, when the body weight difference was the greatest, the food intake did not significantly differ between the two genotypes (FI Hyp-CB₁-WT: 5.44 ± 0.15 g *vs.* FI Hyp-CB₁-KO: 5.15 ± 0.14 g; *P* > 0.05; and Fig. 2B). Consequently, a significant decrease in feed efficiency became evident in Hyp-CB₁-KO (Fig. 2C, *P* = 0.01), which was associated with a significant increase in energy expenditure, present during both the dark and light phase of the diurnal cycle (Fig. 2D). Accordingly, Hyp-CB₁-KO mice had increased β₃-adrenergic receptor and UCP-1 mRNA levels in the brown adipose tissue (Fig. 2E), suggestive of enhanced peripheral sympathetic activation and thermogenesis. Conversely, total locomotor activity did not significantly differ between the two genotypes (Fig. 2F).

Effect of rimonabant administration in Hyp-CB₁-KO mice

The acute systemic administration of the CB₁ receptor inverse agonist rimonabant is known to decrease food intake and body weight by engaging both peripheral and central mechanisms (18, 24).

To verify the role of hypothalamic CB₁ receptor signaling in mediating rimonabant-induced anorexia, we administered the drug (3 mg/kg, ip) to 24-h-fasted Hyp-CB₁-WT and Hyp-CB₁-KO mice. Control and mutant

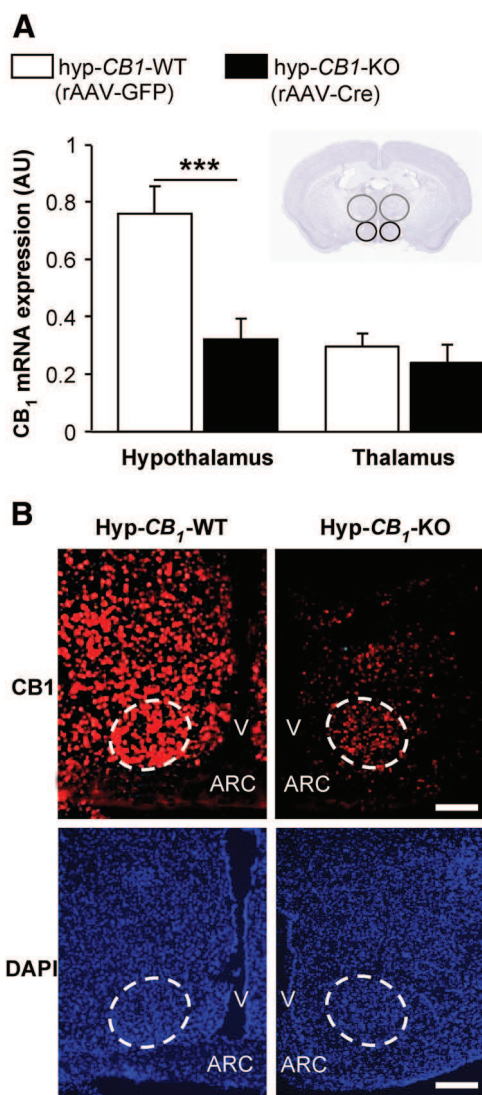


FIG. 1. A, CB₁ receptor mRNA expression [arbitrary units (AU)] in hypothalamic (black line) and thalamic (gray line) punches of *CB1^{fl/fl}* mice receiving either rAAV-GFP (Hyp-*CB1*-WT) or rAAV-Cre (Hyp-*CB1*-KO) into the hypothalamus (four and eight mice per group). B, Representative images taken at the level of the most rostral part of the ventromedial nucleus (dotted lines) of the hypothalamus from fluorescent *in situ* hybridization studies showing CB₁ receptor mRNA expression (red color) in Hyp-*CB1*-WT and Hyp-*CB1*-KO littermates (three mice per group). Nuclear counterstain carried out with DAPI. DAPI, 4',6'-Diamino-2-phenylindole; V, third ventricle; ARC, arcuate nucleus. Scale bar, 100 μ m. Data are expressed as mean \pm SEM. ***, $P < 0.005$.

mice comparably lost weight after the 24-h fast (body weight loss: Hyp-*CB1*-WT, 3.53 ± 0.17 g *vs.* Hyp-*CB1*-KO, 3.61 ± 0.12 g, $P > 0.05$). Rimonabant decreased 1-h-fast-induced food intake in both groups (Fig. 3A). However, although the appetite-suppressant effect of the drug was still present 24 h after refeeding in Hyp-*CB1*-WT mice, it was completely abolished in Hyp-*CB1*-KO littermates (Fig. 3B). Similarly, rimonabant reduced the 24-h, refeeding-induced body weight gain in Hyp-*CB1*-WT mice

but not in mice carrying the hypothalamic deletion of the *CB1* gene (Fig. 3C).

Effect of leptin administration in Hyp-*CB1*-KO mice

The adipocyte-derived hormone leptin negatively regulates CB₁ receptor signaling in the hypothalamus by decreasing endocannabinoids levels, and this reduction is believed to partially mediate the hypophagic effect of the hormone (25–27). Taking this evidence into account, we sought to verify the appetite-suppressant action of leptin in Hyp-*CB1*-WT and Hyp-*CB1*-KO littermates. As expected, Hyp-*CB1*-WT mice responded to the peripheral injection of leptin (5 mg/kg, ip) with a profound hypophagia. Surprisingly, however, this effect and the associated changes in body weight were fully blunted in Hyp-*CB1*-KO littermates (Fig. 4, A–C).

Discussion

The hypothalamus plays a critical role in regulating food intake and energy expenditure, and CB₁ receptor signaling has been involved in the modulation of both mechanisms participating in the maintenance of energy balance (10, 11). With the current study, we show that partial deletion of the *CB1* receptor gene in the adult mouse hypothalamus leads to an important decrease in body weight gain, a consequence of an increase in energy expenditure rather than a decrease in food intake.

This is an intriguing finding, considering the evidence in the literature on the role of hypothalamic CB₁ receptor signaling on food intake regulation. For instance, it is known that administration of the endocannabinoid anandamide within the ventromedial nucleus of the hypothalamus rapidly increases food intake in a CB₁ receptor-dependent manner (28). Similarly, the administration of the CB₁ receptor agonist Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the hypothalamic paraventricular nucleus induces hyperphagia through CB₁ receptor activation (29). Moreover, the orexigenic effect of the gastric hormone ghrelin, which is associated with an increase in hypothalamic endocannabinoid content, requires an intact CB₁ receptor signaling (30, 31). Besides, *CB1*-KO mice are slightly hypophagic, a phenomenon possibly related to the change in the expression levels of several hypothalamic neuropeptides known to affect food intake (12).

The current data, and in particular the lack of significant changes in food intake, could be explained taking into account that the technical approach chosen to delete the *CB1* receptor gene did not allow to selectively eliminate CB₁ receptor expression within a specific hypothalamic neuronal type. This is relevant, considering that different

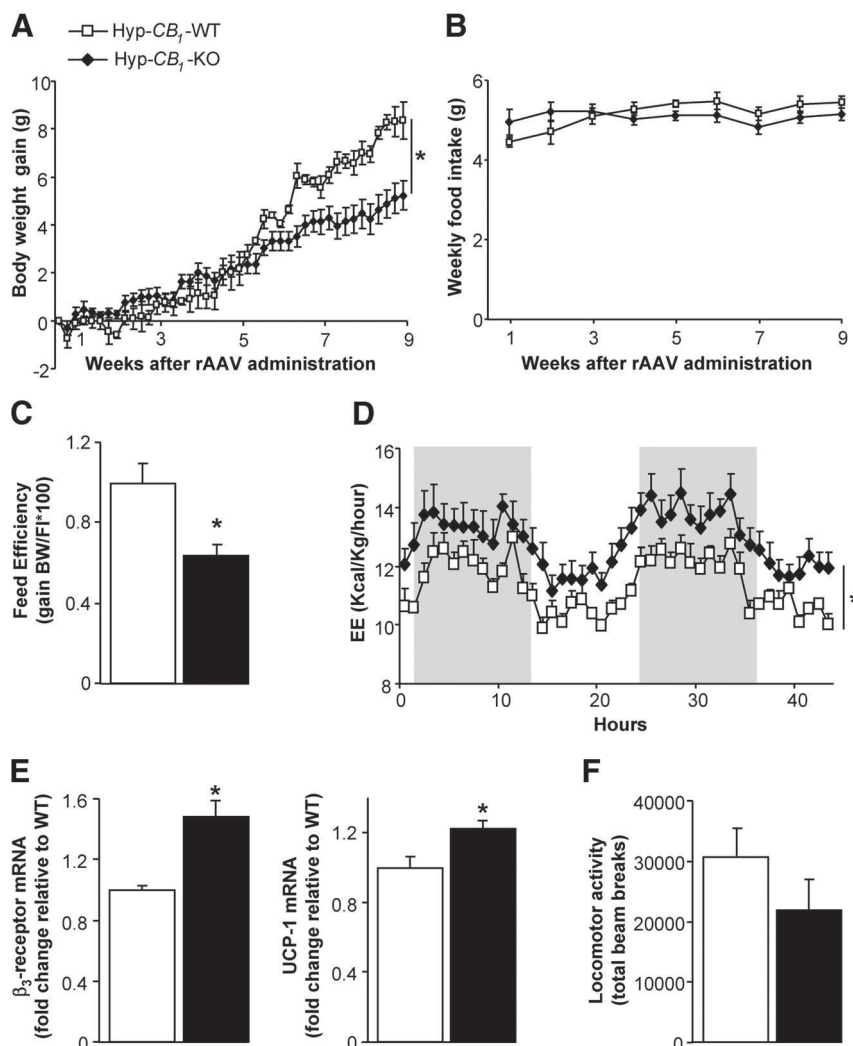


FIG. 2. Body weight gain (A), weekly mean food intake (B), and feed efficiency (C) in Hyp-CB₁-WT and Hyp-CB₁-KO littermates under standard diet (four and eight mice per group). D, Forty-eight-hour energy expenditure (EE) and total locomotor activity (F) in Hyp-CB₁-WT and Hyp-CB₁-KO littermates (five and six mice per group). E, β_3 -Adrenergic receptor and UCP-1 mRNA expression in the brown adipose tissue of Hyp-CB₁-WT and Hyp-CB₁-KO littermates under standard diet (four and five mice per group). Gray boxes in D represent the dark phase. Data are expressed as mean \pm SEM. *, $P < 0.05$.

hypothalamic neuronal populations have opposite roles in modulating food intake (1) and even more so if we consider recent findings illustrating the opposite effect that CB₁ receptor-dependent modulation of glutamatergic and GABAergic signaling has on food intake (14). Thus, the current study does not rule out a role for CB₁ receptors located on a specific hypothalamic cell population in the regulation of feeding behavior. Rather, it suggests that when CB₁ receptor expression is significantly decreased in the hypothalamus, irrespective of the cell type targeted by such an approach, it does not affect food intake, neither under basal nor under stimulated (fasting induced) conditions.

Additionally, due to the intrinsic limits of the diffusion of the vector (32, 33), viral gene targeting provides in-

complete deletion of the targeted genes, which could therefore explain the partial deletion of CB₁ receptor observed in the hypothalamus. Thus, it is possible that if a higher degree of CB₁ receptor gene deletion is reached, this might result in significant changes in feeding behavior. Lastly, it should also be mentioned that, again because of the characteristics of the vector used, it is unlikely that the rAAV-Cre affected CB₁ mRNA expression in the extrahypothalamic structures known to have a role in energy balance regulation, such as the nucleus accumbens or the ventral tegmental area (34).

Unlike food intake, energy expenditure, the other major contributor to the maintenance of energy balance, shows important changes after hypothalamic CB₁ receptor gene down-regulation and explains the decreased body weight gain observed in Hyp-CB₁-KO mice. Thus, the most probable cause of the observed decrease in body weight gain after viral deletion of CB₁ receptor gene in the hypothalamus is the increased dissipation of energy. Interestingly, recent data suggest that deletion of the CB₁ receptor gene in principal fore-brain neurons (including the hypothalamus) and sympathetic neurons is accompanied by changes in energy balance regulation due to a general increase in the sympathetic tone (18). Accordingly, we found that Hyp-CB₁-KO mice had increased β_3 -adrenergic receptor

and UCP-1 mRNA levels in the brown adipose tissue, suggestive of enhanced peripheral sympathetic activation and thermogenesis. Altogether the present findings suggest that hypothalamic CB₁ receptors exert an overall control of energy expenditure, likely by indirectly modulating the activity of the sympathetic nervous system.

This interpretation is in agreement with several recent studies pointing to a functional relationship between CB₁ receptor signaling and the sympathetic nervous system. Indeed, acute or chronic administration of CB₁ receptor antagonists or inverse agonists increases energy expenditure and sympathetic tone, an effect required to induce thermogenesis in the brown adipose tissue and lipolysis in the white adipose tissue (16–18, 35). Taken together, previous and present data suggest that CB₁ receptor expres-

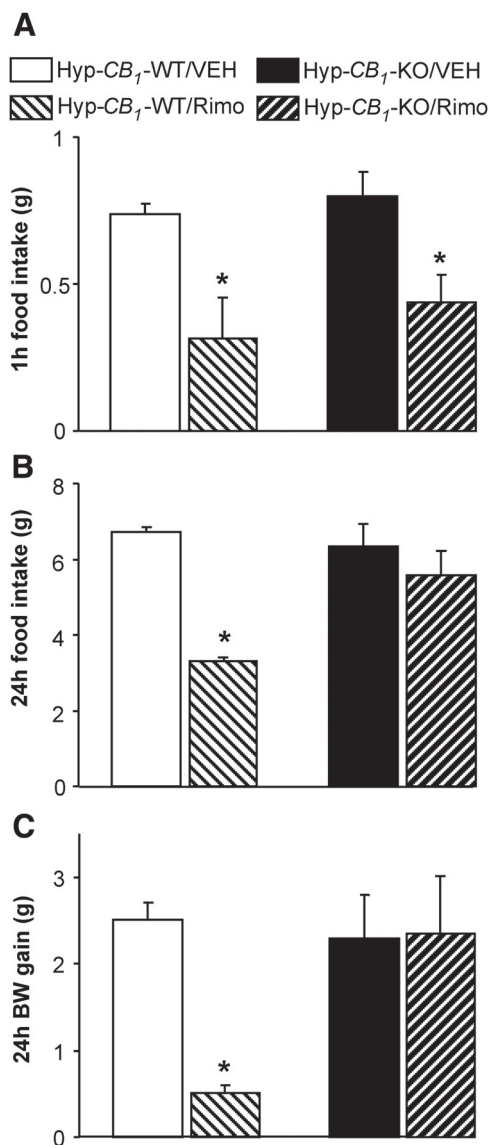


FIG. 3. Effect of the acute systemic administration of the *CB*₁ receptor inverse agonist rimonabant (Rimo; 3 mg/kg, ip) or its vehicle (VEH) on 1 h (A) and 24 h (B) fasting-induced food intake and on 24 h body weight (BW) gain in Hyp-*CB*₁-WT and Hyp-*CB*₁-KO littermates (four mice per group). Data are expressed as mean ± SEM. *, *P* < 0.05.

sion in the hypothalamus is necessary to control energy expenditure and to maintain body weight, likely through the regulation of the peripheral noradrenergic tone.

Remarkably, the present findings were generated using mice maintained on a normocaloric diet, and, as mentioned before, the deletion of *CB*₁ receptor in the hypothalamus was partial. This implies that in conditions under which an overactivation of the ECS is observed, such as during exposure to a high-fat diet or when complete deletion of hypothalamic *CB*₁ receptor is obtained, even more striking effects might be observed on energy expenditure.

We then went on to verify whether the well-described anorectic effect of the *CB*₁ receptor inverse agonist ri-

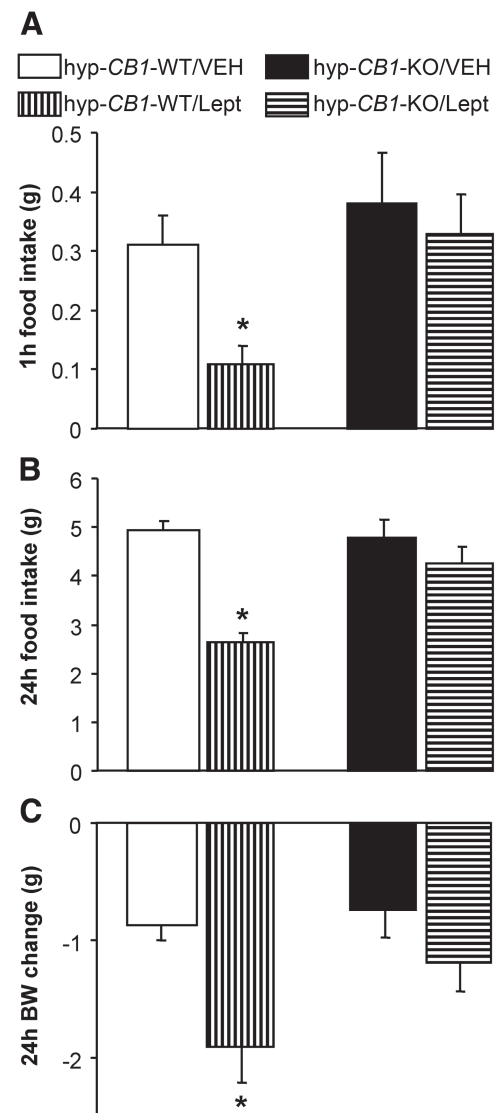


FIG. 4. Effect of the acute systemic administration of leptin (Lept; 5 mg/kg, ip) or its vehicle (VEH) on 1 h (A) and 24 h (B) food intake and on 24-h body weight (BW) change in Hyp-*CB*₁-WT and Hyp-*CB*₁-KO littermates (four and eight mice per group). Data are expressed as mean ± SEM. *, *P* < 0.05.

monabant depends on *CB*₁ receptors located in the hypothalamus.

Interestingly, we observed that during the first hour of fasting-induced food intake rimonabant comparably induced hypophagia in both Hyp-*CB*₁-WT and Hyp-*CB*₁-KO littermates. However, rimonabant significantly decreased 24-h food intake and body weight gain in the control group but not in the mice carrying the partial hypothalamic deletion of the *CB*₁ receptor gene. This suggests that two distinct biological components temporally participate in determining rimonabant-induced hypophagia. The first component, which is rapidly engaged by peripheral administration of the compound, could be mediated by specific hypothalamic subpopulations or be of

extrahypothalamic nature because it was not altered by the partial deletion of CB₁ receptors in the hypothalamus. Accordingly, in 2002, a study by Gomez *et al.* (24) revealed a role for peripheral CB₁ receptor signaling in determining the rapid decrease in food intake observed soon after rimonabant administration. The second component, which is recruited later on and integrates information coming from peripheral nerve terminals and the brain stem as well as possibly from the bloodstream, is of hypothalamic origin because the effects on food intake or body weight change in Hyp-CB₁-KO mice were no longer evident 24 h after the administration of rimonabant.

Unlike rimonabant, the anorectic action of the adipocyte-derived hormone leptin primarily depends on its ability to target several central nervous system structures involved in food intake regulation, including different hypothalamic nuclei, the midbrain, and the brain stem (36).

The relationship between leptin and the ECS has been intensely investigated in recent years. In particular, it is known that the hormone inhibits hypothalamic endocannabinoid production and neuromodulatory function (25–27), and mutant animals lacking leptin, like *ob/ob* mice, or with defective leptin signaling, like *db/db* mice, have elevated endocannabinoid levels in the hypothalamus (25).

We therefore tested whether leptin would be able to affect food intake in mice with decreased hypothalamic expression of CB₁ receptor mRNA. Surprisingly, we observed that leptin was unable to modulate food intake at any of the studied time points. This suggests that functional CB₁ receptor signaling within the hypothalamus is required by the hormone to affect food intake and body weight. Again, because of the limitation of the technique used, we are unable to establish at present the specific neuronal populations involved in this phenomenon. Future studies will have also to clarify whether the observed resistance to the exogenous administration of leptin is the result of a direct alteration of leptin-dependent signaling in the hypothalamus. Nevertheless, the current data point to the existence of a functional link between leptin and the ECS that might be more complex than initially predicted and that implies a permissive role for hypothalamic CB₁ receptor signaling in mediating acute effects of leptin on food intake and body weight. Thus, whereas leptin inhibits endocannabinoid production, hypothalamic functional CB₁ receptor signaling is apparently necessary for the appetite-suppressant action of the hormone.

Overall, the present findings provide evidence of a direct role of hypothalamic CB₁ receptor signaling in energy balance, in particular pointing to its critical involvement in the regulation of energy expenditure.

Acknowledgments

We thank Nathalie Aubailly and the personnel of the Animal Facilities of the NeuroCentre Magendie for mouse caring, the personnel of the Neurocentre Magendie qPCR platform, Ruth Jelinek for viral preparations, and Loic Vaillier for assistance with rAAV intrahypothalamic administration.

Address all correspondence and requests for reprints to: Daniela Cota, M.D., Group Energy Balance and Obesity, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 862, Neurocentre Magendie, 146 Rue Léo Saignat, F-33077 Bordeaux, France. E-mail: daniela.cota@inserm.fr.

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/AVENIR (to D.C., G.M.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/interface (to D.C.), Aquitaine Region (to D.C., G.M.), European Foundation for the Study of Diabetes-Sanofi Aventis (to D.C., G.M.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Aquitaine Region PhD fellowship (P.C.), Grant EU-FP7 HEALTH-F2-2008-223713 Reprobesity (to B.L., G.M.), and Grant EU-FP7 ENDO-FOOD ERC-2010-StG (to G.M.).

Present address for M.K.: Translational Neuroscience Facility, Department of Physiology, School of Medical Sciences, University of New South Wales, Sydney, New South Wales, Australia.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW 2006 Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289–295
- Lam TK, Schwartz GJ, Rossetti L 2005 Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 8:579–584
- Cota D, Proulx K, Seeley RJ 2007 The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology* 132:2158–2168
- Kalsbeek A, Bruinstroop E, Yi CX, Klieverik LP, La Fleur SE, Fliers E 2010 Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Ann NY Acad Sci* 1212:114–129
- Dieguez C, Vazquez MJ, Romero A, Lopez M, Nogueiras R 2011 Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins. *Neuroendocrinology* 94:1–11
- Lam CK, Chari M, Lam TK 2009 CNS regulation of glucose homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 24:159–170
- Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ 2008 Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* 93:773–797
- Wilson RI, Nicoll RA 2001 Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588–592
- Breivogel CS, Childers SR 1998 The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 5:417–431
- Bermudez-Silva FJ, Cardinal P, Cota D 2012 The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *J Psychopharmacol* 26:114–124
- Quarta C, Mazza R, Obici S, Pasquali R, Pagotto U 2011 Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. *Trends Mol Med* 17:518–526
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B,

- Stalla GK, Pagotto U 2003 The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112:423–431
13. Ravinet Trillou C, Delgorgé C, Menet C, Armone M, Soubrié P 2004 CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:640–648
 14. Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, Chaouloff F, Piazza PV, Marsicano G 2010 Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13:281–283
 15. Herling AW, Kilp S, Elvert R, Haschke G, Kramer W 2008 Increased energy expenditure contributes more to the body weight-reducing effect of rimonabant than reduced food intake in candy-fed Wistar rats. *Endocrinology* 149:2557–2566
 16. Molhoj S, Hansen HS, Schweiger M, Zimmermann R, Johansen T, Malmlof K 2010 Effect of the cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant on lipolysis in rats. *Eur J Pharmacol* 646:38–45
 17. Bajzer M, Olivieri M, Haas MK, Pfluger PT, Magrisso IJ, Foster MT, Tschöp MH, Krawczewski-Carhuatanta KA, Cota D, Obici S 2011 Cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonism enhances glucose utilisation and activates brown adipose tissue in diet-induced obese mice. *Diabetologia* 54:3121–3131
 18. Quarta C, Bellocchio L, Mancini G, Mazza R, Cervino C, Braulke LJ, Fekete C, Latorre R, Nanni C, Bucci M, Clemens LE, Heldmaier G, Watanabe M, Leste-Lassere T, Maitre M, Tedesco L, Fanelli F, Reuss S, Klaus S, Srivastava RK, Monory K, Valerio A, Grandis A, De Giorgio R, Pasquali R, Nisoli E, Cota D, Lutz B, Marsicano G, Pagotto U 2010 CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metab* 11:273–285
 19. Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B 2003 CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302:84–88
 20. Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westebroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, Düring M, Klugmann M, Wölfel B, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B 2006 The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51:455–466
 21. Air EL, Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC 2002 Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. *Endocrinology* 143:2449–2452
 22. Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ 2008 The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci* 28:7202–7208
 23. Jelsing J, Larsen PJ, Vrang N 2008 Identification of cannabinoid type 1 receptor expressing cocaine amphetamine-regulated transcript neurons in the rat hypothalamus and brainstem using *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Neuroscience* 154:641–652
 24. Gómez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao A, Del Arco I, Cippitelli A, Nava F, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F 2002 A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci* 22:9612–9617
 25. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G 2001 Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410:822–825
 26. Jo YH, Chen YJ, Chua Jr SC, Talmage DA, Role LW 2005 Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* 48:1055–1066
 27. Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng FJ, Stuart CT, Bazan NG, Tasker JG 2006 Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J Neurosci* 26:6643–6650
 28. Jamshidi N, Taylor DA 2001 Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 134:1151–1154
 29. Verty AN, McGregor IS, Mallet PE 2005 Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology* 49:1101–1109
 30. Tucci SA, Rogers EK, Korbonits M, Kirkham TC 2004 The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br J Pharmacol* 143:520–523
 31. Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F, Harvey-White J, Liposits Z, Kunos G, Grossman AB, Fekete C, Korbonits M 2008 The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* 3:e1797
 32. Scammell TE, Arrigoni E, Thompson MA, Ronan PJ, Saper CB, Greene RW 2003 Focal deletion of the adenosine A1 receptor in adult mice using an adeno-associated viral vector. *J Neurosci* 23:5762–5770
 33. Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A, Mandel RJ 2000 Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci* 20:4686–4700
 34. Berthoud HR 2011 Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 21:888–896
 35. Verty AN, Allen AM, Oldfield BJ 2009 The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 17:254–261
 36. Gautron L, Elmquist JK 2011 Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest* 121:2087–2093

The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance

Francisco Javier Bermudez-Silva^{1,2,3,4}, Pierre Cardinal^{1,2} and Daniela Cota^{1,2}

Journal of Psychopharmacology
26(1) 114–124
© The Author(s) 2012
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0269881111408458
jop.sagepub.com



Abstract

Animal and human studies carried out so far have established a role for the endocannabinoid system (ECS) in the regulation of energy balance. Here we critically discuss the role of the endocannabinoid signalling in brain structures, such as the hypothalamus and reward-related areas, and its interaction with neurotransmitter and neuropeptide systems involved in the regulation of food intake and body weight. The ECS has been found to interact with peripheral signals, like leptin, insulin, ghrelin and satiety hormones and the resulting effects on both central and peripheral mechanisms affecting energy balance and adiposity will be described. Furthermore, ECS dysregulation has been associated with the development of dyslipidemia, glucose intolerance and obesity; phenomena that are often accompanied by a plethora of neuroendocrine alterations which might play a causal role in determining ECS dysregulation.

Despite the withdrawal of the first generation of cannabinoid type 1 receptor (CB1) antagonists from the pharmaceutical market due to the occurrence of psychiatric adverse events, new evidence suggests that peripherally restricted CB1 antagonists might be efficacious for the treatment of obesity and its associated metabolic disorders. Thus, a perspective on new promising strategies to selectively target the ECS in the context of energy balance regulation is given.

Keywords

CB1, central nervous system, endocannabinoid, energy balance, food intake, hypothalamus, obesity, reward circuits

Introduction

The central nervous system (CNS) is critical for the coordination of the molecular, metabolic and behavioural mechanisms ensuring that the right nutrients get to the tissues when they need them. A complex and integrated neuronal network receives and integrates information about the type and quantity of nutrients recently ingested through the gastrointestinal tract, coordinates the use of energy substrates across various organs, monitors stored levels of energy in the adipose tissue and responds to external cues informing about food availability and palatability, thus regulating food intake.

Two major categories of signals that arise from the periphery have important effects on CNS circuits controlling energy balance. The first category is given by ‘adiposity’ signals, which include the hormones leptin and insulin, and that are able to inform the brain about levels of stored energy in the body (Morton et al., 2006). An important feature of adiposity signals is their ability to directly access key structures in the brain and therefore influence energy homeostasis. The second category includes satiety signals that consist of several hormones produced in the gastrointestinal tract, like cholecystokinin (CCK), glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and peptide YY (PYY), whose levels rise during the meal and help determine satiety and consequent meal termination (Strader and Woods, 2005). An exception to this category of signals is the

gastric hormone ghrelin, which increases before meals and favours food intake and body weight gain (Wiedmer et al., 2007).

Recent evidence has also highlighted how nutrients, and particularly glucose, long-chain fatty acids and certain types of amino acids, might work as signals directly informing the CNS about the status of currently available energy (Cota et al., 2007; Lam et al., 2005; Xue and Kahn, 2006).

In addition, several neurotransmitters and neuropeptides contribute to energy balance regulation, by transferring

¹INSERM U862, Avenir group ‘Energy Balance and Obesity’, Bordeaux, France.

²Université de Bordeaux 2, Bordeaux, France.

³Fundacion IMABIS, Hospital Carlos Haya de Malaga, Laboratorio de Medicina Regenerativa, Malaga, Spain.

⁴CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Santiago de Compostela, Spain.

Corresponding author:

Daniela Cota, INSERM U862, Avenir Group ‘Energy Balance and Obesity’, NeuroCentre François Magendie, Université de Bordeaux 2, 146 Rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux, France
Email: daniela.cota@inserm.fr

information among different neuronal circuits. Some of these latter signals are derived from modified amino acids, like glutamate and γ -aminobutyric acid (GABA), or biogenic amines, like catecholamines, serotonin and acetylcholine. Others are constituted by simple chains of amino acids; while certain types of lipids, like steroids, have been long known to work as CNS signalling molecules. Among the lipid-derived molecules that work as intercellular signals able to affect energy balance regulation, we now also have to include the endocannabinoids, fatty acid derivatives that within the CNS work as local neuromodulators able to directly regulate rate of release of classical neurotransmitters.

The appetite-inducing effects of marijuana (*Cannabis sativa*) have been known for centuries. However, these effects were seriously taken into consideration in research only after the discovery of the endogenous cannabinoid system (ECS), which provided a physiological substrate for the action of marijuana and its derivatives. This system includes at least two cannabinoid receptors, specific endogenous ligands, called endocannabinoids, and their biosynthesis and degradation pathways (Di Marzo, 2009; Katona and Freund, 2008).

The first cannabinoid receptor or CB1 was identified and cloned after screening for the affinity of already characterized orphan G-protein coupled receptors to the main psychoactive component of marijuana, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990). The second cannabinoid receptor or CB2 was cloned soon thereafter (Munro et al., 1993). Both are metabotropic receptors coupled to G-proteins of the Gi/o type and their transduction systems include the modulation of several intracellular pathways (reviewed by Howlett et al., 2002). Among the two receptors discovered so far, CB1 has been widely investigated for its role in energy balance regulation (Di Marzo et al., 2009a; Pagotto et al., 2006), emerging as a potential target for the treatment of obesity (Cota, 2007; Di Marzo, 2008).

CB1 is widely expressed in the brain, including areas associated with the regulation of energy homeostasis, like the hypothalamus, the brainstem and the cortico-limbic system, and is also present in metabolically relevant peripheral organs, such as the liver, pancreas, muscle and adipose tissue (Di Marzo et al., 2009a; Pagotto et al., 2006).

Endocannabinoids are polyunsaturated fatty acids derivatives. So far, at least 5 endocannabinoids have been identified, of which the N-ethanolamide of arachidonic acid, also known as anandamide, and the glyceryl ester of arachidonic acid or 2-arachidonoylglycerol (2-AG) are the best characterized. Anandamide and 2-AG biosynthesis involves cell membrane phospholipids and specific enzymes (Di Marzo, 2009; Katona and Freund, 2008). Within the CNS, endocannabinoids are released immediately after their synthesis, act on CB1 mainly located presynaptically and are thereafter immediately metabolized (Di Marzo, 2009; Katona and Freund, 2008). Their degradation requires cellular reuptake and enzymatic hydrolysis, which is under the control of a fatty acid amide hydrolase (FAAH) for anandamide, and a monoacylglycerol lipase (MAGL) for 2-AG (Di Marzo, 2009; Katona and Freund, 2008). Although a putative transporter has not been identified yet, there are several synthetic compounds that are considered inhibitors of endocannabinoid cellular reuptake (Di Marzo, 2009).

As briefly mentioned before, the ECS has attracted the attention of researchers working in the field of energy balance regulation, since synthetic compounds like the CB1 antagonist/inverse agonist rimonabant have shown potential for the treatment of diet-induced obesity. Indeed, chronic pharmacological blockade of CB1 in animal models of obesity and in humans not only decreases food intake and body weight, but also improves lipid metabolism and insulin sensitivity (Cota, 2007; Di Marzo and Despres, 2009). These observations are in agreement with data obtained from mice lacking CB1 (CB1^{-/-}), which clearly demonstrated that the ECS is an essential endogenous regulator of energy balance and peripheral metabolism, whose actions on food intake and body weight are dependent upon the functional expression and activity of CB1 (Cota et al., 2003). Unfortunately, the initial enthusiasm for the clinical use of rimonabant (commercial name Acomplia) faded away because of the important psychiatric side effects reported, which led to its withdrawal from the European market in January 2009 (European Medicines Agency, 2009). Nevertheless, it is clear that a better knowledge of the broad mode of action of the ECS will potentially allow targeting the system in a more selective and specific way, thus outweighing or reducing possible side effects. This review therefore provides an overview of the recent advancements made in understanding the role of this system in the neuroendocrine regulation of energy balance.

The ECS, hypothalamic circuits and energy balance regulation

Endocannabinoids and CB1 are produced and expressed in the hypothalamus (Bisogno et al., 1999; Herkenham et al., 1991), one of the main brain areas involved in the regulation of energy balance (Morton et al., 2006). Remarkably, although hypothalamic CB1 expression is among the lowest in the brain, activation of the receptors shows high efficiency and leads to profound effects (Breivogel and Childers, 1998).

First evidence of a role for the ECS in the hypothalamic control of food intake came from studies demonstrating that the systemic administration of Δ^9 -THC facilitated eating elicited by electrical stimulation of the lateral hypothalamus (LH) (Trojnar and Wise, 1991). In fact, peripheral as well as intra-hypothalamic administration of endocannabinoids or CB1 agonists increases food intake in rodents, an effect that is prevented by pre-treating the animals with a CB1 antagonist (Cota, 2007). In addition, hypothalamic 2-AG levels are inversely correlated to the body's energy status, increasing during fasting and declining during refeeding (Kirkham et al., 2002).

It is now well established that the activation of arcuate nucleus (ARC) neurons expressing pro-opiomelanocortin (POMC) and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) decreases food intake and body weight (Cone, 2005; Morton et al., 2006). Whereas, activation of ARC neurons co-expressing neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP) increases food intake and body weight (Cone, 2005; Morton et al., 2006). Furthermore, these neuronal populations can easily sense hormonal and nutrient

signals coming from the periphery (Cota et al., 2007; Lam et al., 2005; Xue and Kahn, 2006).

POMC and AgRP produced in the ARC oppositely regulate the activity of melanocortin receptors located in the paraventricular nucleus (PVN), all together constituting the hypothalamic melanocortin system (Cone, 2005). CB1 is expressed on GABAergic terminals entering the ARC and POMC cells constitutively produce endocannabinoids, which inhibit GABA release onto POMC neurons (Hentges et al., 2005); an effect that is, however, present only on a distinct set of POMC dendrites that extend into preoptic hypothalamic regions (Hentges, 2007). The food intake effects of either CB1 agonists or antagonists do not require the melanocortin system; conversely the intracerebroventricular (icv) administration of a CB1 antagonist attenuates the orexigenic effect of melanocortin antagonists, suggesting that CB1 acts downstream from melanocortin receptors (Verte et al., 2004). Melanocortin agonists administered icv do not alter hypothalamic anandamide or 2-AG levels (Matias et al., 2008b). While central administration of melanocortin receptor antagonists produces a delayed increase in hypothalamic endocannabinoid levels (Matias et al., 2008b).

Using a rat hypothalamic explant model, it was also shown that anandamide increases NPY secretion, an effect dependent upon CB1 activation and consistent with the ability of endocannabinoids to stimulate food intake (Gamber et al., 2005). However, the CB1 antagonist rimonabant is equally active at reducing food intake in wild type and NPY null mice (Di Marzo et al., 2001), making it unlikely that endocannabinoids modulate food intake through NPY.

Within the PVN, glucocorticoids, which have a known orexigenic action, rapidly inhibit magnocellular (which produce vasopressin and oxytocin) and parvocellular (which produce CRH and thyrotropin-releasing hormone) neurons by suppressing excitatory glutamatergic synaptic inputs through retrograde release of endocannabinoids and CB1 activation (Tasker, 2006). Thus, glucocorticoids use a fast-feedback mechanism relying on the activation of a specific glucocorticoid membrane receptor, which leads to the modulation of neuroendocrine responses involved in stress and energy balance regulation via the ECS (Tasker, 2006).

Orexins and melanin-concentrating hormone (MCH) neurons located in the LH have been also implicated in the regulation of energy balance (Morrison and Berthoud, 2007). In particular, orexin neurons might affect feeding behaviour by modulating arousal (Yamanaka et al., 2003). Interestingly, *in vitro* studies have shown that CB1 and orexin-1 receptors are present as heterodimers/oligomers in intracellular vesicles and that treatment with the CB1 antagonist rimonabant blocks the ability of orexin A to activate intracellular pathways under the control of the orexin receptor (Ellis et al., 2006). Furthermore, and similarly to what has already reported about glucocorticoids action in the PVN, the ability of both orexins and MCH to modulate neuronal excitability seems mediated by retrograde endocannabinoid release (Haj-Dahmane and Shen, 2005; Jo et al., 2005). Using patch-clamp recording, Huang et al. (2007) have recently found that CB1 agonists inhibit orexin neurons while exciting MCH neurons. These two opposite actions, which are CB1 dependent, are

respectively due to the attenuation of presynaptic glutamate and GABA.

As a result, the effects of endocannabinoids as well as of CB1 agonists and antagonists on energy balance might be mediated by several of the neuronal circuits and neuropeptides described above. For instance, acute intraperitoneal administration of rimonabant (5 mg/kg) reduces food intake and induces *c-fos* (a marker of early neuronal activation) expression in several hypothalamic nuclei, including the ARC, the PVN and the LH (Verte et al., 2009b).

Figure 1 summarizes the functional relationship of the ECS, hypothalamic circuits and some peripheral signals participating in energy balance regulation.

Clearly, the hypothalamus is not the only CNS structure involved in such regulation. Information concerning the availability and variety of food is processed in cortico-limbic areas, which modulate responses to rewarding stimuli (Berridge et al., 2010; Morrison and Berthoud, 2007). The relationship between the ECS and the reward-related circuits will be briefly illustrated in the following section.

The ECS, reward circuits and energy balance regulation

The reward system able to process and integrate 'liking' (pleasure/palatability) and 'wanting' (appetite/incentive motivation) perceptions associated with the availability and variety of food, comprises a series of synaptically interconnected circuits linking the prefrontal cortex, the amygdala, the ventral tegmental area (VTA), the nucleus accumbens (NAc) and the ventral pallidum. This integrated network connects forebrain, hindbrain and midbrain areas with hypothalamic areas and is thus able to modulate feeding behaviour (Berridge et al., 2010).

Similar to what has already been reported for the hypothalamus, fasting raises endocannabinoid levels in the rat limbic forebrain structures, including the NAc (Kirkham et al., 2002). Furthermore, direct administration of 2-AG into the NAc shell, an area strongly linked to eating motivation, increases food intake in a CB1-dependent manner (Kirkham et al., 2002). Intriguingly, the NAc shell is the only cortico-striatal structure to send projections directly to the LH, thus suggesting its unique relationship with a hypothalamic area regulating food intake (Kelley et al., 2005). This relationship could be functionally mediated by the ECS. Administration of anandamide into the NAc shell in fact induces *c-fos* expression in several hypothalamic nuclei, including the LH, the dorsomedial nucleus and the PVN (Soria-Gomez et al., 2007).

Another possibility is that the increase in endocannabinoids within the NAc shell might enhance pleasure from food. Over time, several studies have pointed out the ability of endocannabinoids or CB1 agonists to increase consumption of palatable food, or conversely, the ability of CB1 antagonists to preferentially, although not exclusively, inhibit the intake of palatable food (Cota et al., 2006). Using a taste reactivity paradigm, Mahler et al. (2007) recently confirmed that the ECS modulates palatability, by reporting that anandamide microinjections into the medial part of the NAc shell doubled the number of 'liking' reactions to

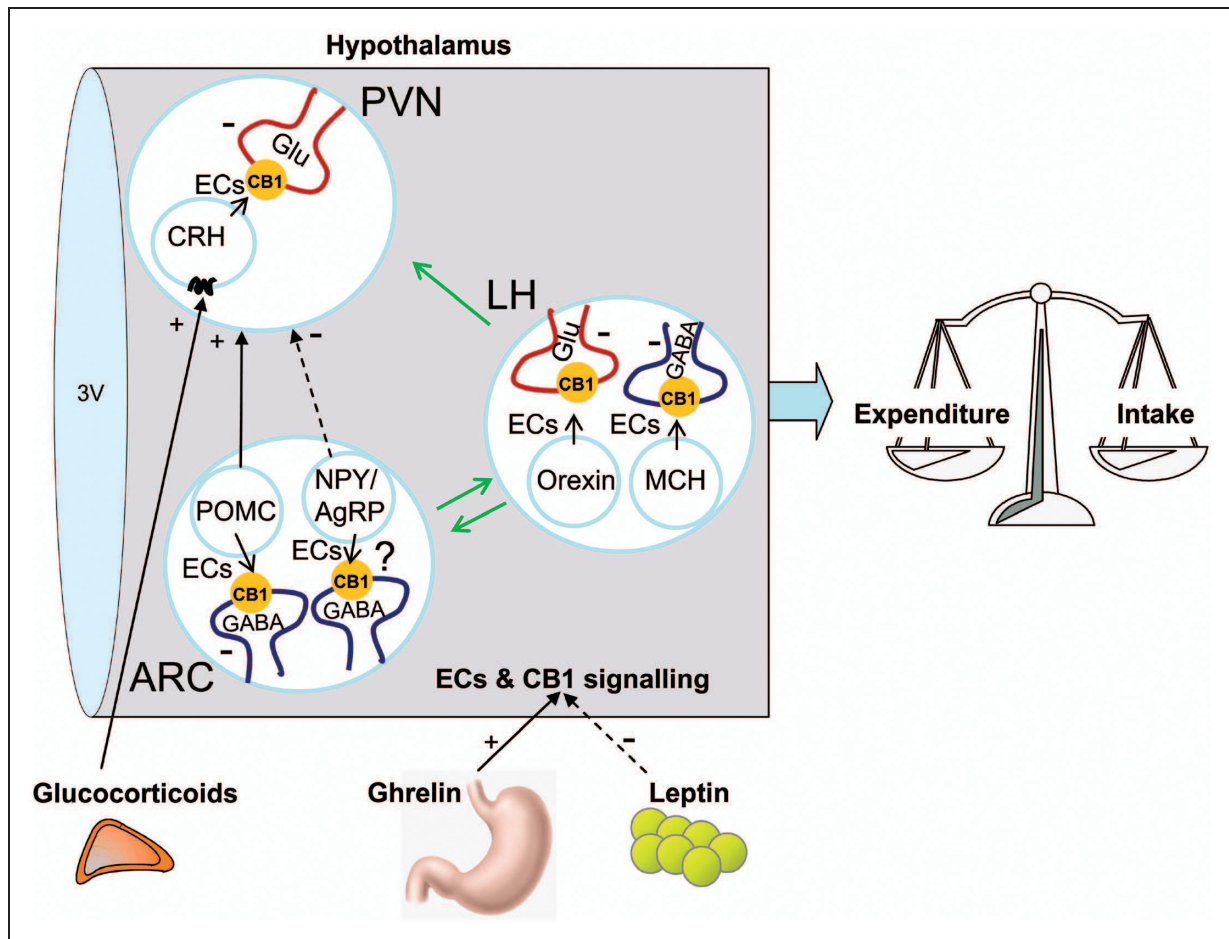


Figure 1. Functional relationship among the ECS, the neuroendocrine circuits and peripheral signals participating in the hypothalamic regulation of energy balance. Intra-hypothalamic arrows denote projection pathways; dashed lines denote inhibition. For didactic reasons some intra-hypothalamic neuronal populations and connections have been omitted. Please see the text for further detail. AgRP, agouti-related protein; ARC, arcuate nucleus; CB1, cannabinoid type 1 receptor; CRH, corticotropin-releasing hormone; ECS, endocannabinoids; GABA, γ -aminobutyric acid; Glu, glutamate; LH, lateral hypothalamus; MCH, melanin-concentrating hormone; NPY, neuropeptide Y; POMC, pro-opio-melanocortin; PVN, paraventricular nucleus; 3V, third ventricle.

intraoral sucrose in rats, without altering ‘disliking’ reactions to bitter quinine.

In the context of the role of the ECS in modulating liking responses to food, the interaction of the ECS with the endogenous opioid system should be highlighted. For instance, there is considerable anatomical overlap among CB1, opioid receptors and their respective endogenous ligands in brain areas regulating food intake and reward mechanisms (Cota et al., 2006). Additionally, the co-administration of sub-threshold doses of naloxone and rimonabant suppresses food intake to a much greater extent than the effect obtained by the administration of each drug alone, thus pointing to a synergistic interaction between opioid and cannabinoid antagonists (Rowland et al., 2001).

Several studies have also implicated the ECS in the processes underlying the motivation to obtain food. This role can be in part explained taking into account the existing relationship between the ECS and the mesolimbic dopaminergic system.

Dopamine is considered a crucial mediator of the rewarding effects of food and drugs of abuse. Importantly, the dopamine release induced by the exposure to a novel highly palatable food (candied cherry) in the NAc shell is inhibited by the systemic administration of the CB1 antagonist rimonabant (Melis et al., 2007). Thus, exposure to palatable food might increase endocannabinoid levels in the NAc shell, an effect that in turn induces dopamine release in this brain area. Accordingly, chronic exposure to a high-fat, palatable diet decreases CB1 expression in the NAc shell, a phenomenon that could be interpreted as the resulting effect of increased endocannabinoid levels (Harrold et al., 2002). How the ECS might actually affect dopamine release in the NAc shell is, however, still matter of debate. A possibility is that endocannabinoids acting mainly on CB1 receptors on the axon terminals of glutamatergic neurons inhibit glutamate release, thus inhibiting the GABAergic neurons that originate in the NAc and project to the VTA, consequently disinhibiting VTA dopaminergic neurons (Maldonado et al., 2006). Besides,

endocannabinoids are synthesized by VTA dopaminergic neurons and participate to the fine-tuned regulation of this neuronal population. In fact, CB1 receptors are located on presynaptic glutamatergic and GABAergic neurons in the VTA, but not on dopaminergic neurons (Maldonado et al., 2006).

In summary, the ECS influences feeding behaviour by acting upon circuits located in both the hypothalamus and cortico-limbic structures, with an overall net anabolic effect. However, the role of the ECS in the CNS control of energy balance might be far more complicated than it appears to be. Bellocchio et al. (2010) have recently shown that the CB1-dependent control of glutamatergic or GABAergic transmission exerts opposite effects on short-term stimulated food intake. In particular, the CB1-dependent acute inhibition of excitatory glutamatergic transmission contributes to the well-known orexigenic effect of Δ^9 -THC; while inhibition of inhibitory GABAergic transmission in the NAc mediates an unforeseen hypophagic effect of the endogenous CB1 signalling (Bellocchio et al., 2010).

Finally, both hypothalamic and reward-related circuits represent the target of the action of peripheral signals involved in the control of energy balance, such as leptin, ghrelin and satiety hormones. Their relationship with the ECS will be further discussed below.

The ECS and leptin

As briefly mentioned before, the adiposity signal leptin plays a critical role in energy balance regulation. In 2001, Di Marzo et al. first described that leptin inhibits endocannabinoid production in the hypothalamus (Di Marzo et al., 2001). Conversely, hypothalamic endocannabinoids are increased in genetically obese rodents lacking leptin or its receptor, and treatment of these mice with a CB1 antagonist attenuates their hyperphagia and retards their weight gain, implying that ECS over-activity may be a contributing factor in some animal models of genetic obesity (Di Marzo et al., 2001). More direct evidence linking endocannabinoids and leptin in the modulation of hypothalamic neuronal activity has come from electrophysiological studies. In fact, the CB1-dependent suppression of inhibition of orexigenic MCH neurons in the LH is blocked by leptin, which, by reducing intracellular calcium levels in MCH neurons, directly inhibits endocannabinoid synthesis (Jo et al., 2005). In the same fashion, leptin also blocks glucocorticoid-mediated endocannabinoid release in the PVN (Malcher-Lopes et al., 2006).

The relationship between the ECS and leptin in brain reward circuits is at present poorly investigated. However, it is known that leptin inhibits the mesolimbic dopamine system by acting on both the LH and the VTA (Hommel et al., 2006; Leininger et al., 2009). Furthermore, obese rats with defective leptin signalling have increased CB1 expression and binding in reward brain structures, thus implying that the increased motivation to eat that characterizes this animal model might be due to a higher endocannabinoid tone in reward-related brain areas (Thanos et al., 2008).

Notably, the ECS-leptin interaction is not only used in a local way to integrate energy balance signals in the CNS but it

also acts on distant processes occurring in other metabolically relevant organs, like the white adipose tissue. Indeed, administration of leptin in the medio-basal hypothalamus inhibits white adipose tissue lipogenesis by engaging hypothalamic phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signalling, activating sympathetic innervations on the adipose tissue and locally inhibiting anandamide production (Buettner et al., 2008).

The ECS and satiety hormones

Gastrointestinal hormones like CCK, GLP-1 and PYY also exert important functions in the context of energy balance, by regulating meal duration and termination and inducing satiety (Strader and Woods, 2005). This function relies on the regulation of several neuroendocrine mechanisms, including the modulation of vagal afferents and the activation of neurons located in the nucleus of the solitary tract (NTS) in the brainstem (Strader and Woods, 2005).

Unfortunately, very little is known of the possible relationship between the ECS and satiety hormones. Recent studies by Burdyga et al. (2004) have however demonstrated that CB1 receptors expression in the vagal afferent neurons (VAN) is increased in fasting and decreased after refeeding. This decrease can be blocked by the administration of a CCK-1 receptor antagonist. Conversely, the fasting-induced increase in CB1 mRNA can be inhibited by peripheral CCK administration (Burdyga et al., 2004). Interestingly, the down-regulation of CB1 expression during refeeding is prevented by the administration of ghrelin, suggesting a role for ghrelin in blocking the CCK action on CB1 expression (Burdyga et al., 2006; Burdyga et al., 2010). Furthermore, the effects of CCK on CB1 expression can also be blocked by co-administration of anandamide, while the fasting-induced increase of CB1 mRNA can be prevented by using the CB1 antagonist AM281 (Burdyga et al., 2010). The latter finding thus implies the existence of an autoregulatory mechanism for CB1 expression in the vagus. Apart from CCK, there might also be a potential link between the ECS and PYY, since expression of Y2R, the receptor subtype mediating the anorectic action of PYY (Batterham et al., 2002), and CB1 mRNAs are oppositely regulated in the VAN (Burdyga et al., 2010). Y2R mRNA expression is increased by refeeding or CCK treatment, while high doses of anandamide are able to block CCK-induced increase of Y2R expression (Burdyga et al., 2010). To our knowledge, no link has been established so far between CB1 and GLP-1; the only paper that explored this issue found no modification of plasma GLP-1 levels following the administration of rimonabant in rats (Cani et al., 2004).

The ECS and ghrelin

Ghrelin is the only gut hormone with a known orexigenic action (Wiedmer et al., 2007). Because of the general similar function played by the ECS and ghrelin in the regulation of energy balance, their possible interaction has been the focus of intense research in recent years. As described in the previous section, ghrelin prevents refeeding-induced downregulation of CB1 expression in the VAN (Burdyga et al., 2006). However, the first evidence of cross-talk between ghrelin and

the ECS came in 2004, when a study by Tucci et al. showed that a sub-anorectic dose of rimonabant was able to abolish the orexigenic effect of an intra-PVN injection of ghrelin in rats, thus hinting that endocannabinoids might mediate ghrelin's action on food intake (Tucci et al., 2004). Indeed, later studies have demonstrated that ghrelin increases hypothalamic endocannabinoid content (Kola et al., 2008). Importantly, hypothalamic endocannabinoids might then participate in the activation of the AMP-activated protein kinase (AMPK), an intracellular fuel gauge known to mediate ghrelin's action within the hypothalamus (Andrews et al., 2008; Lopez et al., 2008).

On the other hand, systemic administration of the CB1 antagonist rimonabant reduces circulating ghrelin levels (Cani et al., 2004), suggesting that the release of ghrelin would be dependent on ECS activation. Indeed, the administration of CB1 agonists or methanandamide (an anandamide analog) in rats increases plasma ghrelin levels and ghrelin secretion from gastric X/A-like cells (Zbucki et al., 2008).

Therefore, taking this evidence into account, it could be proposed that endocannabinoids and ghrelin act synergistically in a feed-forward fashion, where each one would stimulate the release and the activity of the other to increase appetite and energy storage. In the periphery, endocannabinoids would favour ghrelin synthesis, whose release in the blood and subsequent action in the hypothalamus would in turn increase hypothalamic endocannabinoid content, activate CB1 and, by leading to an increase of hypothalamic AMPK activity, ultimately stimulate food intake and body weight gain.

The ECS in peripheral organs

Up to 2003, CB1 was thought to be exclusively located within the CNS. Work by Cota et al. and Bensaid et al. published in that year were the first to describe the functional presence of CB1 on white adipocytes (Bensaid et al., 2003; Cota et al., 2003). Furthermore, data obtained from zpair-feeding studies also implied that mechanisms other than the reduction in food intake might participate in the lean phenotype of CB1^{-/-} mice (Cota et al., 2003). Since then, the role of the ECS in the regulation of lipid metabolism and use of substrates by peripheral organs has been substantiated. For instance, it has been shown that activation of CB1 receptors stimulates fat deposition by facilitating adipocyte differentiation and increasing expression of adipogenic enzymes and activity of the lipoprotein lipase (Bensaid et al., 2003; Cota et al., 2003; Matias et al., 2006; Muccioli et al., 2010). Interestingly, recent findings even suggest that the ECS might participate in the control of the transdifferentiation of the adipose tissue, since *in vitro* blockade of CB1 directly promotes transdifferentiation of white adipocytes into a mitochondria-rich, thermogenic brown fat phenotype (Perwitz et al., 2010). Accordingly, it has been reported that pharmacologic or genetic CB1 blockade increases mitochondrial biogenesis in white adipocytes via an endothelial nitric oxide synthase mechanism (Tedesco et al., 2008). These phenomena might in turn participate in the increase in energy expenditure, fatty acid oxidation and thermogenesis observed with the administration of CB1

antagonists *in vivo* (Cota et al., 2009; Herling et al., 2008; Nogueiras et al., 2008; Verty et al., 2009a). However, limiting the ability of the ECS to modulate energy expenditure solely by engaging peripheral, local mechanisms is over simplistic. In fact, it has been recently shown that mice selectively lacking CB1 expression in forebrain neurons and with a 60% reduction of the expression of the receptor in the cervical sympathetic ganglia have a lean phenotype and are resistant to diet-induced obesity (Quarta et al., 2010). This is due to an increase in lipid oxidation and thermogenesis caused by an enhanced sympathetic tone (Quarta et al., 2010).

Similarly to what was described for the white adipose tissue, the activation of CB1 in hepatocytes induces the expression of lipogenic enzymes, such as acetyl coenzyme-A carboxylase-1 (ACC1) and fatty acid synthase (FAS), which in turn increase *de novo* fatty acid synthesis and favour the development of liver steatosis, particularly during exposure to high-fat diets (Osei-Hyiaman et al., 2005; Osei-Hyiaman et al., 2008). The role of CB1 within the hepatocyte seems particularly important in the context of the regulation of lipid metabolism, since mice lacking the receptor in hepatocytes, although still susceptible to diet-induced obesity, are protected against liver steatosis, hyperglycemia, dyslipidemia and insulin resistance (Osei-Hyiaman et al., 2008).

Much less defined is the specific role of the ECS within the skeletal muscle and the endocrine pancreas. In isolated soleus muscle, pharmacological blockade of CB1 improves both basal and insulin-stimulated glucose transport activity, while CB1 activation has the opposite effect (Lindborg et al., 2010). Muscle cell cultures have also shown that the CB1 receptor can affect the responsiveness of skeletal muscle toward insulin through the modulation of the PI 3-kinase/PKB and the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signalling pathways (Lipina et al., 2010).

Given the critical role of the endocrine pancreas in guaranteeing glucose homeostasis, a set of recent investigations has tried to uncover the function of the ECS in this organ. Several studies have demonstrated the presence of CB receptors (both CB1 and CB2) in rodent and human islets, with a species-dependent degree of expression (Li et al., 2011). The detailed physiological function of the ECS in the endocrine pancreas has not been delineated yet, and the reader should refer to reviews that have recently addressed this topic (Bermudez-Silva et al., 2009; Li et al., 2011; Nogueiras et al., 2009). Nevertheless, few reports indicate that CB receptors modulate insulin secretion by regulating glucose-induced calcium transients (Bermudez-Silva et al., 2009; Li et al., 2011; Nogueiras et al., 2009). Whether this local action might then have a relevant role in the maintenance of the glucose homeostasis *in vivo* is not known.

Finally, apart from the relationship between the ECS and gastrointestinal hormones that we have illustrated in previous sections, and the ECS ability to regulate gastrointestinal motility and secretion (Storr and Sharkey, 2007), recent evidence suggests that endocannabinoid signalling might link gut microbiota to the regulation of adipogenesis (Muccioli et al., 2010). Gut microbiota are known to influence whole-body metabolism and energy balance (Turnbaugh et al., 2006). Muccioli et al. have demonstrated that gut microbiota control the intestinal ECS tone, which in turn modulates gut permeability (Muccioli et al., 2010). In fact, CB1

stimulation in a colonic epithelial monolayer cell model increases permeability. This is associated with increased lipopolysaccharide levels, which exacerbate gut permeability and ECS tone in both the gastrointestinal tract and the white adipose tissue (Muccioli et al., 2010). In obesity, the ECS is dysregulated (see also the following section); such dysregulation at the level of the gastrointestinal tract and adipose tissue might therefore participate in the metabolic impairments which characterize the obese condition.

Altogether, it is clear that the understanding of the ECS role in metabolically relevant peripheral tissues has greatly advanced during the past few years. Presently, however, the relative contribution of CNS versus peripheral ECS in the modulation of energy balance is still a matter of debate. As will be further detailed below, peripherally restricted CB1 antagonists show hope for the treatment of obesity. An important next step will be therefore to exactly define their mechanisms of action.

The ECS, neuroendocrine dysregulation and obesity

Obesity is characterized by the accumulation of excess body fat, to a point that it is harmful for health. This condition is associated with a plethora of neuroendocrine alterations of which the most representative are the development of leptin and insulin resistance at both peripheral and central level. Thus, the ECS dysregulation extensively described in both obese humans and animals in recent years (Di Marzo and Despres, 2009) could be the result of neuroendocrine alterations causally linked to hyperphagia, overweight and an expanding waist.

For instance, it is important to mention again here that genetic defects in leptin production or signalling lead to increased endocannabinoid levels, particularly in the hypothalamus (Di Marzo et al., 2001) and to increased CB1 binding in reward brain structures like the NAc (Thanos et al., 2008). Moreover, it has been proposed that endocannabinoid fluctuations in reward-related brain areas could modulate the hedonic aspects of eating and might be elevated in obesity (Di Marzo et al., 2009a). However, the presence and function of an up-regulated ECS in brain reward circuits still deserves further investigation. Complex and still under-investigated is also the relationship between the action of endocrine signals within the CNS and the modulation of the peripheral ECS. In this context, it has been shown that intra-hypothalamic leptin fails to suppress white adipose tissue anandamide levels and lipogenesis when a CB1 agonist is systemically administered (Buettner et al., 2008). Thus, the failure of leptin-driven pathways to restrain endocannabinoid levels in the adipose tissue might contribute to the ECS over-activity observed in obesity (Buettner et al., 2008).

While leptin resistance seems to have a key role in endocannabinoid up-regulation in the hypothalamus and white adipose tissue, insulin resistance is emerging as one of the most important events related with the up-regulated peripheral endocannabinoid tone observed in obesity (Di Marzo et al., 2009b; Matias et al., 2006; Murdolo et al., 2007). In fact, a recent study carried out in humans suggests that

insulin negatively regulates circulating endocannabinoids and, in particular, anandamide levels (Di Marzo et al., 2009b). This phenomenon is inversely related to metabolic predictors of insulin resistance and dyslipidemia (Di Marzo et al., 2009b).

In addition, the decreased release of satiety hormones, such as PYY, which is normally found in obesity (le Roux et al., 2006) might also favour the maintenance of ECS activation in the gastro-intestinal tract, which in turn could sustain further food intake. Interestingly, obese Zucker rats (a model of genetic obesity characterized by important hyperphagia) not only have increased anandamide and 2-AG levels in the duodenum as compared with lean animals, but they also show an altered modulation of these endocannabinoids in response to fasting/refeeding, and in particular they remain elevated even after refeeding (Izzo et al., 2009).

Alternatively, there is also evidence pointing to a direct over-activity of the ECS, which could causally lead to obesity.

Chronic overconsumption of high-fat diets causes increased availability of polyunsaturated fatty acid precursors for the synthesis of endocannabinoids (Berger et al., 2001). Moreover, although increased endocannabinoid levels have been found in several peripheral tissues and endocrine organs, their onset, duration and extent of the increase closely depend on the fatty acid composition of the diet (Matias et al., 2008a). Under this scenario, the increased endocannabinoid levels derived from the diet would be maintained by the obesity-induced leptin and insulin resistance, thus leading to a chronically elevated endocannabinoid tone, able to reinforce the hedonic properties of the food and favouring further food intake (Di Marzo and Despres, 2009).

Additionally, genetic studies have been carried out assessing CNR1 (coding for CB1 receptor) and FAAH polymorphisms in obese populations. Despite some conflicting results, associations between polymorphisms in these genes and abdominal obesity (Sipe et al., 2005), dyslipidemia (Baye et al., 2008) or metabolic syndrome (Bordicchia et al., 2010) have been described, which however suggest only a partial and weak contribution to the obese phenotype. Possibly, this genetic variation may influence obesity depending on the diet (Aberle et al., 2008).

Independently from the reasons that lead to ECS over-activity, and given that the ECS classically fine-tunes other systems and pathways in response to environmental stimuli, its dysregulation could be interpreted as the result of a local inappropriate cell functioning caused by upstream molecular events, which the ECS tries to compensate for.

Importantly, pharmacological antagonism of CB1 receptors decreases body weight and improves key metabolic parameters in both obese patients and animals (Cota, 2007; Di Marzo and Despres, 2009), thus implying that at least a dysregulated CB1 signalling is causally involved in the vicious cycle underlying obesity and its related metabolic consequences.

The ECS as an anti-obesity therapy target

Shortly after the discovery of cannabinoid receptors, specific CB1 antagonists were developed. The first of these drugs was SR141716A, also known as rimonabant (Rinaldi-Carmona

et al., 1994). Chronic administration of this compound is effective in reducing body weight and fat mass, while improving glucose homeostasis, insulin sensitivity and overall cardiometabolic risk profile in obese rodents and humans (Cota, 2007; Di Marzo and Despres, 2009). However, concern over neuropsychiatric side effects, including anxiety, depression, and suicidal ideation, as well as probing editorials and critical commentaries pointing to the use of non-validated or disputed surrogate endpoints and lack of generalizability characterizing the clinical trials testing rimonabant in obese populations prevented its approval in the United States and led to its withdrawal from the European market (Jones, 2008).

A great controversy in both the research community and the pharmaceutical industry has then followed about the therapeutic use of CB1 antagonists in obesity and related metabolic disorders (Bermudez-Silva et al., 2010; Di Marzo and Despres, 2009).

However, it should be pointed out once more that the ECS is strategically positioned in all key points modulating energy homeostasis and is able to directly affect relevant metabolic functions in peripheral organs. Taking this evidence into account, a new class of CB1 antagonists with decreased ability to pass the blood brain barrier is being explored as a potential new tool to tackle obesity. In a recent paper by Tam et al. it was shown that a new CB1 neutral antagonist largely restricted to the periphery does not affect behavioural responses mediated by CB1 in the brain, but it causes weight-independent improvements in glucose homeostasis, fatty liver, and plasma lipid profile in mice with genetic or diet-induced obesity (Tam et al., 2010).

In addition to the CB1 antagonism approach there is potential for other ECS-based therapy against obesity. As discussed above, obesity is characterized by an up-regulated ECS. Thus, pharmacological modulation of endocannabinoid levels in obesity might provide a more physiological approach than blocking CB1. In fact, CB1 blockade may induce a feedback loop driving endocannabinoid levels even higher, consequently modulating the activity of other receptors, such as CB2 and TRPV1 or the putative cannabinoid receptor GPR55. The effects of this crossover activation cannot be predicted. However, drugs targeting the enzymes responsible for the synthesis and degradation of endocannabinoids could be useful in counteracting the ECS over-activity. An example of this kind of drug is the compound O-5596, a diacylglycerol lipase inhibitor able to decrease endocannabinoid synthesis and inhibit food intake (Bisogno et al., 2009). Another putative strategy for reducing endocannabinoid over-activity could be by decreasing the availability of endocannabinoid precursors. This possibility could indeed deserve further investigation, since a diet enriched in (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) has been shown to decrease endocannabinoid levels in the visceral adipose tissue, liver and heart (Batetta et al., 2009).

Finally, given the tight control of energy balance, an effective therapy against obesity could rely on an adjunctive strategy. This type of therapeutic approach could for instance exploit the synergism between targeting an ECS-component and other systems involved in the regulation of food intake and body weight.

Concluding remarks

Animal and human studies carried out so far have clearly established a role for the ECS in the regulation of energy balance. Evidence has also been accumulated pointing to the existence of a functional relationship between the ECS and neuroendocrine mechanisms participating to the control of nutrient intake, metabolism and storage. However, further research is needed in order to clearly unravel the molecular mechanisms underlying the functional cross-talk between endocannabinoids and neuroendocrine signals in a tissue- and circuit-specific manner, thus potentially helping determine the causes leading to ECS dysregulation in obesity and the role played by this system in the pathophysiology of this disease.

Growing evidence suggests that pharmacological inhibition of CB1 might prove beneficial in tackling obesity and associated cardio-metabolic risk factors. Although first generation CB1 antagonists have proven to have an unsatisfactory safety profile, a new class of compounds preferentially targeting the ECS in the periphery might represent interesting pharmacologic options for the treatment of metabolic disorders in the near future. Their impact on the aforementioned signals participating in the regulation of energy balance is at present unknown.

Funding

This work was supported by Avenir INSERM and EFSD-Sanofi Aventis grants (DC), INSERM/Aquitaine Region PhD Fellowship Programme (PC), the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovacion, Spain, grant 07/0880 (FJBS) and Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, grant PI-0232/2008 (FJBS). FJBS has a research contract with the National System of Health (Instituto de Salud Carlos III; CP07/00283). FJBS has also received a BAE from Instituto de Salud Carlos III (BA09/90066).

Conflict of interest

None declared.

References

- Aberle J, Flitsch J, Beck NA, et al. (2008) Genetic variation may influence obesity only under conditions of diet: analysis of three candidate genes. *Mol Genet Metab* 95: 188–191.
- Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, et al. (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454: 846–851.
- Batetta B, Griinari M, Carta G, et al. (2009) Endocannabinoids may mediate the ability of (n-3) fatty acids to reduce ectopic fat and inflammatory mediators in obese Zucker rats. *J Nutr* 139: 1495–1501.
- Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, et al. (2002) Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418: 650–654.
- Baye TM, Zhang Y, Smith E, et al. (2008) Genetic variation in cannabinoid receptor 1 (CNR1) is associated with derangements in lipid homeostasis, independent of body mass index. *Pharmacogenomics* 9: 1647–1656.
- Bellochio L, Lafenetre P, Cannich A, et al. (2010) Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13: 281–283.

- Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, et al. (2003) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 63: 908–914.
- Berger A, Crozier G, Bisogno T, et al. (2001) Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acylethanolamines in piglets. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6402–6406.
- Bermudez-Silva FJ, Suarez Perez J, Nadal A, et al. (2009) The role of the pancreatic endocannabinoid system in glucose metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23: 87–102.
- Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, et al. (2010) The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav* 95: 375–382.
- Berridge KC, Ho CY, Richard JM, et al. (2010) The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Res* 1350: 43–64.
- Bisogno T, Berrrendero F, Ambrosino G, et al. (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 377–380.
- Bisogno T, Burston JJ, Rai R, et al. (2009) Synthesis and pharmacological activity of a potent inhibitor of the biosynthesis of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *ChemMedChem* 4: 946–950.
- Bordicchia M, Battistoni I, Mancinelli L, et al. (2010) Cannabinoid CB1 receptor expression in relation to visceral adipose depots, endocannabinoid levels, microvascular damage, and the presence of the Cnr1 A3813G variant in humans. *Metabolism* 59: 734–741.
- Breivogel CS and Childers SR (1998) The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 5: 417–431.
- Buettner C, Muse ED, Cheng A, et al. (2008) Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med* 14: 667–675.
- Burdyga G, Lal S, Varro A, et al. (2004) Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J Neurosci* 24: 2708–2715.
- Burdyga G, Varro A, Dimaline R, et al. (2006) Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G1289–G1297.
- Burdyga G, Varro A, Dimaline R, et al. (2010) Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons: kinetics and role in influencing neurochemical phenotype. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G63–G69.
- Cani PD, Montoya ML, Neyrinck AM, et al. (2004) Potential modulation of plasma ghrelin and glucagon-like peptide-1 by anorexigenic cannabinoid compounds, SR141716A (rimonabant) and oleoylethanolamide. *Br J Nutr* 92: 757–761.
- Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8: 571–578.
- Cota D (2007) CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes Metab Res Rev* 23: 507–517.
- Cota D, Marsicano G, Tschop M, et al. (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112: 423–431.
- Cota D, Proulx K and Seeley RJ (2007) The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology* 132: 2158–2168.
- Cota D, Sandoval DA, Olivieri M, et al. (2009) Food Intake-independent Effects of CB1 Antagonism on Glucose and Lipid Metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 17: 1641–1645.
- Cota D, Tschop MH, Horvath TL, et al. (2006) Cannabinoids, opioids and eating behavior: the molecular face of hedonism? *Brain Res Rev* 51: 85–107.
- Devane WA, Dysarz FAIII, Johnson MR, et al. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34: 605–613.
- Di Marzo V (2008) Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7: 438–455.
- Di Marzo V (2009) The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res* 60: 77–84.
- Di Marzo V and Despres JP (2009) CB1 antagonists for obesity—what lessons have we learned from rimonabant? *Nat Rev Endocrinol* 5: 633–638.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, et al. (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410: 822–825.
- Di Marzo V, Ligresti A and Cristino L (2009a) The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. *Int J Obes (Lond)* 33 Suppl 2: S18–S24.
- Di Marzo V, Verrijken A, Hakkarainen A, et al. (2009b) Role of insulin as a negative regulator of plasma endocannabinoid levels in obese and nonobese subjects. *Eur J Endocrinol* 161: 715–722.
- Ellis J, Pediani JD, Canals M, et al. (2006) Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem* 281: 38812–38824.
- European Medicines Agency (2009) European public assessment report (EPAR). Acomplia EPAR summary for the public. Retrieved from <http://www.ema.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/acomplicia/acomplicia.htm> (accessed 20 September 2010).
- Gamber KM, Macarthur H and Westfall TC (2005) Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology* 49: 646–652.
- Haj-Dahmane S and Shen RY (2005) The wake-promoting peptide orexin-B inhibits glutamatergic transmission to dorsal raphe nucleus serotonergic neurons through retrograde endocannabinoid signaling. *J Neurosci* 25: 896–905.
- Harrold JA, Elliott JC, King PJ, et al. (2002) Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Res* 952: 232–238.
- Hentges ST (2007) Synaptic regulation of proopiomelanocortin neurons can occur distal to the arcuate nucleus. *J Neurophysiol* 97: 3298–3304.
- Hentges ST, Low MJ and Williams JT (2005) Differential regulation of synaptic inputs by constitutively released endocannabinoids and exogenous cannabinoids. *J Neurosci* 25: 9746–9751.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR and Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11: 563–583.
- Herling AW, Kilp S, Elvert R, et al. (2008) Increased energy expenditure contributes more to the body weight-reducing effect of rimonabant than reduced food intake in candy-fed wistar rats. *Endocrinology* 149: 2557–2566.
- Hommel JD, Trinko R, Sears RM, et al. (2006) Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* 51: 801–810.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, et al. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161–202.
- Huang H, Acuna-Goycolea C, Li Y, et al. (2007) Cannabinoids excite hypothalamic melanin-concentrating hormone but inhibit

- hypocretin/orexin neurons: implications for cannabinoid actions on food intake and cognitive arousal. *J Neurosci* 27: 4870–4881.
- Izzo AA, Piscitelli F, Capasso R, et al. (2009) Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. *Br J Pharmacol* 158: 451–461.
- Jo YH, Chen YJ, Chua SC Jr, et al. (2005) Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* 48: 1055–1066.
- Jones D (2008) End of the line for cannabinoid receptor 1 as an anti-obesity target? *Nat Rev Drug Discov* 7: 961–962.
- Katona I and Freund TF (2008) Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 14: 923–930.
- Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, et al. (2005) Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav* 86: 773–795.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, et al. (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol* 136: 550–557.
- Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, et al. (2008) The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* 3: e1797.
- Lam TK, Schwartz GJ and Rossetti L (2005) Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 8: 579–584.
- le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ, et al. (2006) Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology* 147: 3–8.
- Leininger GM, Jo YH, Leshan RL, et al. (2009) Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab* 10: 89–98.
- Li C, Jones PM and Persaud SJ (2011) Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacol Ther* 129: 307–320.
- Lindborg KA, Teachey MK, Jacob S, et al. (2010) Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes Obes Metab* 12: 722–730.
- Lipina C, Stretton C, Hastings S, et al. (2010) Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells. *Diabetes* 59: 375–385.
- Lopez M, Lage R, Saha AK, et al. (2008) Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 7: 389–399.
- Mahler SV, Smith KS and Berridge KC (2007) Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology* 32: 2267–2278.
- Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, et al. (2006) Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J Neurosci* 26: 6643–6650.
- Maldonado R, Valverde O and Berrrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 29: 225–232.
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, et al. (2006) Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3171–3180.
- Matias I, Petrosino S, Racioppi A, et al. (2008a) Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol* 286: S66–S78.
- Matias I, Vergoni AV, Petrosino S, et al. (2008b) Regulation of hypothalamic endocannabinoid levels by neuropeptides and hormones involved in food intake and metabolism: insulin and melanocortins. *Neuropharmacology* 54: 206–212.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, et al. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561–564.
- Melis T, Saccu S, Sanna F, et al. (2007) The cannabinoid antagonist SR 141716A (Rimonabant) reduces the increase of extra-cellular dopamine release in the rat nucleus accumbens induced by a novel high palatable food. *Neurosci Lett* 419: 231–235.
- Morrison CD and Berthoud HR (2007) Neurobiology of nutrition and obesity. *Nutr Rev* 65: 517–534.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, et al. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443: 289–295.
- Muccioli GG, Naslain D, Backhed F, et al. (2010) The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol* 6: 392.
- Munro S, Thomas KL and Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61–65.
- Murdolo G, Kempf K, Hammarstedt A, et al. (2007) Insulin differentially modulates the peripheral endocannabinoid system in human subcutaneous abdominal adipose tissue from lean and obese individuals. *J Endocrinol Invest* 30: RC17–RC21.
- Nogueiras R, Diaz-Arteaga A, Lockie SH, et al. (2009) The endocannabinoid system: role in glucose and energy metabolism. *Pharmacol Res* 60: 93–98.
- Nogueiras R, Veyrat-Durebex C, Suchanek PM, et al. (2008) Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes* 57: 2977–2991.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, et al. (2005) Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115: 1298–1305.
- Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, et al. (2008) Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 118: 3160–3169.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, et al. (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27: 73–100.
- Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, et al. (2010) Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes Obes Metab* 12: 158–166.
- Quarta C, Bellocchio L, Mancini G, et al. (2010) CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metab* 11: 273–285.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350: 240–244.
- Rowland NE, Mukherjee M and Robertson K (2001) Effects of the cannabinoid receptor antagonist SR 141716, alone and in combination with dexfenfluramine or naloxone, on food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 159: 111–116.
- Sipe JC, Waalen J, Gerber A, et al. (2005) Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Int J Obes (Lond)* 29: 755–759.
- Soria-Gomez E, Matias I, Rueda-Orozco PE, et al. (2007) Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *Br J Pharmacol* 151: 1109–1116.

- Storr MA and Sharkey KA (2007) The endocannabinoid system and gut-brain signalling. *Curr Opin Pharmacol* 7: 575–582.
- Strader AD and Woods SC (2005) Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 128: 175–191.
- Tam J, Vemuri VK, Liu J, et al. (2010) Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest* 120: 2953–2966.
- Tasker JG (2006) Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: S259–S265.
- Tedesco L, Valerio A, Cervino C, et al. (2008) Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes* 57: 2028–2036.
- Thanos PK, Ramalhete RC, Michaelides M, et al. (2008) Leptin receptor deficiency is associated with upregulation of cannabinoid 1 receptors in limbic brain regions. *Synapse* 62: 637–642.
- Trojnar W and Wise RA (1991) Facilitory effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on hypothalamically induced feeding. *Psychopharmacology (Berl)* 103: 172–176.
- Tucci SA, Rogers EK, Korbonits M, et al. (2004) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br J Pharmacol* 143: 520–523.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027–1031.
- Verty AN, Allen AM and Oldfield BJ (2009a) The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 17: 254–261.
- Verty AN, Boon WM, Mallet PE, et al. (2009b) Involvement of hypothalamic peptides in the anorectic action of the CB receptor antagonist rimonabant (SR 141716). *Eur J Neurosci* 29: 2207–2216.
- Verty AN, McFarlane JR, McGregor IS, et al. (2004) Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and melanocortin MCR-4 receptors in regulating food intake. *Endocrinology* 145: 3224–3231.
- Wiedmer P, Nogueiras R, Broglio F, et al. (2007) Ghrelin, obesity and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 705–712.
- Xue B and Kahn BB (2006) AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J Physiol* 574: 73–83.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, et al. (2003) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38: 701–713.
- Zbucki RL, Sawicki B, Hryniewicz A, et al. (2008) Cannabinoids enhance gastric X/A-like cells activity. *Folia Histochem Cytobiol* 46: 219–224.

Genetic Dissection of the Role of Cannabinoid Type-1 Receptors in the Emotional Consequences of Repeated Social Stress in Mice

Sarah Dubreucq^{1,2}, Isabelle Matias^{1,2}, Pierre Cardinal^{2,3}, Martin Häring⁴, Beat Lutz⁴, Giovanni Marsicano^{1,2,5} and Francis Chaouloff^{*,1,2,5}

¹Team 'Endocannabinoids and NeuroAdaptation', INSERM U862, NeuroCentre Magendie, Bordeaux, France; ²University of Bordeaux, Bordeaux, France; ³Team 'Energy Balance and Obesity', INSERM U862, NeuroCentre Magendie, Bordeaux, France; ⁴Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

The endocannabinoid system (ECS) tightly controls emotional responses to acute aversive stimuli. Repeated stress alters ECS activity but the role played by the ECS in the emotional consequences of repeated stress has not been investigated in detail. This study used social defeat stress, together with pharmacology and genetics to examine the role of cannabinoid type-1 (CB₁) receptors on repeated stress-induced emotional alterations. Seven daily social defeat sessions increased water (but not food) intake, sucrose preference, anxiety, cued fear expression, and adrenal weight in C57BL/6N mice. The first and the last social stress sessions triggered immediate brain region-dependent changes in the concentrations of the principal endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. Pretreatment before each of the seven stress sessions with the CB₁ receptor antagonist rimonabant prolonged freezing responses of stressed mice during cued fear recall tests. Repeated social stress abolished the increased fear expression displayed by constitutive CB₁ receptor-deficient mice. The use of mutant mice lacking CB₁ receptors from cortical glutamatergic neurons or from GABAergic neurons indicated that it is the absence of the former CB₁ receptor population that is responsible for the fear responses in socially stressed CB₁ mutant mice. In addition, stress-induced hypolocomotor reactivity was amplified by the absence of CB₁ receptors from GABAergic neurons. Mutant mice lacking CB₁ receptors from serotonergic neurons displayed a higher anxiety but decreased cued fear expression than their wild-type controls. These mutant mice failed to show social stress-elicited increased sucrose preference. This study shows that (i) release of endocannabinoids during stress exposure impedes stress-elicited amplification of cued fear behavior, (ii) social stress opposes the increased fear expression and delayed between-session extinction because of the absence of CB₁ receptors from cortical glutamatergic neurons, and (iii) CB₁ receptors on central serotonergic neurons are involved in the sweet consumption response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology* (2012) **37**, 1885–1900; doi:10.1038/npp.2012.36; published online 21 March 2012

Keywords: social stress; CB₁ receptor; anxiety; fear; sucrose consumption; hypothalamo-pituitary-adrenal axis

INTRODUCTION

The cannabinoid type-1 (CB₁) receptor, which is the predominant endocannabinoid receptor in neurons, is mainly located in the presynaptic compartment where it negatively impacts neurotransmitter release (Alger, 2002; Piomelli, 2003; Chevaleyre *et al*, 2006; Ohno-Shosaku *et al*, 2012). This receptor is found throughout the brain, including in regions/nuclei—such as cortical areas, the basal ganglia, and the hypothalamus—involved in the control of

emotional reactivity (Herkenham *et al*, 1990; Glass *et al*, 1997; Tsou *et al*, 1998; Katona *et al*, 1999; Marsicano and Lutz, 1999). Direct evidence for a tonic role of CB₁ receptors in the control of emotionality has been gathered by means of pharmacology and genetics. Thus, the use of CB₁ receptor antagonists and of CB₁ receptor mutant mice has underlined the prominent role of CB₁ receptors on locomotor reactivity, anxiety, and fear responses to the acute exposure to aversive environments (Viveros *et al*, 2005; Wotjak, 2005; Lafenêtre *et al*, 2007; Lutz, 2009). However, the tight interactions between the endocannabinoid system (ECS) and stress circuits are not limited to the acute exposure to aversive stimuli. Repeated exposure to homotypic or heterotypic stressors affect in a brain region-dependent manner all components of the ECS (Patel and Hillard, 2008; Hill *et al*, 2010b; Riebe and Wotjak, 2011). This is true for the concentrations of the major endocannabinoids, namely

*Correspondence: Dr F Chaouloff, Team 'Endocannabinoids and NeuroAdaptation', INSERM U862, NeuroCentre Magendie, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux Cédex 33077, France, Tel: +33 557 573 755, Fax: +33 557 573 669, E-mail: francis.chaouloff@inserm.fr

⁵These authors share senior authorship

Received 16 November 2011; revised 22 February 2012; accepted 22 February 2012

anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), the activities of their respective degrading enzymes, and the mRNA and protein expression of CB₁ receptors (Hill *et al*, 2005; Bortolato *et al*, 2007; Rademacher *et al*, 2008; Patel *et al*, 2009; Reich *et al*, 2009; Hill *et al*, 2010a; Zoppi *et al*, 2011). Moreover, repeated homotypic and heterotypic stress affect the agonist-binding properties of CB₁ receptors and/or CB₁ receptor-mediated control of neurotransmitter release (Hill *et al*, 2005; Rossi *et al*, 2008; Patel *et al*, 2009; Wamsteeker *et al*, 2010).

These data indicate that repeated stress alters different components of the ECS, including CB₁ receptor-mediated control of neurotransmission. However, whether these alterations extend to the control of emotionality exerted by CB₁ receptors has been only scarcely addressed. It has been reported that pretreatment with the CB₁ receptor antagonist rimonabant (SR141716) amplifies escape behavior during acute/repeated restraint stress (Patel *et al*, 2005). Nonetheless, how this observation relates to stress coping is not clear as rimonabant pretreatment may facilitate passive behavior during stress (Steiner *et al*, 2008). Besides its influence on escape behavior, CB₁ receptor blockade further increases the anhedonic consequence of repeated restraint stress, as revealed by sucrose preference tests (Rademacher and Hillard, 2007). Lastly, one recent study indicates that the genetic deletion of CB₁ receptors amplifies the anxiogenic consequences of repeated restraint stress, as assessed in the elevated plus-maze (Hill *et al*, 2011). These observations, which suggest that CB₁ receptors have a tonic regulatory role on several aspects of emotionality during repeated stress events, raise three main issues. First, as these data were gathered using one single model of stress, ie, restraint stress, it remains to be investigated whether this link between CB₁ receptors and emotionality is present under the same modalities in other stress models. Although restraint is a useful model for stress studies, other stress procedures, including social defeat (Buwalda *et al*, 2005; Miczek *et al*, 2008; Golden *et al*, 2011), have been proposed to better model stress-related psychopathologies in humans. Second, it is unknown whether the control exerted by CB₁ receptors on stress-induced anhedonia and anxiety extends to other emotional consequences of repeated stress. As an illustration, it is at the present time unknown whether the well-documented inhibitory effects of repeated stress on fear memory extinction (Rau *et al*, 2005; Akirav and Maroun, 2007), a cognitive process tightly controlled by CB₁ receptors (Marsicano *et al*, 2002; Suzuki *et al*, 2004; Chhatwal *et al*, 2005; Kamprath *et al*, 2006), is accounted for by stress-induced alterations in the ECS. Lastly, none of the above mentioned studies on the interactions between CB₁ receptors and emotionality in repeatedly stressed animals addressed the key question of the neuronal populations through which CB₁ receptors exert their input. In this context, the use of mutant lines where CB₁ receptors are missing from specific neuronal populations (Marsicano *et al*, 2003; Monory *et al*, 2006; Jacob *et al*, 2009; Lafenêtre *et al*, 2009; Puighermanal *et al*, 2009; Bellocchio *et al*, 2010) can help gathering crucial information on the relationships between the central ECS and stress circuitry.

The goal of this study was to further define the relationships between CB₁ receptors and the emotional

consequences of repeated stress by addressing the three issues raised above. With regard to the first issue, repeated social defeat was chosen here as a stress model in light of (i) its high ethological value (Buwalda *et al*, 2005; Miczek *et al*, 2008), (ii) its relevance to the etiology of human mood disorders (Huhman, 2006; Miczek *et al*, 2008), and (iii) past evidence that in our hands the social defeat model triggers a vast array of emotional, metabolic, and endocrine changes (Dubreucq *et al*, 2012). We first ensured that social stress triggered changes in the ECS, as assessed by the analysis of brain tissue levels of AEA and 2-AG in mice acutely or repeatedly submitted to a social defeat protocol. Next, we investigated the respective effects of pharmacological CB₁ receptor blockade by rimonabant and of the constitutive deletion of CB₁ receptors on the consequences of social stress on food and water intake, sucrose preference, unconditioned anxiety, and cued fear memory. In addition, the important role of CB₁ receptors in the control of the activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis in both control and stressed individuals (Steiner and Wotjak, 2008; Hill *et al*, 2010a) led us to measure the weights of the adrenal glands as an index of chronic HPA axis reactivity to repeated stress. In a last series of experiments, we examined whether CB₁ receptors located respectively on cortical glutamatergic neurons, on GABAergic neurons, or on serotonergic neurons exert a control on the aforementioned emotional, metabolic, and endocrine responses to social stress. To achieve this aim, we used conditional mutant lines wherein the CB₁ receptor gene was selectively deleted from each of these neuronal populations.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The experiments were conducted in strict compliance with European directives and French laws on animal experimentation (authorization number 06369). This study involved 2–3-month-old male C57BL/6N mice purchased from Janvier (Le Genest Saint-Isle, France), 3–12-month-old male CD1 mice purchased from Charles Rivers (L'Arbresle, France), and 2–3-month-old constitutive/conditional male CB₁ receptor mutant and wild-type animals bred at the NeuroCentre Magendie. All mice were housed individually 1–2 weeks before experiments with food and water *ad libitum* under a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 hours). Wild-type and constitutive CB₁ receptor mutant mice (referred to in the text as CB₁^{+/+} and CB₁^{-/-}, respectively), wild-type and conditional mutant mice lacking CB₁ receptors from cortical glutamatergic neurons (referred to in the text as Glu-CB₁^{+/+} and Glu-CB₁^{-/-}, respectively), and wild-type and conditional mutant mice lacking CB₁ receptors from GABAergic neurons (referred to in the text as GABA-CB₁^{+/+} and GABA-CB₁^{-/-}, respectively), were obtained, maintained, and genotyped/regenotyped, as described previously (Marsicano *et al*, 2002; Marsicano *et al*, 2003; Monory *et al*, 2006; Bellocchio *et al*, 2010). Conditional mutant mice lacking CB₁ receptors from central serotonergic neurons (referred to below as TPH2-CB₁^{-/-}) and their wild-type controls (referred to below as TPH2-CB₁^{+/+}) were generated through a three-step process.

The first step was achieved by crossing homozygous *CB₁*-floxed (*CB₁^{fl/fl}*) mice (Marsicano *et al*, 2003) with mice bearing a tamoxifen-inducible Cre-ER^{T2} recombinase expressed under the regulatory sequences of the mouse tryptophan hydroxylase 2 (*Tph2*) gene locus (Weber *et al*, 2009). In a second step, heterozygous Cre-expressing/*CB₁*-floxed mice (*CB₁^{TPH2-CreERT2;fl/+}*) were again crossed with *CB₁^{fl/fl}* to obtain homozygous Cre-expressing/*CB₁*-floxed mice (*CB₁^{TPH2-CreERT2;fl/fl}*). Male mice from step 2 were finally bred with *CB₁^{fl/fl}* females to generate littermate experimental animals (*CB₁^{TPH2-CreERT2;fl/fl}* and *CB₁^{fl/fl}*, referred to as TPH2-*CB₁^{-/-}* and TPH2-*CB₁^{+/+}*, respectively). Genotyping (at 2 weeks of age) and re-genotyping (at the end of the experiments) of the Cre transgene were performed by PCR using the primers 5'-CCACTGCGGGCTCTACTTC-3' (forward) and 5'-TGATGATCTTCTGGCACAGCAG-3' (reverse), whereas genotyping for the *CB₁*-floxed locus was performed as described (Marsicano *et al*, 2003). Induction of Cre-mediated recombination was performed by injecting i.p. all mice (including TPH2-*CB₁^{+/+}* mice) daily for 5 days with 10 mg/ml tamoxifen (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) dissolved in sesame oil and ethanol (10:1) (Imai *et al*, 2000). All animals, injected when 5–10-week-old, were used at least 3 weeks after the end of tamoxifen treatment. Note that PCR on genomic DNA have confirmed that tamoxifen treatment leads to a specific deletion of the *CB₁* gene in the dorsal raphe nucleus of TPH2-*CB₁^{-/-}* mice (Bellocchio *et al*, submitted). All lines were in a mixed genetic background, with a predominant C57BL/6N contribution. For each line, the wild-type animals and the constitutive/conditional mutant animals used in this study were littermates. As illustrated above for the generation of the TPH2-*CB₁* line, mice from the GABA-*CB₁* and the Glu-*CB₁* lines were generated from crossings between *CB₁^{Cre;fl/fl}* males and *CB₁^{fl/fl}* females to avoid (i) differences in maternal behavior and (ii) potential germline transmission of the gene deletion in the GABA-*CB₁* line (Massa *et al*, 2010).

Social Stress Protocol

Except for the experiments aimed at comparing the effects of acute and repeated social defeats on brain endocannabinoid levels or on cued fear memory one day after conditioning (see below), all experiments involved a daily stress protocol, which began at 16:00 hours, and that was repeated over 7 consecutive days. This protocol consisted of the following three different periods (Dubreucq *et al*, 2012): (i) placement of the experimental mouse in a wire mesh cylinder inside the home cage of a resident CD1 mouse for 30 min (sensory contacts between mice), (ii) removal of the wire mesh cylinder for 15 min (sensory and physical contacts), a period during which the latency for the first attack and the number of attacks by the resident were scored (note that all mice tested displayed an upright posture, indicating defeat), and (iii) reiteration of (i) for another 30 min, after which the experimental mouse was returned to its home cage (Figure 1a). As already documented, each daily confrontation involved an experimental mouse and a resident mouse that were unknown to each other (Dubreucq *et al*, 2012). During confrontations, water bottles were removed from all cages, including those

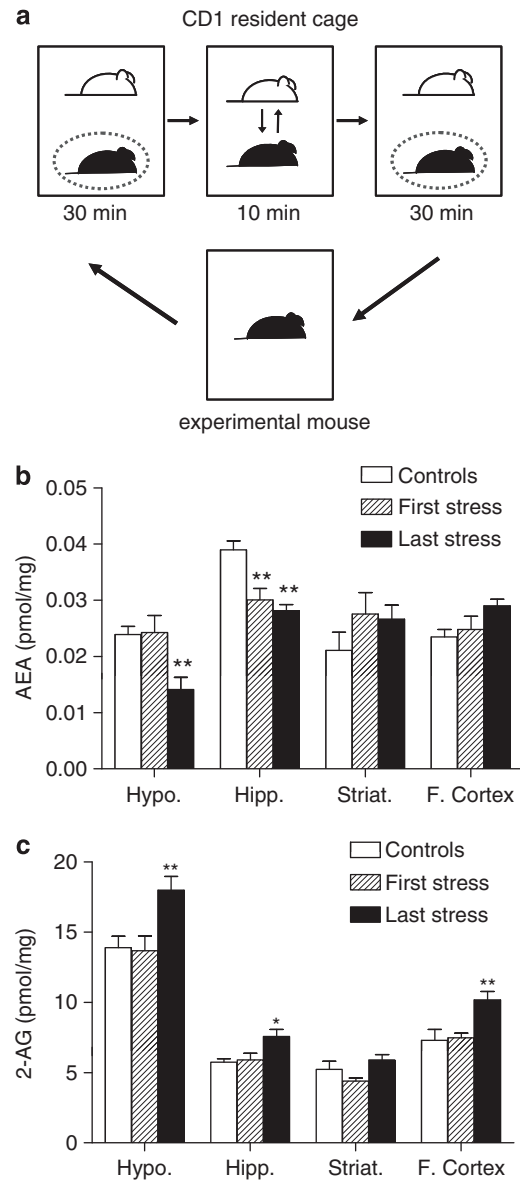


Figure 1 Social stress protocol and effects of acute/repeated social stress on central endocannabinoid concentrations. Each experimental mouse was placed for 70 min in the home cage of a CD1 resident, with one direct physical confrontation following and preceding phases of sensory contacts (a). Respective effects of the first and the last of seven social stress sessions on hypothalamic (Hypo.), hippocampal (Hipp.), striatal (Striat.), and frontocortical (F. Cortex) anandamide (AEA) (b) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (c) concentrations in C57BL/6N mice. Values are the mean \pm SEM of 5–8 animals. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ for the effects of acute/repeated stress.

housing the unstressed animals. All CD1 residents used in this study were selected 2 weeks after their arrival for their ability to attack an intruder within 20–30 s. These mice were then kept and used for social stress protocols up to 1 year of age.

Endocannabinoid Analyses

In one single series of experiments, control mice were killed by cervical dislocation at the same time as mice that had been exposed for the first time or for the seventh time to

social stress. Note that stressed mice were killed immediately after the second step of the stress procedure detailed above. The hypothalamus, the frontal cortex, the striatum, and the hippocampus were rapidly dissected out on dry ice and stored at -80°C for the estimation of AEA and 2-AG concentrations. The extraction, purification, and quantification of AEA and 2-AG from brain areas were performed as previously described (Lafourcade *et al*, 2011; Lourenço *et al*, 2011). First, brain areas were homogenized and extracted with chloroform/methanol/Tris-HCl 50 mM pH 7.5 (2:1:1, *v/v*) containing internal deuterated standards. The dried lipid extract was pre-purified if necessary by open bed chromatography on silica gel mini-columns, eluted with increasing concentrations of methanol in chloroform. Samples were then subjected to isotope-dilution liquid chromatography-chemical ionization-tandem mass spectrometric analysis (LC-MS/MS). Mass spectral analyses were performed on a TSQ Quantum triple quadrupole instrument (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an APCI source (atmospheric pressure chemical ionization) and operating in positive-ion mode. A sensitive and specific LC-MS/MS method was developed and validated for endocannabinoid quantification. The amounts of AEA and 2-AG were determined using a calibration curve and expressed as pmol/mg tissue.

General Procedure

This study examined the respective influences of (i) CB₁ receptor blockade by rimonabant, (ii) CB₁ receptor deletion from the whole body, and (iii) CB₁ receptor deletion from either cortical glutamatergic neurons, GABAergic neurons, or serotonergic neurons on several emotional, metabolic, and endocrine consequences of repeated social stress. All control and stressed animals were handled daily throughout the course of the experiments. Except for one series of experiments (which included mice from the CB₁, the Glu-CB₁, and the GABA-CB₁ lines), individual food and water intakes were measured on a daily basis. Within each experimental series, several individuals were randomly tested during the night that followed the seventh stress session for their sucrose intakes in a free choice paradigm (note that these animals underwent a preliminary 1-week habituation period to water and sucrose before stress; see below). On the morning that followed the seventh stress session, mice were first exposed to an elevated plus-maze test. In the afternoon of that same day, mice were then cued fear-conditioned before being tested in fear recall sessions on each of the three following afternoons (ie, 24–72 h after conditioning). One day after the last of these recall sessions, several mice, taken at random, were killed by cervical dislocation and their adrenals dissected out. In one series of experiments aimed at measuring the respective effects of acute and repeated stress on cued fear memory, several mice were exposed for the first time to social defeat when repeatedly stressed mice underwent their seventh stress session. All mice, including controls, were cued fear-conditioned 1 day after stress and tested in a recall session another day later. Investigations were all conducted without any knowledge of genotypes and/or treatments until final analyses.

Rimonabant Administration

Control and stressed C57Bl6/N were daily injected (30 min before each of the seven stress sessions) with the CB₁ receptor antagonist rimonabant (3 mg/kg; Sigma-Aldrich) or its vehicle (one drop of Tween 80 in 3 ml of 1.25% dimethylsulphoxide and 0.9% NaCl). Control (ie, unstressed) animals were injected at the same time. All animals were injected on the basis of their individual body weights.

Food and Water Intakes

The individual amounts of food and water consumed were measured each morning, beginning 1 day before the first stress session. With respect to water consumption during the night that followed the last stress, the difference between the respective intakes of animals left with water alone and those of animals exposed to a water/sucrose choice (see below) were low, compared with the total amounts measured during the six preceding days in both animal groups. Accordingly, water intakes of the mice that underwent this choice test were taken into account into the total amount of water consumed through the 7-day protocol. Note that food amounts were not corrected for spillage and that water leaks were avoided by providing 50-ml plastic bottles connected to sippers bearing ball-shaped stoppers (Habitrail, Hagen, France).

Elevated Plus-Maze

The apparatus, made of black Perspex, consisted of four elevated arms (height: 66 cm) 45-cm long and 10-cm wide (Letica, Barcelona, Spain). The arms were arranged in a cross-like disposition, with two opposite arms being enclosed by 50 cm high walls made of grey Perspex, and the two other arms being open. The four arms were connected by a squared central platform (10 × 10 cm). Both the central platform and the open arms were under bright illumination (100–120 lux) whereas the closed arms were under weak illumination (30 lux). Each mouse was placed on the central platform, facing an open arm. The number of visits to, and the time spent on, the open arms and the closed arms were recorded for 5 min, using a videocamera placed above the apparatus, as described previously (Dubreucq *et al*, 2012). Note that in several instances, mice (three CB₁^{+/+}, two CB₁^{-/-}, two GABA-CB₁^{+/+}, and two GABA-CB₁^{-/-}) had to be excluded from the analysis because of peculiar behaviors (full immobility on the central platform or absence of closed arm visits) or falls from open arms.

Cued Fear-Conditioning and Recall

A conditioning box, made of grey Perspex (length: 26 cm, width: 18 cm, and height: 25 cm) with a metal grid floor, was located in a sound-proof chamber (length: 55 cm, width: 60 cm, and height: 50 cm; Imetronic, Pessac, France) in a room adjacent to the housing room. On the conditioning day, each mouse was placed in the conditioning box and left free to explore for 3 min. A sound (1.5 kHz, 60 dB) was then emitted for 20 s, with the last second of tone emission being

coupled to one single footshock (0.5 mA). The animal was left in the fear-conditioning box for another minute without any stimulus before being removed from the apparatus, and housed back in its home cage. On the 3 consecutive days (recall tests), the top of each home cage was removed to be covered by a grid, allowing full observation of the mouse in its cage. The home cage was then placed into the sound-proof chamber. After a 3-min pre-tone period, the tone used for conditioning was presented again for a 3-min period. The mouse was then left for another minute in the chamber before removal of the home cage, which was returned back to the housing facility room. The presence of freezing (ie, lack of movements excepted those associated with breathing) was monitored every 20 s during the 3-min exposure to sound on each of the three recall tests, as previously reported (Dubreucq *et al*, 2010). Freezing behavior was scored by means of a customized EVENTLOG program.

Sucrose Preference

Two 50-ml bottles (see above) filled respectively with water and 2% sucrose were provided throughout the 6 days that preceded the stress protocol to estimate basal sucrose preferences. Each day, the positions of the bottles in the cages were switched as to avoid preference. Mice were then given only water, except during the night that followed the seventh social defeat session, where these mice had also access to a 2% sucrose solution. Water and sucrose amounts were monitored on the basis of weight differences (Dubreucq *et al*, 2012). When needed, preference ratios were calculated for each individual as the amount of sucrose ingested over the sum of the sucrose and water amounts ingested.

Adrenal Weights

As mentioned previously (Dubreucq *et al*, 2012), the fat surrounding the glands was visualized using an Olympus SZX10 Stereo microscope (Olympus, Bordeaux, France) and removed for subsequent adrenal weight measurements.

Statistics

All analyses were performed with the GB-Stat software (v10; Dynamic Microsystems, Silver Spring, MD, USA). Comparisons were achieved through Student's *t*-tests when assessing two-group comparisons, and by means of ANOVAs with/without repeated factors for multiple-group comparisons. *Post hoc* group comparisons, which were performed using Tukey's multiple comparison test, were achieved only if interactions between main variables were found significant. When necessary, data were log-transformed to reach homogeneity of the variances. In all tests, the significance level was preset to $p < 0.05$.

RESULTS

Acute and Repeated Social Stress Target Central Endocannabinoids

The first and/or the seventh stress sessions decreased AEA levels in the hypothalamus ($F_{(2,15)} = 6.99$; $p = 0.0071$) and

hippocampus ($F_{(2,18)} = 12.57$; $p = 0.0004$), but not in the striatum or the frontal cortex (Figure 1b). On the other hand, the last, but not the first, session of social stress increased hypothalamic ($F_{(2,18)} = 6.62$; $p = 0.007$), hippocampal ($F_{(2,17)} = 3.67$; $p = 0.047$), and frontocortical ($F_{(2,18)} = 5.83$; $p = 0.011$) 2-AG levels (Figure 1c).

Pretreatment With a CB₁ Receptor Antagonist Prolongs the Stimulatory Effect of Repeated Social Stress on Cued Fear Memory

The number of daily attacks during the stress sessions was similar in vehicle- and in rimonabant-pretreated stressed mice (18.20 ± 0.60 and 17.98 ± 0.41 , respectively; $n = 14$ in each group). Both social stress ($F_{(1,36)} = 32.26$; $p < 0.0001$) and rimonabant pretreatment ($F_{(1,36)} = 7.47$; $p = 0.0097$) increased water consumption (Figure 2a), but not food intake (data not shown), throughout the 7-day stress protocol. When offered water and sucrose as drinking solutions after the last stress session, the consumption of sucrose, but not that of water, was found to be increased by stress in both vehicle- and rimonabant-pretreated mice ($F_{(1,15)} = 6.29$; $p = 0.0241$; Figure 2b). In the elevated plus-maze, social stress bore hypolocomotor influences, as revealed by the analysis of the number of closed arm entries ($F_{(1,51)} = 13.92$; $p = 0.0005$; Figure 2c). Such an inhibitory influence of stress extended to the percent time spent in the open arms ($F_{(1,51)} = 7.55$; $p = 0.0084$; Figure 2d) while only a trend for an inhibitory effect of stress on the percent number of open arm visits was observed ($14.18 \pm 2.52\%$ and $12 \pm 3.07\%$ in 13 vehicle- and 14 rimonabant-pretreated control mice, respectively, as opposed to $9.13 \pm 3.37\%$ and $6.53 \pm 2.38\%$ in 14 stressed vehicle-pretreated mice and 14 stressed rimonabant-pretreated mice, respectively). Freezing behavior during cued fear recall sessions (ie, 24–72 h after fear conditioning) was dependent on the recall day ($F_{(2,102)} = 47.56$; $p < 0.0001$); however, whatever the recall day, social stress increased freezing behavior in all mice ($F_{(1,51)} = 7.47$; $p = 0.0086$) (Figure 2e). Moreover, the extent to which the recall session and stress affected freezing behavior was influenced by rimonabant pretreatment ($F_{(2,102)} = 3.24$; $p = 0.043$ for the stress \times recall session \times pretreatment interaction). Thus, social stress amplified freezing behavior during the first session in vehicle-pretreated mice while leaving unaffected that measured on the following recall sessions (Figure 2e). In contrast, rimonabant pretreatment extended the stimulatory effect of stress on freezing to the last two recall sessions (Figure 2e). These results were confirmed when within-session scores were analyzed; freezing scores were still accounted for by the interaction between stress and the recall session in vehicle-pretreated animals ($F_{(2,50)} = 3.45$; $p = 0.0395$; Supplementary Figure S1a) whereas stress *per se* amplified freezing scores in rimonabant-pretreated mice ($F_{(1,26)} = 6.47$; $p = 0.0172$; Supplementary Figure S1b). On the other hand, stress did not affect within-session extinction in vehicle- and rimonabant-pretreated mice (Supplementary Figures S1a and b) but increased the initial freezing responses to the cue whatever the mouse group or the recall session considered ($F_{(1,51)} = 3.45$; $p = 0.0395$; Supplementary Figure S1c). Lastly, repeated social stress increased

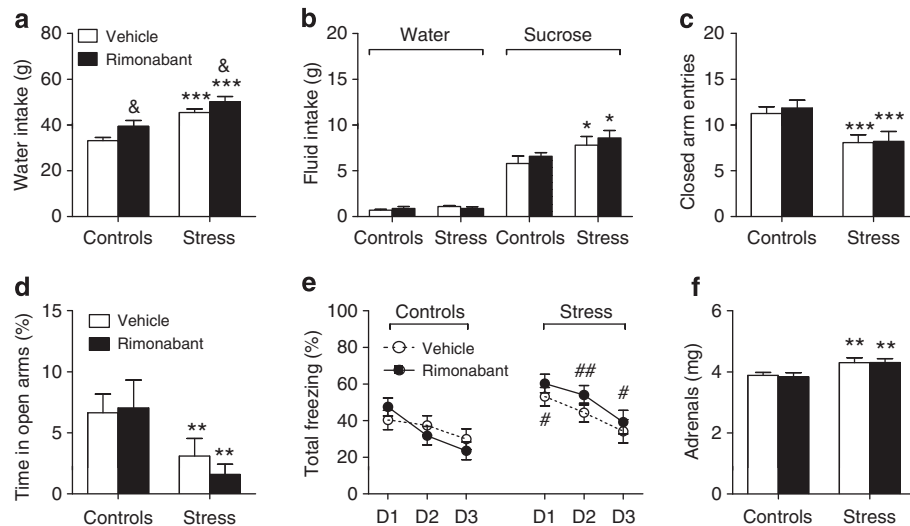


Figure 2 Effects of rimonabant pretreatment before each of the seven social stress sessions on the emotional profiles of control and stressed mice. This profile included 7-day water intakes (a), water and sucrose intakes in a free choice paradigm after the seventh stress session (b), closed arm entries (c) and percent time spent in the open arms (d) of an elevated plus-maze, freezing behavior during cued fear recall sessions 24–72 h after conditioning (e), and adrenal weight (f). D1–D3 stand for days 1–3. Values are the mean \pm SEM of 10–14 animals, except for (b), which refer to 4–5 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ for the overall effect of social stress in the ANOVA; & $p < 0.05$ for the overall influence of the pretreatment in the ANOVA; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ for the *post hoc* effects of stress. See text for ANOVAs and additional statistics.

adrenal weight in both vehicle- and rimonabant-pretreated mice ($F_{(1,48)} = 11.61$; $p = 0.0013$; Figure 2f).

CB₁ Receptors are Involved in the Potentiating Effect of Repeated Social Stress on Conditioned Freezing

Mice from the $CB_1^{+/+}$ and the $CB_1^{-/-}$ groups received an equivalent number of daily attacks throughout the stress protocol (20.02 ± 1.01 and 20.27 ± 1.00 , respectively; $n = 13$ in each group). Repeated stress increased water intake in a genotype-independent manner ($F_{(1,43)} = 60.2$; $p < 0.0005$; Figure 3a), this change occurring without any influence of stress and/or genotype on food intake (data not shown). In the sucrose preference test, the genotype bore no effect on the stimulatory impact of repeated stress on sucrose consumption ($F_{(1,28)} = 27.61$; $p < 0.0001$; Figure 3b). Repeated stress, but not the genotype, was endowed with a weak, albeit significant, inhibitory impact on elevated plus-maze behaviors, whether the number of closed arm entries ($F_{(1,47)} = 4.16$; $p = 0.0469$; Figure 3c), the percent time spent on open arms ($F_{(1,47)} = 4.51$; $p = 0.039$; Figure 3d), or the percent number of open arm visits ($12.96 \pm 2.83\%$ and $11.99 \pm 3.27\%$ in 14 control wild-type and 15 mutant mice, respectively, as opposed to $8.21 \pm 2.29\%$ and $4.02 \pm 2.16\%$ in 11 stressed wild-type and 11 stressed mutant mice, respectively; $F_{(1,47)} = 5.03$; $p = 0.030$) were considered. On the other hand, the genotype, alone ($F_{(1,53)} = 31.12$; $p < 0.0001$) and in combination with either stress ($F_{(1,53)} = 7.95$; $p = 0.0068$) or the recall session ($F_{(2,106)} = 16.51$; $p < 0.0001$) influenced freezing behavior during cued fear memory recall sessions (Figure 3e). Thus, control $CB_1^{-/-}$ mice displayed increased freezing behavior, compared with their $CB_1^{+/+}$ littermates, a difference which increased with the number of recall sessions (Figure 3e). Whereas repeated stress amplified the freezing response to the tone in $CB_1^{+/+}$ mice, it weakened that of $CB_1^{-/-}$ mice, especially during the last two recall sessions (Figure 3e).

Within-session patterns of freezing confirmed that repeated stress stimulated this behavior in $CB_1^{+/+}$ mice ($F_{(1,27)} = 5.98$; $p = 0.02$; Supplementary Figure S1d) whereas the influence of stress depended on the recall day in $CB_1^{-/-}$ mice ($F_{(2,52)} = 7.11$; $p = 0.0019$); thus, a decreased freezing response was observed in stressed $CB_1^{-/-}$ mice during the last two recall sessions (Supplementary Figure S1e). Initial freezing responses to the tone were dictated by the genotype ($F_{(1,53)} = 22.43$; $p < 0.001$) and by the respective interactions between stress and either the genotype or the recall day ($F_{(1,53)} = 5.71$; $p = 0.0205$ and $F_{(2,106)} = 7.42$; $p = 0.001$; Supplementary Figure S1f). At last, prior repeated stress increased adrenal weight in both genotypes ($F_{(1,40)} = 19.1$; $p < 0.0001$; Figure 3f).

CB₁ Receptors on Cortical Glutamatergic Neurons are Involved in the Potentiating Effect of Repeated Social Stress on Conditioned Freezing

Glu- $CB_1^{+/+}$ and Glu- $CB_1^{-/-}$ mice did not differ either in the number of attacks received (21.83 ± 0.53 and 20.50 ± 0.86 , respectively; $n = 12$ in each group) or in the amplitude of the dipsogenic effect of repeated stress ($F_{(1,39)} = 51.69$; $p < 0.0001$; Figure 4a). As opposed to water intakes, food intakes proved insensitive to the stress procedure (data not shown). When tested after the last stress session in a sucrose/water choice paradigm, the two genotypes responded in an identical manner to the stimulatory influence of stress on sucrose ingestion ($F_{(1,14)} = 6.91$; $p = 0.0198$; Figure 4b). In the elevated plus-maze, the mouse genotype and/or the stress procedure affected neither the closed arm entries (Figure 4c) nor the percent time spent in the open arms of the elevated plus-maze (albeit trends for negative effects of stress and of the mutation could be noted; see Figure 4d). Conversely, Glu- $CB_1^{-/-}$ mice displayed a lower percent number of visits on open arms (11.25 ± 3.41 and 7.18 ± 3.18 in 13 control and 12 stressed

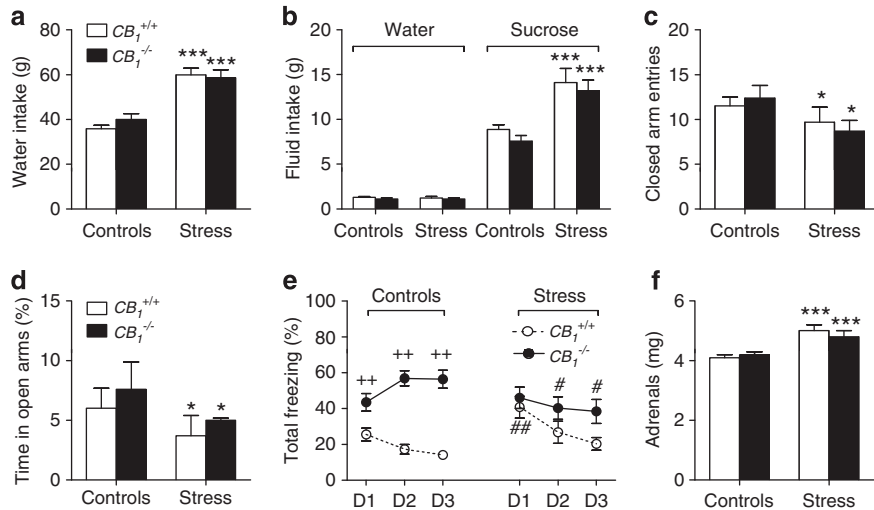


Figure 3 Influence of the constitutive mutation of cannabinoid type-1 (CB₁) receptors on the emotional profiles of control and stressed mice. This profile included 7-day water intakes (a), water and sucrose intakes in a free choice paradigm after the seventh stress session (b), closed arm entries (c) and percent time spent in the open arms (d) of an elevated plus-maze, freezing behavior during cued fear recall sessions 24–72 h after conditioning (e), and adrenal weight (f). D1–D3 stand for days 1–3. Values are the mean ± SEM of 11–16 animals, except for (b), which refer to 7–10 animals per group. **p* < 0.05 and ****p* < 0.001 for the overall effect of social stress in the ANOVA; #*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01 for stress influences within each genotype; +*p* < 0.01 for the genotype influence in unstressed animals. See text for ANOVAs and additional statistics.

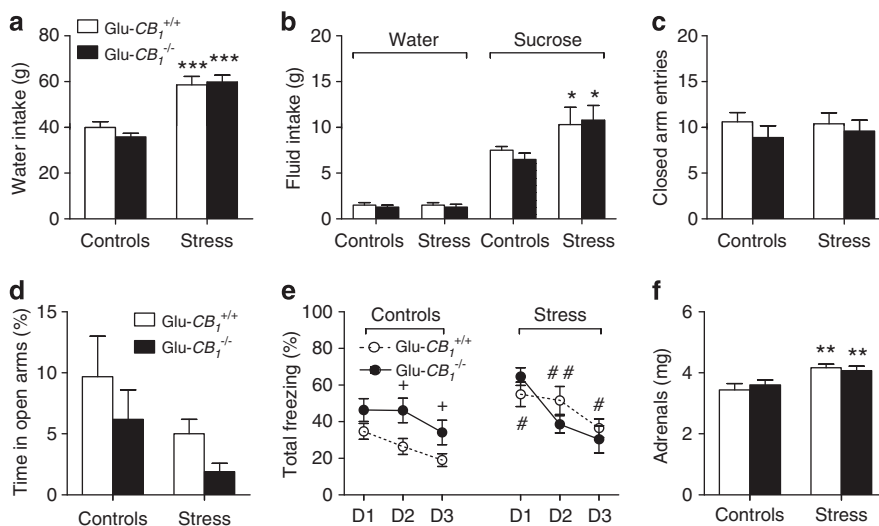


Figure 4 Influence of the conditional mutation of cannabinoid type-1 (CB₁) receptors from cortical glutamatergic neurons on the emotional profiles of control and stressed mice. This profile included 7-day water intakes (a), water and sucrose intakes in a free choice paradigm after the seventh stress session (b), closed arm entries (c) and percent time spent in the open arms (d) of an elevated plus-maze, freezing behavior during cued fear recall sessions 24–72 h after conditioning (e), and adrenal weight (f). D1–D3 stand for days 1–3. Values are the mean ± SEM of 9–14 animals, except for (b) that refers to 4–5 animals per group. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 for the overall effect of social stress in the ANOVA; #*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01 for stress influences within each genotype; +*p* < 0.05 for the genotype influence in unstressed animals. See text for ANOVAs and additional statistics.

animals, respectively) than Glu-CB₁^{+/+} littermates (20.12 ± 4.30 and 14.21 ± 2.73 in 12 control and 11 stressed animals, respectively; *F*_(1,44) = 4.71; *p* = 0.036). Stress, alone (*F*_(1,44) = 6.47; *p* = 0.0145) or in interaction with either the genotype (*F*_(1,44) = 4.17; *p* = 0.047), the recall session (*F*_(2,88) = 3.88; *p* = 0.0241) or both (*F*_(2,88) = 5.29; *p* = 0.0067), affected freezing behavior during recall (Figure 4e). Indeed, mutant animals displayed increased freezing behavior, compared with their wild-type controls, but that difference vanished with stress because of an increase in freezing in wild-type animals, but not in mutant animals (Figure 4e). Within-session analyses confirmed these results as stress-increased

freezing throughout all recall sessions in Glu-CB₁^{+/+} mice (*F*_(1,23) = 10.21; *p* = 0.004; Supplementary Figure S2a) whereas it increased freezing behavior only during the first recall session in Glu-CB₁^{-/-} mice (*F*_(2,42) = 7.95; *p* = 0.0012 for the stress × recall session interaction; Supplementary Figure S2b). Initial freezing responses to the cue were affected by both social stress (*F*_(1,44) = 4.08; *p* = 0.0496) and the interaction between stress, genotype, and recall session (*F*_(2,88) = 3.56; *p* = 0.0325; Supplementary Figure S2c). Adrenal weight analyses indicated that repeated stress increased that variable in the two genotypes (*F*_(1,37) = 13.60; *p* = 0.0007 for the effect of social stress; Figure 4f).

CB₁ Receptors in GABAergic Neurons Control the Amplitude of Repeated Social Stress-Induced Decreases in Locomotor Reactivity

GABA-*CB₁^{+/+}* and GABA-*CB₁^{-/-}* mice did not differ with respect to the number of social attacks (20.05 ± 0.86 and 19.90 ± 0.51 , respectively; $n = 13$ – 14 in each group). The consumption of water throughout the 7-day protocol, but not that of food (data not shown), was increased by social stress in a genotype-independent manner ($F_{(1,39)} = 25.79$; $p < 0.0001$; Figure 5a). Social stress selectively increased sweet consumption in the sucrose test ($F_{(1,23)} = 7.84$; $p = 0.0102$; Figure 5b), and did so in a genotype-independent manner. Locomotor reactivity, as measured by the number of closed arm entries in the elevated plus-maze, was reduced in stressed animals ($F_{(1,46)} = 13.47$; $p = 0.0006$), particularly in GABA-*CB₁^{-/-}* mice ($F_{(1,46)} = 6.13$; $p = 0.017$ for the stress \times genotype interaction; Figure 5c). On the other hand, social stress decreased in both genotypes the percent time spent on the open arms of the elevated plus-maze ($F_{(1,46)} = 8.9$; $p = 0.0046$; Figure 5d) and the percent number of open arm visits ($14.23 \pm 2.96\%$ and $10.65 \pm 3.39\%$ in 12 control wild-type and 11 mutant mice, respectively, as opposed to $7.83 \pm 2.05\%$ and $4.80 \pm 2.46\%$ in 13 stressed wild-type and 14 stressed mutant mice, respectively; $F_{(1,46)} = 4.85$; $p = 0.032$ for the influence of stress). Fear recall experiments revealed that either the deletion of CB₁ receptors from GABAergic neurons ($F_{(1,50)} = 5.75$; $p = 0.0203$) or prior exposure to social stress ($F_{(1,50)} = 5.41$; $p = 0.0241$) increased freezing responses to the presentation of the cue (Figure 5e). Within-session analyses of freezing scores within each genotype indicated that the stimulatory influence of social stress on freezing behavior was significant in GABA-*CB₁^{-/-}* mice ($F_{(1,25)} = 4.34$; $p = 0.0476$; Supplementary Figure S2e), but not in GABA-*CB₁^{+/+}* mice (Supplementary Figure S2d). Interestingly, the impact of

social stress on freezing in GABA-*CB₁^{-/-}* mice was dependent on the intra-session period of analysis ($F_{(2,50)} = 4.23$; $p = 0.0201$), suggesting that stress delayed within-session extinction of conditioned fear (Supplementary Figure S2d). Social stress, either alone or in association with the genotype, did not affect the initial freezing responses to the cue (Supplementary Figure S2f) but it had a major impact on total freezing behavior in GABA-*CB₁^{-/-}* mice (Figure 5e; Supplementary Figure S2e). Stress increased adrenal weights to similar extents in both genotypes ($F_{(1,33)} = 2.39$; $p = 0.0111$), although a non-significant trend toward a more pronounced effect in GABA-*CB₁^{-/-}* mice, compared with GABA-*CB₁^{+/+}* mice, was apparent (Figure 5f).

CB₁ Receptors on Serotonergic Neurons Mediate the Stimulatory Effects of Repeated Social Stress on Sucrose Preference

The number of social attacks was similar in TPH2-*CB₁^{+/+}* (21.87 ± 1.19 , $n = 10$) and TPH2-*CB₁^{-/-}* (21 ± 1.40 , $n = 11$) mice, as was the dipsogenic consequence of stress ($F_{(1,33)} = 36.31$; $p < 0.0001$; Figure 6a). The increased water consumption in stressed mice was not associated with changes in food intake over the 7-day period of analysis (data not shown). In the sucrose preference test, social stress stimulated sucrose intake ($F_{(1,32)} = 14.00$; $p = 0.0007$), as compared with water intake (Figure 6b). Albeit weaker than its impact on sucrose intake, stress also increased water intake in TPH2-*CB₁^{-/-}* mice ($F_{(1,32)} = 10.61$; $p = 0.0027$ for the stress \times genotype interaction; Figure 6b). Taken with this last observation, the trend for a decreased sucrose intake in stressed TPH2-*CB₁^{-/-}* mice, compared with stressed TPH2-*CB₁^{+/+}* (Figure 6b), led us to analyze the respective preference ratios. Hence, the genotype influenced the net impact of stress on preference ratios ($F_{(1,32)} = 6.54$;

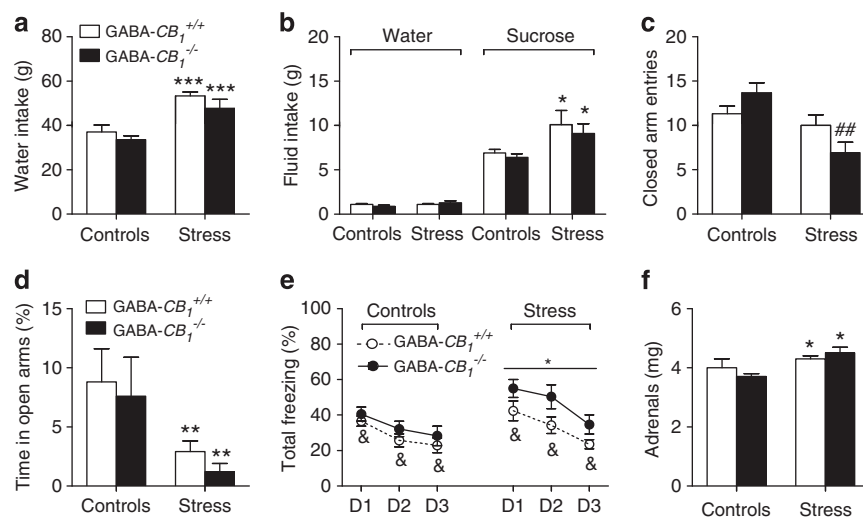


Figure 5 Influence of the conditional mutation of cannabinoid type-1 (CB₁) receptors from GABAergic neurons on the emotional profiles of control and stressed mice. This profile included 7-day water intakes (a), water and sucrose intakes in a free choice paradigm after the seventh stress session (b), closed arm entries (c) and percent time spent in the open arms (d) of an elevated plus-maze, freezing behavior during cued fear recall sessions 24–72 h after conditioning (e), and adrenal weight (f). D1–D3 stand for days 1–3. Values are the mean \pm SEM of 9–14 animals, except for (b) that refers to 6–7 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ for the overall effect of social stress in the ANOVA; & $p < 0.05$ for the overall influence of the genotype in the ANOVA; ## $p < 0.01$ for stress influences within each genotype. See text for ANOVAs and additional statistics.

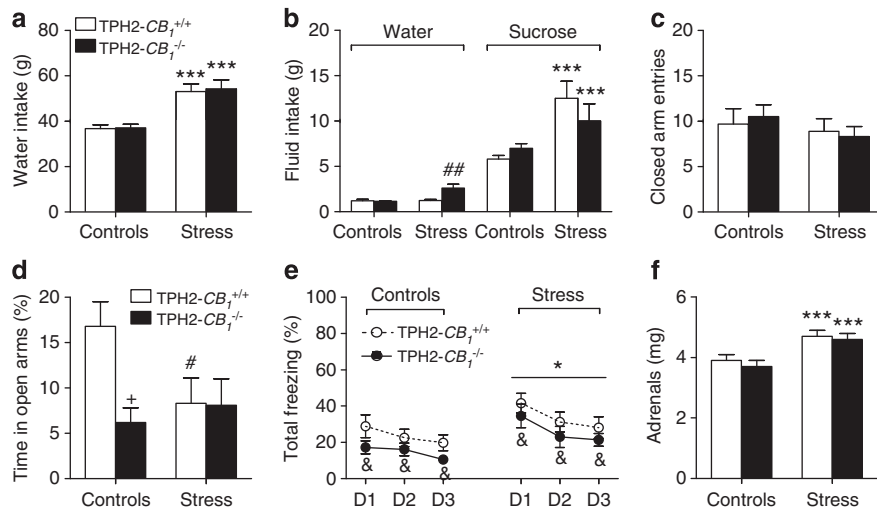


Figure 6 Influence of the conditional mutation of cannabinoid type-1 (CB₁) receptors from serotonergic neurons on the emotional profiles of control and stressed mice. This profile included 7-day water intakes (a), water and sucrose intakes in a free choice paradigm after the seventh stress session (b), closed arm entries (c) and percent time spent in the open arms (d) of an elevated plus-maze, freezing behavior during cued fear recall sessions 24–72 h after conditioning (e), and adrenal weight (f). D1–D3 stand for days 1–3. Values are the mean \pm SEM of 9–11 animals, except for (b) that refers to 8–10 animals per group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ for the overall effect of social stress in the ANOVA; & $p < 0.05$ for the overall influence of the genotype in the ANOVA; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ for stress influences within each genotype; + $p < 0.05$ for the genotype influence in unstressed or stressed animals. See text for ANOVAs and additional statistics.

$p = 0.0155$ for the stress \times genotype interaction), with stressed TPH2-CB₁^{-/-} mice ($75.97 \pm 5.96\%$, $n = 8$) differing from stressed TPH2-CB₁^{+/+} mice ($90.22 \pm 1.47\%$, $n = 9$; $p < 0.05$) whereas controls did not differ ($81.7 \pm 3.13\%$ and $85.69 \pm 0.82\%$ in nine TPH2-CB₁^{+/+} mice and in ten TPH2-CB₁^{-/-} mice, respectively). In the elevated plus-maze, stressed mice did not significantly differ from their control counterparts, both for their closed arm visits (Figure 6c) and for their percent visits in the open arms ($17.30 \pm 3.63\%$ and $11.05 \pm 2.68\%$ in 9 control wild-type mice and 11 control mutant mice, respectively, as opposed to $13.56 \pm 3.98\%$ and $9.68 \pm 2.44\%$ in 10 stressed wild-type mice and 11 stressed mutant mice, respectively). At the opposite, the percent time spent in the open arms was lower in TPH2-CB₁^{-/-} mice, as compared with TPH2-CB₁^{+/+} mice ($F_{(1,37)} = 4.60$; $p = 0.0386$), whereas stress bore an inhibitory impact on that variable in TPH2-CB₁^{+/+}, but not in TPH2-CB₁^{-/-} mice ($F_{(1,37)} = 4.18$; $p = 0.048$ for the stress \times genotype interaction; Figure 6d). The deletion of CB₁ receptors from central serotonergic neurons decreased ($F_{(1,37)} = 4.26$; $p = 0.046$), whereas social stress increased in a genotype-independent manner ($F_{(1,37)} = 6.23$; $p = 0.0171$), the freezing responses to the presentation of the cue during recall (Figure 6e). The analyses of within-session freezing behaviors in each genotype further indicated that social stress increased the amplitude of freezing in TPH2-CB₁^{-/-} mice ($F_{(1,20)} = 4.42$; $p = 0.0484$; Supplementary Figure S2h) whereas its impact in TPH2-CB₁^{+/+} mice did not reach significance because of the heterogeneity of the data (Supplementary Figure S2g). Stress did not affect the initial freezing responses to the cue, although a trend toward a stimulatory impact could be noted in the last recall session (Supplementary Figure S2i). Lastly, a stimulatory effect of social stress on adrenal weight was observed in both genotypes ($F_{(1,18)} = 17.77$; $p = 0.0005$; Figure 6f).

DISCUSSION

The goal of this study was to examine whether the ECS has a role in the processing of repeated social defeat and in the expression of emotional responses to such a stressor. In addition, this study addressed the question of the neuronal populations through which the ECS modulates these emotional responses to repeated social defeat. We first analyzed the influence of CB₁ receptor blockade before each stress session, and compared it with the impact of the constitutive mutation of CB₁ receptors. Thereafter, we addressed the possibility that distinct CB₁ receptor-expressing neuronal populations exert discrete or even opposite influences in stressed animals that could be masked in constitutive CB₁ receptor mutants. To this aim, we analyzed the respective influences of conditioned deletions of CB₁ receptors from cortical glutamatergic neurons, from GABAergic neurons, or from serotonergic neurons on the emotional profile of repeatedly stressed individuals. The results show that (i) stress-induced endocannabinoid release modulates the expression of cued fear memory, (ii) CB₁ receptors located on serotonergic neurons control unconditioned anxiety and cued fear expression, and mediate the increased sucrose preference observed in repeatedly stressed animals, (iii) CB₁ receptors on GABAergic neurons are involved in the locomotor reactivity profile of stressed animals, and (iv) social stress abolishes the deficits in fear extinction of constitutive CB₁ receptor mutants, an action that might be linked to the absence of CB₁ receptors from cortical glutamatergic neurons.

Treatments with indirect/direct CB₁ receptor agonists in stressed animals have helped to tackle the interactions between the ECS and stress circuitry. As an illustration, indirect/direct CB₁ receptor stimulation may reduce repeated stress-elicited body weight reductions, anhedonia

for sucrose, unconditioned anxiety, and proinflammatory consequences (Bortolato *et al*, 2007; Zoppi *et al*, 2011; but see Hill and Gorzalka, 2004). Although these studies provide new routes of therapeutic interventions in the management of stress-related disorders, they do not address the crucial question of the tonic role, if any, exerted by the ECS in the emotional consequences of repeated stress. Neurochemical, biochemical, and electrophysiological tools have indicated that the actions of the ECS are stress sensitive (Patel and Hillard, 2008; Hill *et al*, 2010b; Riebe and Wotjak, 2011). Whether, in turn, the ECS is involved in the emotional impacts of repeated stress is, however, a matter that has been only sparsely addressed. This issue led us to use the social defeat model of stress and to examine the respective amplitudes of a broad array of responses to repeated stress in mice fully or partly devoid of CB₁ receptor activity. However, one prerequisite for the use of social stress in the present study was the need to gather evidence that the ECS is sensitive to that stressor. Indirect support for such an alteration initially stemmed from the report that repeated social defeat impaired the ability of a CB₁ receptor agonist to decrease GABA release in the striatum (Rossi *et al*, 2008). The present analysis of central AEA and 2-AG levels in control and stressed animals provides a direct proof that the ECS is sensitive to a social defeat paradigm. Thus, AEA and 2-AG levels were modified in a brain region-dependent manner in acutely and repeatedly defeated mice. Acute social defeat decreased hippocampal AEA concentrations, but it did not impact on AEA levels in other brain regions or on 2-AG. Exposure to the last of the seven social defeats decreased also hypothalamic AEA levels whereas it increased 2-AG levels in the hypothalamus, hippocampus, and prefrontal cortex. These brain region- and endocannabinoid-dependent changes display similarity with those, respectively, documented in mice submitted to acute and repeated restraint stress sessions (Patel *et al*, 2005; Rademacher *et al*, 2008). This observation suggests that the mechanisms leading to these stress-elicited changes in AEA and 2-AG levels may be common to social defeat and restraint. Indeed, there is an experimental support to suggest that hyperactivity of the HPA axis could be such a mechanism (Hill *et al*, 2010b; Riebe and Wotjak, 2011). The initial observation that repeated, but not acute, exposure to a homotypic stressor increases 2-AG levels in mouse corticolimbic areas, including the basolateral amygdala (BLA), has raised the hypothesis that these increases may contribute to stress habituation (Patel and Hillard, 2008; Patel *et al*, 2009). Consistently, recent data in repeatedly restrained rats suggested that stress-induced decreases in corticolimbic AEA levels and increases in amygdaloid 2-AG levels are valuable markers of the habituation of the corticotropic axis to restraint (Hill *et al*, 2010a). These series of results open the question of the relationship between the aforementioned changes in endocannabinoid levels in our repeatedly socially defeated mice and habituation to repeated social stress. The answer to that question is not simple; thus, compared with acutely stressed animals, animals exposed to repeated social stress may show habituation, lack of habituation, or even sensitization according to the variable examined. As an illustration, the amplitude of the hyperthermia and the intensity of ultrasonic vocalization during the sensorial phase (see Figure 1a)

of the social stress procedure have been shown to be increased in repeatedly stressed animals, compared with acutely stressed animals (Tornatzky and Miczek, 1994; Bhatnagar *et al*, 2006). At the opposite, the amplitudes of both the tachycardia and the rise in circulating corticosterone levels associated to the social stress paradigm were found to desensitize progressively with the number of social stress episodes (Tornatzky and Miczek, 1994; Bhatnagar *et al*, 2006). In our hands, repeatedly defeated mice expressed higher (initial and total) freezing responses to cue presentation 1 day after conditioning, compared with acutely defeated mice and control mice (Supplementary Figure S3). This observation suggests that conditioned freezing behavior sensitized with the number of stress sessions. On the other hand, we have already reported that the dipsogenic response to social stress was not different between the first and the fifth stress session whereas the increased social stress-elicited sucrose preference was observed in repeatedly, but not in acutely, stressed animals (Dubreucq *et al*, 2012). These observations indicate that the relevance of repeated social stress-induced changes in CNS endocannabinoid levels to stress adaptation is at the present time difficult to determine. Actually, the study of the emotional, metabolic, and endocrine consequences of alterations in AEA and 2-AG synthesis/degradation processes in repeatedly defeated animals could help to solve this issue.

Repeated social defeats increased water consumption in all experiments. This dipsogenic impact of repeated stress, which has been documented in the past using mice exposed either to repeated social defeats (Krishnan *et al*, 2007; Dubreucq *et al*, 2012) or to mixed stressors (Strekalova *et al*, 2006), was not accounted for by changes in food intake. The mechanisms underlying repeated stress-induced dipsogeny as well as its significance in the context of adaptation to stress are unknown. The aforementioned observation that the daily increase in water intake in stressed animals is already maximal after the first social defeat episode (Dubreucq *et al*, 2012) indicates that repeated stress-induced dipsogeny is a phenotypic response that is held constant after each stress episode. It has been proposed that dipsogeny may belong to a behavioral repertoire that includes anhedonia for sucrose (Strekalova *et al*, 2006). The present study, wherein social stress in vehicle-injected animals and in wild-type animals triggered both dipsogeny and increased preference for sucrose, does not lend support to this hypothesis. Another finding provided by the present study is that stress-induced dipsogeny may be independent from the ECS as none of the paradigms used to alter CB₁ receptor function, including that aimed to block these receptors during stress only, proved effective on that variable.

It is now 30 years that the sucrose consumption/preference test is used to monitor the consequences of stress on hedonic processes, the dysregulation of which is a core symptom in human depression (Katz, 1981). When effective on sucrose consumption/preference, repeated stress is found to reduce sweet consumption in most, but not all, studies (Willner, 2005). The observation that repeated stress, such as chronic mild stress, may increase, rather than decrease, sweet consumption in a minority of studies has been considered a 'genuine phenomenon' with specific

neurobiological grounds (eg, hyperactivity of the mesolimbic dopaminergic system: Willner, 2005). As for chronic mild stress, social stress has been mainly shown to decrease sucrose preference (Krishnan *et al*, 2007; Becker *et al*, 2008; Covington *et al*, 2009; Miczek *et al*, 2011). However, other reports have concluded that social stress stimulates sucrose preference (Dubreucq *et al*, 2012) or bears no influence on that variable (Croft *et al*, 2005; Hollis *et al*, 2010). That our socially defeated mice increased, rather than decreased, their preference for sucrose, compared with their unstressed counterparts, is noteworthy. Whether the rewarding properties and/or the caloric value of sucrose drive this increase is presently unknown. The use of saccharin, which lacks caloric value, could help to tackle this issue. As indicated above, our observation of an increased preference for sucrose in repeatedly stressed mice has been already reported in animals exposed to chronic mild stress (Willner, 2005) or to other stressors (Dess, 1992; Pecoraro *et al*, 2004; Leigh Gibson, 2006). Several hypotheses can be proposed to understand this peculiar behavior in our stressed mice. The so-called 'comfort food hypothesis' (Dallman *et al*, 2003) postulates that the increased consumption of carbohydrates, due to their rewarding and caloric properties, may help to reduce hyperactivity of the HPA axis and of the sympathetic nervous system in stressed individuals. Stress-induced corticosterone release (in conjunction with insulin release) likely subserves increased carbohydrate consumption in stressed animals (Pecoraro *et al*, 2005), which is consistent with human observations indicating that, when submitted to psychological stress, women with high levels of cortisol (the human equivalent of rodent corticosterone) show increased sweet consumption, as opposed to individuals with low levels of cortisol (Newman *et al*, 2007). The second hypothesis is linked to the observation that mice submitted to a mixture of stressors or to social defeats for 4–5 weeks show respectively no change (Rygula *et al*, 2005) or increased (Strekalova *et al*, 2006) preference for sucrose (compared with their controls) when tested during the first or the second week of stress, but decreased preference for sucrose when tested thereafter. As already reported above, our social stress model triggers a progressive increase in sucrose preference, ie, sucrose preference is not altered after a single social defeat (Dubreucq *et al*, 2012). It is therefore possible that our mice might display decreased preference for sucrose if exposed to a higher number of social stress sessions. Lastly, because genetic factors have a key role in the physiological and emotional responses of the individual when confronted to social stress (Berton *et al*, 1997; Berton *et al*, 1998), we cannot exclude the hypothesis that the genetic background of our stressed mice had an impact on their sucrose preference.

The key role exerted by the ECS in the regulation of reward circuitry (Maldonado *et al*, 2006) led us to dissect the role of the ECS on stress-elicited sucrose overconsumption. Mice pretreated with the CB₁ receptor antagonist rimonabant before each stress session did not behave differently from vehicle-pretreated stressed mice. This result indicates that stress-elicited sucrose overconsumption was not accounted for by CB₁ receptor stimulation during stress. Such a conclusion differs from that gathered in a previous study, where rimonabant pretreatment before each stress session amplified the inhibitory impact of stress

on sucrose preference (Rademacher and Hillard, 2007). This discrepancy may be accounted for by numerous methodological differences, compared with the present study, including the stress model (restraint *vs* social defeat), the impact of that stressor on sucrose preference (inhibition *vs* stimulation), the duration of each sucrose preference test (1 h *vs* 12 h), the concentration of sucrose (10% *vs* 2%), and the metabolic state of the animals (20-h food- and water-deprivation before each test *vs* non-deprivation). Except for mice lacking CB₁ receptors on serotonergic neurons, none of the genetic manipulations of the ECS affected stress-induced overconsumption of sucrose. The observation that the behavior of TPH2-CB₁^{-/-} mice did not extend to CB₁^{-/-} mice may be considered paradoxical at first glance. Because social stress depends on the behavior of the resident mice, the possibility that TPH2-CB₁^{-/-} mice underwent less stress than TPH2-CB₁^{+/+} mice on the one hand, and CB₁^{-/-} mice on the other hand, might be considered. However, the observation that our stressed mice all received an equivalent number of daily attacks and displayed upright postures and squealing, which are overt signs of subordination (Miczek *et al*, 2001), renders this hypothesis unlikely. Actually, that conditional CB₁ receptor mutants display phenotypes differing from those measured in CB₁^{-/-} mice is not incongruent. Fasting-induced food intake as well as the consumption of palatable food are diminished in CB₁^{-/-} mice, but amplified in GABA-CB₁^{-/-} mice (Bellocchio *et al*, 2010), although the majority of CNS CB₁ receptors are located on GABAergic neurons (Marsicano and Lutz, 1999; Monory *et al*, 2006; Bellocchio *et al*, 2010). This observation suggests that cell type-specific functions of CB₁ receptors might be masked by the constitutive deletion of the receptor gene. Taken with these findings, the present study underlines the need to dissect the ECS at the level of the neuronal phenotype to understand its role in brain functions. Our observation that the stress-induced increase in sucrose preference was absent in TPH2-CB₁^{-/-} mice, as opposed to TPH2-CB₁^{+/+} mice, indicates that the population of CB₁ receptors located on dorsal raphe serotonergic neurons (Häring *et al*, 2007), albeit discrete, is essential for the expression of that phenotypic response to stress. Interestingly, control (ie unstressed) TPH2-CB₁^{-/-} mice did not display any alteration in sucrose preference, compared with their wild-type controls, a finding that was recently replicated using lower (1%) and higher (up to 9%) concentrations of sucrose (data not shown). These results indicate that CB₁ receptors on serotonergic neurons are involved in the regulation of sucrose intake under stressful conditions associated with increased sweet consumption, but not under control conditions. The inhibitory role of CB₁ receptors on GABA and glutamate neurotransmission (Alger, 2002; Piomelli, 2003; Chevaleyre *et al*, 2006; Ohno-Shosaku *et al*, 2012) may indeed extend to serotonergic transmission (Nakazi *et al*, 2000; but see Gobbi *et al*, 2005). It is thus expected that under conditions of ECS hyperactivity, the selective lack of CB₁ receptors from serotonergic neurons might result in an increased serotonin (5-HT) release, especially in animals exposed to stress, a situation favoring 5-HT neurotransmission (Chaouloff, 1993; Chaouloff, 2000). To the best of our knowledge, neither direct evidence for such an increased release of 5-HT nor its consequences on 5-HT neurotransmission

have been documented. The sole information available is based on studies performed on $CB_1^{-/-}$ mice, and which reported increased 5-HT release and alterations in pre- and post-synaptic receptor expression and/or function (Mato *et al*, 2007; Aso *et al*, 2009). Dorsal raphe neurons project along three ascending pathways to numerous brain locations (including the nucleus accumbens, the prefrontal cortex, the amygdala, the ventral/dorsal hippocampus, and the lateral septum) involved in the regulation of hedonic processes, but also anxiety- and fear-related behaviors (Michelsen *et al*, 2007). The present observation that CB₁ receptors on dorsal raphe serotonergic neurons control sucrose preference in stressed animals, but also open arm behaviors in the elevated plus-maze and cued fear expression (see below), indicates the need for future experiments to examine the functional role of CB₁ receptors on 5-HT release in these brain regions.

Comparative analyses of open arm behaviors in the elevated plus-maze (ie, anxiety-related indices; Ramos and Mormède, 1998; Crawley, 2008) between $CB_1^{+/+}$ mice and $CB_1^{-/-}$ mice have led to contradictory results (Viveros *et al*, 2005; Wotjak, 2005; Lafenêtre *et al*, 2007). The present study reveals that under our experimental settings (see below), neither repeated CB₁ receptor blockade nor CB₁ receptor mutation in cortical glutamatergic neurons or in GABAergic neurons altered open arm behaviors. Indeed, only trends, such as those observed in $Glu-CB_1^{-/-}$ mice, could be noted. The lack of effect of these mutations could be accounted for by the low aversiveness of the anxiety test used here (ie, an experimental condition chosen on purpose to be able to further observe stress-induced increases in anxiety). Indeed, naive (ie, unhandled) $CB_1^{-/-}$, $Glu-CB_1^{-/-}$ mice, and $GABA-CB_1^{-/-}$ mice all display anxiety when tested in a more aversive context such as a light/dark box (Moustié *et al*, unpublished data). Taken together, these observations support the hypothesis that CB₁ receptors exert a tonic control on anxiety responses when measured under highly aversive conditions (Haller *et al*, 2004). However, the present study indicates also that such a statement may not apply to all CB₁ receptor populations. Thus, under our experimental conditions, we observed that $TPH2-CB_1^{-/-}$ mice spent less time in the open arms and tended to visit less frequently the open arms, but not the closed arms (an index of locomotor reactivity: Ramos and Mormède, 1998), compared with $TPH2-CB_1^{+/+}$ mice.

Repeated social defeat has been documented for its anxiogenic impact (Merlo-Pich *et al*, 1993; Berton *et al*, 1998; Krishnan *et al*, 2007). The present study confirms this statement and shows that neither CB₁ receptor blockade during stress nor CB₁ receptor mutation in the whole body, in cortical glutamatergic neurons, or in GABAergic neurons influenced significantly open arm behaviors in stressed animals. On the other hand, it is unknown whether repeated stress proved inefficient on the percent time spent in the open arms by $TPH2-CB_1^{-/-}$ mice because (i) a floor effect was reached because of the mutation and/or (ii) CB₁ receptors on serotonergic neurons mediate the anxiogenic impact of repeated stress. Future studies will be required to tackle this particular issue. Besides its anxiogenic impact, a 1-week exposure to repeated stress may also alter the initial (ie, first 5 min) locomotor response to the placement into novel environments (but see Strekalova *et al*, 2005). As an

illustration, 7 daily restraint sessions increased locomotor reactivity in an open field (Ito *et al*, 2010) whereas 7–10 daily social defeat sessions decreased locomotion in novel activity cages or in an elevated plus-maze (Berton *et al*, 1998; Rygula *et al*, 2005; Krishnan *et al*, 2007). Here, repeated stress decreased locomotor reactivity, as assessed in the elevated plus-maze, and did so only in several mouse groups (eg, vehicle- and rimonabant-injected mice, $CB_1^{+/+}$ and $CB_1^{-/-}$ mice, $GABA-CB_1^{+/+}$ and $GABA-CB_1^{-/-}$ mice). Of particular interest was the finding that the deletion of CB₁ receptors from GABAergic neurons amplified the hypo-locomotor effect of stress. This suggests that endocannabinoid release, and then stimulation of these receptors, might help buffering the inhibitory impact of repeated stress on locomotor reactivity.

There is now extensive evidence that CB₁ receptors exert a tonic control on conditioned freezing responses to fearful stimuli (Marsicano *et al*, 2002; Suzuki *et al*, 2004; Chhatwal *et al*, 2005; Kamprath *et al*, 2006). Thus, acute CB₁ receptor blockade immediately before the first recall session (Marsicano *et al*, 2002; Suzuki *et al*, 2004; Chhatwal *et al*, 2005) or the genetic deletion of CB₁ receptors (Marsicano *et al*, 2002; Kamprath *et al*, 2006; Dubreucq *et al*, 2010) delays conditioned freezing extinction, possibly as a consequence of a dysregulation of habituation processes (Kamprath *et al*, 2006). The use of conditional CB₁ receptor mutants has further suggested that it is the absence of CB₁ receptors from cortical glutamatergic neurons that may be responsible for the phenotype observed in constitutive CB₁ receptor mutants (Kamprath *et al*, 2009). In the present study, between-session analyses of freezing behaviors and the comparison between the initial freezing responses to the cue in the control (unstressed) groups revealed that $CB_1^{-/-}$ mice displayed increased fear expression and delayed extinction, compared with $CB_1^{+/+}$ mice. On the other hand, within-session analyses of freezing in the two genotypes did not reveal differences in extinction rates, including if analyzed on a daily basis (data not shown). These data, which confirm that between- and within-session extinction processes are independent (Plendl and Wotjak, 2010), differ from previous findings (Marsicano *et al*, 2002; Kamprath *et al*, 2006; Plendl and Wotjak, 2010). It is likely that experimental differences between protocols, including recall environments, sound and shock intensities, and day time, underlie our failure to observe within-session extinction of freezing in $CB_1^{-/-}$ mice. A deregulation of conditioned fear responses has been observed in acutely and/or repeatedly stressed animals. Indeed, repeatedly stressed rats and mice that were cued fear-conditioned 1 or 7 days after the last stress session displayed an increased fear expression and/or impaired recall of extinction memory, compared with unstressed animals (Izquierdo *et al*, 2006; Miracle *et al*, 2006; Garcia *et al*, 2008). Interestingly, these stress-elicited changes in fear memory were more obvious when unstressed animals had reached extinction and were not accounted for by changes in acquisition during the conditioning sessions (Izquierdo *et al*, 2006; Miracle *et al*, 2006; Garcia *et al*, 2008; but see Rau and Fanselow, 2009). In the present study, between-session analyses of freezing in C57BL/6N mice (including vehicle-injected animals) and in wild-type animals (especially in $CB_1^{+/+}$, $Glu-CB_1^{+/+}$, and $TPH2-CB_1^{+/+}$ mice) confirmed that

repeated stress increases fear expression during recall (without changing the immediate freezing response to tone-shock pairing; data not shown). On the other hand, between- and within-session analyses of the effects of social stress in all mice revealed that stress did not affect extinction processes (as indicated by the inability of social stress to alter significantly the daily extinction slopes). Pretreatment with rimonabant before each stress session amplified freezing behavior throughout the three recall sessions, compared with vehicle-pretreated-stressed mice. This result suggests that the release of endocannabinoids that occurs during repeated social stress is involved in the extinction of a fear conditioned by a stimulus different from that used to stress the animals. Interestingly, the absence of CB₁ receptors from GABAergic neurons led to a pattern of freezing behavior that resembled that observed in rimonabant-pretreated mice, ie, an amplification of freezing during recall. These results suggest that rimonabant acted mainly through the blockade of that CB₁ receptor population. Surprisingly, stressed CB₁^{-/-} mice displayed decreased freezing responses to the auditory cue during the last two recall sessions, compared with stressed CB₁^{+/+} mice, and a similar phenotype was observed in stressed Glu-CB₁^{-/-} mice, compared with stressed Glu-CB₁^{+/+} mice. Thus, in both mouse lines, prior repeated stress reduced the difference in freezing behavior between wild-type and mutant littermates. Despite some differences between CB₁^{-/-} mice and Glu-CB₁^{-/-} mice, this observation suggests that the complex recall session-dependent freezing behavior observed in stressed CB₁^{-/-} mice lies on changes in the release of glutamate from cortical neurons. The brain regions involved in the fear memory profiles of stressed CB₁^{-/-} mice and Glu-CB₁^{-/-} mice are unknown at the present time. The BLA might have a key role because CB₁ receptors located therein have been recently shown to exert an inhibitory control over fear expression/extinction during late recall (48–72 h after conditioning, corresponding to our last two recall sessions), but not during early recall (ie, 24 h after conditioning, corresponding to our first recall session) (Kamprath *et al*, 2011).

In summary, this study reveals that (i) CB₁ receptors located on serotonergic neurons exert a control on the increased preference for sucrose triggered by repeated stress, (ii) stress-elicited increases in freezing responses to a cue during fear recall sessions are amplified by prior blockade of CB₁ receptors before each stress session, an effect that could be mediated by CB₁ receptors on GABAergic neurons, (iii) this last population exerts a control on the amplitude of the hypolocomotor reactivity that results from repeated stress, and (iv) repeated stress reverse in a time-dependent manner the increased conditioned freezing behavior observed in animals lacking CB₁ receptors from cortical glutamatergic neurons. On the basis of the use of pharmacologically, genetically, and an ethologically relevant model of stress, this study opens new routes of investigation on the role of distinct CB₁ receptor populations in the emotional consequences of repeated stress.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by AVENIR/INSERM (G.M.), EU-FP7 (REPROBESITY, HEALTH-F2-2008-223713, G.M.),

European Research Council (ENDOFood, ERC-2010-StG-260515, G.M.), NARSAD (2008 Independent Investigator Award to G.M.), Fondation pour la Recherche Médicale (G.M.), l'Agence Nationale pour la Recherche (G.M.), the Aquitaine Region (G.M.), la Délégation Générale pour l'Armement du Ministère de la Défense (S.D.), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR926, B.L.). We thank D. Gonzales and the Genotyping Platform of the NeuroCentre Magendie for mouse genotyping and re-genotyping, and D. Bartsch, M. Ekker, T. Lemberger, S.K. Nave, J. Rubinstein, and G. Schütz for providing the Cre-expressing mice.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Akirav I, Maroun M (2007). The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast* **2007**: 30873.
- Alger E (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* **68**: 247–286.
- Aso E, Renoit T, Mengod G, Ledent C, Hamon M, Maldonado R *et al* (2009). Lack of CB₁ receptor activity impairs serotonergic negative feedback. *J Neurochem* **109**: 935–944.
- Becker C, Zeau B, Rivat C, Blugeot A, Hamon M, Benoliel JJ (2008). Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystokinin. *Mol Psychiatry* **13**: 1079–1092.
- Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P *et al* (2010). Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nature Neurosci* **13**: 281–283.
- Berton O, Aguerre S, Sarrieu A, Mormède P, Chaouloff F (1998). Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* **82**: 147–159.
- Berton O, Ramos A, Chaouloff F, Mormède P (1997). Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains. *Behav Genet* **27**: 155–166.
- Bhatnagar S, Vining C, Iyer V, Kinni V (2006). Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. *J Neuroendocrinol* **18**: 13–34.
- Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A *et al* (2007). Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry* **62**: 1103–1110.
- Buwalda B, Kole MHP, Veenema AH, Huininga M, de Boer SF, Korte SM *et al* (2005). Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neurosci Biobehav Rev* **29**: 83–97.
- Chaouloff F (1993). Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res Rev* **18**: 1–32.
- Chaouloff F (2000). Serotonin, stress and corticoids. *J Psychopharmacol* **14**: 139–151.
- Chevaleyre V, Takahashi KA, Castillo PE (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* **29**: 37–76.
- Chhatwal JP, Davis M, Maguschak KA, Ressler KJ (2005). Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* **30**: 516–524.

- Covington HE, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O *et al* (2009). Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci* **29**: 11451–11460.
- Crawley JN (2008). Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron* **57**: 809–818.
- Croft AP, Brooks SP, Cole J, Little HJ (2005). Social defeat increases alcohol preference of C57BL/10 strain mice; effect prevented by a CCKB antagonist. *Psychopharmacology* **183**: 163–170.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H *et al* (2003). Chronic stress and obesity: a new view of 'comfort food'. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11696–11701.
- Dess NK (1992). Divergent responses to saccharin vs. sucrose availability after stress in rats. *Physiol Behav* **52**: 115–125.
- Dubreucq S, Kambire S, Conforzi M, Metna-Laurent M, Cannich A, Soria-Gomez E *et al* (2012). Cannabinoid type 1 receptors located on single-minded 1-expressing neurons control emotional behaviors. *Neuroscience* **204**: 230–244.
- Dubreucq S, Koehl M, Abrous DN, Marsicano G, Chaouloff F (2010). CB₁ receptor deficiency decreases wheel-running activity: consequences on emotional behaviours and hippocampal neurogenesis. *Exp Neurol* **224**: 106–113.
- Garcia R, Spennato G, Nilsson-Todd L, Moreau JL, Deschaux O (2008). Hippocampal low-frequency stimulation and chronic mild stress similarly disrupt fear extinction memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 560–566.
- Glass M, Dragunow M, Faull R (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal neonatal and adult human brain. *Neuroscience* **77**: 299–331.
- Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M *et al* (2005). Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18620–18625.
- Golden SA, Covington HE, Berton O, Russo SJ (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc* **6**: 1183–1191.
- Haller J, Varga B, Ledent C, Barna I, Freund TF (2004). Context-dependent effects of CB₁ cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur J Neurosci* **19**: 1906–1912.
- Härting M, Marsicano G, Lutz B, Monory K (2007). Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience* **146**: 1212–1219.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR *et al* (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1932–1936.
- Hill MN, Gorzalka BB (2004). Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB₁ receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Eur J Pharmacol* **499**: 291–295.
- Hill MN, Hillard CJ, McEwen BS (2011). Alterations in cortico-lymbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB₁ receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress. *Cereb Cortex* **21**: 2056–2064.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM *et al* (2010a). Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 9406–9411.
- Hill MN, Patel S, Campolongo P, Tasker JG, Wotjak CT, Bains JS (2010b). Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *J Neurosci* **30**: 14980–14986.
- Hill MN, Patel S, Carrier EJ, Rademacher DJ, Ormerod BK, Hillard CJ *et al* (2005). Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology* **30**: 508–515.
- Hollis F, Wang H, Dietz D, Gunjan A, Kabbaj M (2010). The effects of repeated social defeat on long-term depressive-like behavior and short-term histone modifications in the hippocampus in male Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology* **211**: 69–77.
- Huhman KL (2006). Social conflict models: can they inform us about human psychopathology? *Horm Behav* **50**: 640–646.
- Imai T, Chambon P, Metzger D (2000). Inducible site-specific somatic mutagenesis in mouse hepatocytes. *Genesis* **26**: 147–148.
- Ito H, Nagano M, Suzuki H, Murakoshi T (2010). Chronic stress enhances synaptic plasticity due to disinhibition in the anterior cingulate cortex and induces hyper-locomotion in mice. *Neuropharmacology* **58**: 746–757.
- Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A (2006). Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurosci* **26**: 5733–5738.
- Jacob W, Yassouridis A, Marsicano G, Monory K, Lutz B, Wotjak CT (2009). Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: role of glutamatergic transmission. *Genes Brain Behav* **8**: 685–698.
- Kamprath K, Marsicano G, Tang J, Monory K, Bisogno T, Di Marzo V *et al* (2006). Cannabinoid CB₁ receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *J Neurosci* **26**: 6677–6686.
- Kamprath K, Plendl W, Marsicano G, Deussing JM, Wurst W, Lutz B *et al* (2009). Endocannabinoids mediate acute fear adaptation via glutamatergic neurons independently of corticotropin-releasing hormone signaling. *Genes Brain Behav* **8**: 203–211.
- Kamprath K, Romo-Parra H, Härting M, Gaburro S, Doengi M, Lutz B *et al* (2011). Short-term adaptation of conditioned fear responses through endocannabinoid signaling in the central amygdala. *Neuropsychopharmacology* **36**: 652–663.
- Katona I, Sperlagh B, Ski A, Káfalvi A, Vizi ES, Mackie K *et al* (1999). Presynaptically located CB₁ receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* **19**: 4544–4558.
- Katz RJ (1981). Animal models and human depressive disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **5**: 231–246.
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ *et al* (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* **131**: 391–404.
- Lafenêtre P, Chaouloff F, Marsicano G (2007). The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB₁ receptors may modulate fear extinction. *Pharmacol Res* **56**: 367–381.
- Lafenêtre P, Chaouloff F, Marsicano G (2009). Bidirectional regulation of novelty-induced behavioral inhibition by the endocannabinoid system. *Neuropharmacology* **57**: 715–721.
- Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I *et al* (2011). Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nature Neurosci* **14**: 345–350.
- Leigh Gibson E (2006). Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiol Behav* **89**: 53–61.
- Lourenço J, Matias I, Marsicano G, Mulle C (2011). Pharmacological activation of kainate receptors drives endocannabinoid mobilization. *J Neurosci* **31**: 3243–3248.
- Lutz B (2009). Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Curr Opin Pharmacol* **9**: 46–52.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* **29**: 225–232.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A *et al* (2003). CB₁ cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**: 84–88.

- Marsicano G, Lutz B (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB₁ in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11: 4213–4225.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad S, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG et al (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418: 530–534.
- Massa F, Mancini G, Schmidt H, Steindel F, Mackie K, Angioni C et al (2010). Alterations in the hippocampal endocannabinoid system in diet-induced obese mice. *J Neurosci* 30: 6273–6281.
- Mato S, Aso E, Castro E, Martín M, Valverde O, Maldonado R et al (2007). CB₁ knockout mice display impaired functionality of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptors. *J Neurochem* 103: 2111–2120.
- Merlo-Pich E, Heinrichs SC, Rivier C, Miczek KA, Fisher DA, Koob GF (1993). Blockade of pituitary-adrenal axis activation induced by peripheral immunoneutralization of corticotropin-releasing factor does not affect the behavioral response to social defeat stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 18: 495–507.
- Michelsen KA, Schmitz C, Steinbusch HW (2007). The dorsal raphe nucleus – from silver stainings to a role in depression. *Brain Res Rev* 55: 329–342.
- Miczek KA, Maxson SC, Fish EW, Faccidomo S (2001). Aggressive behavioral phenotypes in mice. *Behav Brain Res* 125: 167–181.
- Miczek KA, Nikulina EM, Shimamoto A, Covington HE (2011). Escalated or suppressed cocaine reward, tegmental BDNF, and accumbal dopamine caused by episodic versus continuous social stress in rats. *J Neurosci* 31: 9848–9857.
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE (2008). Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther* 120: 102–128.
- Miracle AD, Brace MF, Huyck KD, Singler SA, Wellman CL (2006). Chronic stress impairs recall of extinction of conditioned fear. *Neurobiol Learn Mem* 85: 213–218.
- Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R et al (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51: 455–466.
- Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M, Schlicker E (2000). Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB₁ receptors. *Naunyn Schmiedebergers Arch Pharmacol* 361: 19–24.
- Newman E, O'Connor DB, Conner M (2007). Daily hassles and eating behaviour: the role of cortisol reactivity status. *Psychoneuroendocrinology* 32: 125–132.
- Ohno-Shosaku T, Tanimura A, Hashimoto Y, Kano M (2012). Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist* (in press).
- Patel S, Hillard CJ (2008). Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *Eur J Neurosci* 27: 2821–2829.
- Patel S, Kingsley PJ, Mackie K, Marnett LJ, Winder DG (2009). Repeated homotypic stress elevates 2-arachidonoylglycerol levels and enhances short-term endocannabinoid signaling at inhibitory synapses in basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 34: 2699–2709.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ (2005). Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* 21: 1057–1069.
- Pecoraro N, Gomez F, Dallman MF (2005). Glucocorticoids dose-dependently remodel energy stores and amplify incentive relativity effects. *Psychoneuroendocrinology* 30: 815–825.
- Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF (2004). Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145: 3754–3762.
- Piomelli D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873–884.
- Plendl W, Wotjak CT (2010). Dissociation of within- and between-session extinction of conditioned fear. *J Neuroscience* 30: 4990–4998.
- Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nature Neurosci* 12: 1152–1158.
- Rademacher DJ, Hillard CJ (2007). Interactions between endocannabinoids and stress-induced decreased sensitivity to natural reward. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 633–641.
- Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarranian A, Hillard CJ (2008). Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology* 54: 108–116.
- Ramos A, Mormède P (1998). Stress and emotionality: a multi-dimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 33–57.
- Rau V, DeCola JP, Fanselow MS (2005). Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1207–1223.
- Rau V, Fanselow MS (2009). Exposure to a stressor produces a long lasting enhancement of fear learning in rats. *Stress* 12: 125–133.
- Reich CG, Taylor ME, McCarthy MM (2009). Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB₁ receptors in male and female rats. *Behav Brain Res* 203: 264–269.
- Riebe CJ, Wotjak CT (2011). Endocannabinoids and stress. *Stress* 14: 384–397.
- Rossi S, De Chiara V, Musella A, Kusayanagi H, Mataluni G, Bernardi G et al (2008). Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptor-mediated control of GABA transmission in the striatum. *J Neurosci* 28: 7284–7292.
- Rygula R, Abumaria N, Flügge G, Fuchs E, Rütger E, Havemann-Reinecke U (2005). Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162: 127–134.
- Steiner MA, Wanisch K, Monory K, Marsicano G, Borroni E, Bächli H et al (2008). Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. *Pharmacogenomics J* 8: 196–208.
- Steiner MA, Wotjak CT (2008). Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Brain Res* 170: 397–432.
- Strekalova T, Gorenkova N, Schunk E, Dolgov O, Bartsch D (2006). Selective effects of citalopram in a mouse model of stress-induced anhedonia with a control for chronic stress. *Behav Pharmacol* 17: 271–287.
- Strekalova T, Spanagel R, Dolgov A, Bartsch D (2005). Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice. *Behav Pharmacol* 16: 171–180.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24: 4787–4795.
- Tornatzky W, Miczek KA (1994). Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology* 116: 346–356.
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393–411.

- Viveros MP, Marco EM, File SE (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* **81**: 331–342.
- Wamsteeker JJ, Kuzmiski JB, Bains JS (2010). Repeated stress impairs endocannabinoid signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* **30**: 11188–11196.
- Weber T, Böhm G, Hermann E, Schütz G, Schönig K, Bartsch D (2009). Inducible gene manipulations in serotonergic neurons. *Front Mol Neurosci* **2**: 24.
- Willner P (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* **52**: 90–110.
- Wotjak CT (2005). Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini Rev Med Chem* **5**: 559–570.
- Zoppi S, Pérez Nievas BG, Madrigal JL, Manzanares J, Leza JC, García-Bueno B (2011). Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* **36**: 805–818.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

Activation of the sympathetic nervous system mediates hypophagic and anxiety-like effects of CB₁ receptor blockade

Luigi Bellochio^{a,1}, Edgar Soria-Gómez^{b,c,1}, Carmelo Quarta^d, Mathilde Metna-Laurent^{b,c}, Pierre Cardinal^{b,c}, Elke Binder^{b,c}, Astrid Cannich^{b,c}, Anna Delamarre^{b,c}, Martin Häring^e, Mar Martín-Fontecha^f, David Vega^a, Thierry Leste-Lasserre^{b,c}, Dusan Bartsch^g, Krisztina Monory^e, Beat Lutz^e, Francis Chaouloff^{b,c}, Uberto Pagotto^d, Manuel Guzman^{a,2}, Daniela Cota^{b,c,2}, and Giovanni Marsicano^{b,c,2,3}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology I and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, School of Biology, Complutense University-Instituto Universitario de Investigación Neuroquímica, 28040 Madrid, Spain; ^bNeurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U862, F-33000 Bordeaux, France; ^cNeurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, U862, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; ^dEndocrinology Unit and Center for Applied Biomedical Research, Department of Medical and Surgical Sciences, S. Orsola-Malpighi Hospital, Alma Mater University of Bologna, I-40138 Bologna, Italy; ^eInstitute of Physiological Chemistry, University Medical Center, D-55128 Mainz, Germany; ^fDepartment of Organic Chemistry, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; and ^gDepartment of Molecular Biology, Central Institute of Mental Health and Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, D-68159 Mannheim, Germany

Edited by Leslie Lars Iversen, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, and approved February 11, 2013 (received for review October 25, 2012)

Complex interactions between periphery and the brain regulate food intake in mammals. Cannabinoid type-1 (CB₁) receptor antagonists are potent hypophagic agents, but the sites where this acute action is exerted and the underlying mechanisms are not fully elucidated. To dissect the mechanisms underlying the hypophagic effect of CB₁ receptor blockade, we combined the acute injection of the CB₁ receptor antagonist rimonabant with the use of conditional CB₁-knockout mice, as well as with pharmacological modulation of different central and peripheral circuits. Fasting/refeeding experiments revealed that CB₁ receptor signaling in many specific brain neurons is dispensable for the acute hypophagic effects of rimonabant. CB₁ receptor antagonist-induced hypophagia was fully abolished by peripheral blockade of β -adrenergic transmission, suggesting that this effect is mediated by increased activity of the sympathetic nervous system. Consistently, we found that rimonabant increases gastrointestinal metabolism via increased peripheral β -adrenergic receptor signaling in peripheral organs, including the gastrointestinal tract. Blockade of both visceral afferents and glutamatergic transmission in the nucleus tractus solitarius abolished rimonabant-induced hypophagia. Importantly, these mechanisms were specifically triggered by lipid-deprivation, revealing a nutrient-specific component acutely regulated by CB₁ receptor blockade. Finally, peripheral blockade of sympathetic neurotransmission also blunted central effects of CB₁ receptor blockade, such as fear responses and anxiety-like behaviors. These data demonstrate that, independently of their site of origin, important effects of CB₁ receptor blockade are expressed via activation of peripheral sympathetic activity. Thus, CB₁ receptors modulate bidirectional circuits between the periphery and the brain to regulate feeding and other behaviors.

fear and anxiety | sympathetic system

Appropriate feeding responses are determined by complex cross-talks between the central nervous system and peripheral organs (1). The endocannabinoid system (ECS) is an important modulator of central and peripheral regulation of energy metabolism (2, 3). In the brain, endogenous and exogenous cannabinoids oppositely regulate food intake, according to the neuronal population involved (4). On the other hand, the cannabinoid type-1 (CB₁) receptor antagonist rimonabant (SR141716) acutely induces hypophagia (5), but the sites and the mechanisms involved are not well defined yet.

CB₁ receptors control the activity of many neurotransmitter systems involved in central regulation of food intake (2). However, the ECS also regulates food intake and energy balance via

peripheral mechanisms (2, 3). Few studies have suggested that CB₁ receptor signaling could regulate food intake at peripheral sites (2, 6, 7). Fasting triggers the synthesis of gastrointestinal endocannabinoids, and endocannabinoids produced in the gastrointestinal tract may regulate food (mainly fat) intake (6). The peripheral sympathetic nervous system (SNS) is one of the main mechanisms engaged by CB₁ receptor-dependent signaling for the modulation of energy balance (8) and genetic or pharmacological CB₁ receptor blockade increases plasma levels of norepinephrine (8, 9). In turn, SNS activity regulates meal patterns (10) and is oppositely regulated by the organism's energy status, being decreased by fasting and increased by feeding (11). Finally, visceral afferents also play an important role in transmitting nutrient-derived intestinal signals to the brainstem, where glutamate and NMDA receptors modulate visceral sensory signaling pathways, ultimately regulating food intake (12). Interestingly, the interplay between SNS and brainstem glutamatergic activity also regulates other brain functions, such as fear and anxiety responses (13), and alterations in these functions represent the main side-effects of rimonabant use in humans (14).

In this study, we systematically investigated the potential sites and the mechanisms of the acute and rapid hypophagic action of rimonabant under fasting/refeeding, as well as its central effects on fear- and anxiety-like behaviors.

Results

CB₁ Receptors in Different Brain Neuron Types Are Dispensable for the Rapid Hypophagic Effect of Rimonabant. The acute hypophagic effect of rimonabant depends on CB₁ receptors expressed in neurons (8). Thus, we tried to identify the exact neuronal population involved in this phenomenon. Rimonabant bore no effect on fasting-induced food intake in constitutive CB₁-KO (5, 15) and in conditional mutant mice lacking CB₁ receptor expression in forebrain and sympathetic neurons (8, 16) (CaMK-CB₁-KO)

Author contributions: L.B., F.C., M.G., D.C., and G.M. designed research; L.B., E.S.-G., C.Q., M.M.-L., P.C., E.B., A.C., A.D., M.M.-F., D.V., T.L.-L., U.P., and M.G. performed research; M.H., D.B., K.M., B.L., and G.M. contributed new reagents/analytic tools; L.B., E.S.-G., C.Q., M.M.-L., P.C., M.M.-F., F.C., M.G., D.C., and G.M. analyzed data; and L.B., E.S.-G., U.P., M.G., D.C., and G.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹L.B. and E.S.-G. contributed equally to this work.

²M.G., D.C., and G.M. contributed equally to this work.

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: giovanni.marsicano@inserm.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1218573110/-DCSupplemental.

(Fig. S1 *A* and *B*). Mice characterized by the deletion of CB_1 receptors, either from cortical glutamatergic neurons (Glu- CB_1 -KO) or from GABAergic neurons (GABA- CB_1 -KO), respectively (17, 18), oppositely respond to fasting-induced food intake (4). Thus, CB_1 receptors expressed on inhibitory or cortical excitatory brain neurons might mediate rimonabant hypophagic effect. Vehicle-treated Glu- CB_1 -KO ate less than their WT littermates (Fig. 1*A*), whereas GABA- CB_1 -KO displayed a hyperphagic phenotype (Fig. 1*B*) (4). Surprisingly, however, rimonabant administration similarly reduced food intake in WT, Glu- CB_1 -KO (Fig. 1*A*), and GABA- CB_1 -KO mice (Fig. 1*B*), with no significant interaction between the factors “genotype” and “treatment.”

WT and TPH2- CB_1 -KO littermates (19), in which the CB_1 gene is deleted in the raphe nucleus but not in other brain regions (Fig. 1*C* and Fig. S1*C*), consumed a comparable amount of food and showed a similar acute response to rimonabant under fasting-refeeding conditions (Fig. 1*C*), suggesting that blockade of CB_1 receptor signaling on serotonergic neurons is dispensable for rimonabant-induced hypophagia.

The hypothalamus is a key brain region for the regulation of feeding (1), and the hypothalamic ECS activity is tightly controlled by the nutritional state of the organism (2). The paraventricular (PVN) and ventromedial (VMH) nuclei are among the hypothalamic areas where CB_1 receptors likely modulate food intake (2).

Sim1- CB_1 -KO mice carry deletion of the CB_1 gene in the PVN (Fig. S1*D*) and possibly in few scattered neurons located in other brain regions (e.g., basomedial amygdala, bed nucleus of the stria terminalis, ventral periaqueductal gray) and in some cells of the kidney (20). The mutant mice responded similarly to their WT littermates to fasting-induced food intake and to rimonabant treatment (Fig. 1*D*). Thus, CB_1 receptor expression in the PVN is not necessary for the endogenous control of fasting-induced food intake, or for the pharmacological effect of CB_1 receptor blockade.

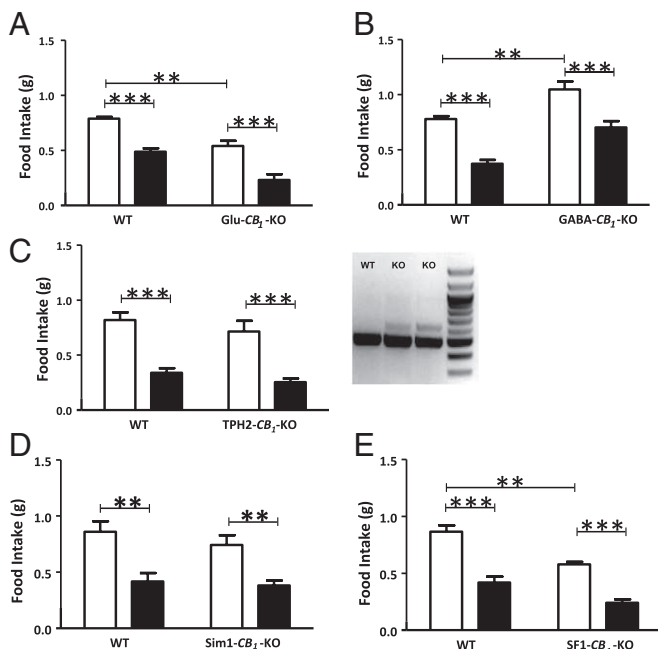


Fig. 1. The hypophagic effect of rimonabant does not depend on CB_1 expression in brain neurons. Effect of rimonabant (3 mg/kg, i.p., black bars) or vehicle (white bars) in (A) mutant Glu- CB_1 -KO mice; (B) GABA- CB_1 -KO mice; (C) TPH2- CB_1 -KO mice; (D) Sim1- CB_1 -KO mice; (E) SF1- CB_1 -KO mice, and respective WT littermates. (C, Right) PCR on genomic DNA extracted from dorsal raphe of WT and TPH2- CB_1 -KO mice (KO). CB_1 -floxed allele (Lower); deleted CB_1 allele (Upper). Data are means \pm SEM. $n = 6-9$ mice per group. Statistics by two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

To test the role of CB_1 receptors in VMH neurons, we crossed CB_1 -floxed mice with SF1-Cre mice, characterized by the expression of the recombinase under the regulatory sequences of the steroidogenic factor-1 (SF1), leading to recombination in the VMH, pituitary gland, and gonads (21). SF1- CB_1 -KO mice displayed $\sim 80\%$ CB_1 receptor deletion in the VMH (Fig. S1*E*) and showed a reduced fasting-induced hyperphagia (Fig. 1*E*). However, the hypophagic effect of rimonabant was still present (Fig. 1*E*). Thus, VMH CB_1 receptors are required for the endogenous control of fasting-induced food intake, but they are dispensable for the hypophagic effect of rimonabant.

Blockade of Peripheral β -Adrenergic Receptors Prevents Rimonabant-Induced Hypophagia in Fasting and Lipoprivic Conditions.

The SNS plays an important role in the regulation of food intake, particularly through the activation of peripheral β -adrenergic receptors (22, 23), and CB_1 receptors can inhibit central and peripheral norepinephrine (NE) release (24, 25). The systemic injection of the generic β -blocker propranolol induced a slight and nondose-dependent reduction of food intake in fasted mice (Fig. 2*A* and Fig. S2*A*). Interestingly, however, propranolol (10 mg/kg) fully blocked the hypophagic effect of rimonabant (Fig. 2*A*), suggesting that activation of β -adrenergic receptors is necessary for the acute anorectic effect of rimonabant. To distinguish between central and peripheral effects of β -adrenoreceptors blockade, we systemically pretreated C57BL/6N mice with the peripherally restricted β -blocker sotalol (Fig. S2*B*) (26). Sotalol pretreatment (3 mg/kg) fully prevented the hypophagic effect of 3 and 10 mg/kg rimonabant (Fig. 2*A*). The central administration of sotalol (2 μ g, intracerebroventricularly) did not affect rimonabant-induced hypophagia (Fig. 2*B*), confirming that the modulation of peripheral, but not central, β -adrenergic neurotransmission is involved in the hypophagic effect of rimonabant. Pretreatment with the selective β_3 -adrenoreceptor antagonist SR59230A (1 mg/kg) (27) or the ganglionic blocker hexamethonium (28) both abolished rimonabant-induced hypophagia (Fig. 2*C* and *D*), suggesting that the activation of sympathetic ganglia and of β_3 -adrenoreceptors is necessary for rimonabant-induced hypophagia.

SNS activity affects the use of substrates and the metabolic pathways engaged in signaling nutrient availability (11). To investigate whether the SNS-dependent effect of rimonabant might modulate specific food intake induced by acute glucose or lipid-deprivation, we administered rimonabant together with 2-deoxy-glucose (2-DG), an inhibitor of glucose utilization (29), or mercaptoacetate (MA), an inhibitor of fatty acid oxidation (30). Rimonabant partially reversed 2-DG-induced hyperphagia (Fig. 2*E*) but it fully prevented MA-triggered feeding (Fig. 2*F*). Moreover, sotalol did not alter the effect of rimonabant on 2-DG-induced hyperphagia (Fig. 2*E*), but it did block the effect of rimonabant on MA-induced feeding (Fig. 2*F*). Thus, the activation of peripheral β -adrenergic receptors specifically mediates the CB_1 receptor-dependent inhibition of hyperphagia induced by lipoprivation, but not that elicited by glucoprivation. According to this hypothesis, we measured the levels of plasma free fatty acids, which is a well-established marker of SNS-driven lipolysis (31). As observed in obese rats by others (9), rimonabant injection markedly increased this parameter only in conditions of food availability, such as free-feeding and refeeding (Fig. S2*C*).

CB_1 Receptor Blockade Enhances Gastrointestinal Activity Through an Increase in β -Adrenergic Signaling.

Gastrointestinal lipid-sensing mechanisms are mainly responsible for the hyperphagia induced by the inhibition of fatty-acid oxidation (30). Thus, we tested whether rimonabant-induced hypophagia is associated with functional metabolic changes in the gastrointestinal tract. Accordingly, rimonabant increased metabolism in the gut of food-deprived mice in a sotalol-dependent manner (Fig. 3*A* and *B*). We further analyzed markers of the G protein-coupled β -adrenergic signaling (32), such as protein kinase A (PKA) activity and cAMP levels, in the duodenum. Western blot analysis for the phosphorylated

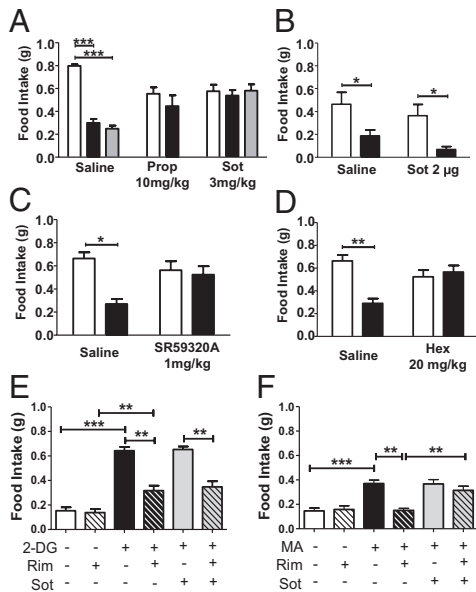


Fig. 2. Blockade of peripheral β -adrenergic receptors prevents rimonabant-induced hypophagia. Effect of rimonabant (black bars, 3 mg/kg, i.p.; gray bars, 10 mg/kg, i.p.) or its vehicle (white bars) in fasted mice pretreated with (A) the β -blocker propranolol (Prop, 10 mg/kg, i.p.) or with the peripherally restricted β -blocker sotalol (Sot, 3 mg/kg, i.p.); (B) the β -blocker sotalol administered centrally (2 μ g intracerebroventricularly); (C) the selective β -blocker SR59320A (1 mg/kg, i.p.); (D) the ganglionic blocker hexamethonium (Hex, 20 mg/kg, i.p.). (E) Effect of β -blocker sotalol (3 mg/kg, i.p.) and rimonabant (Rim, 3 mg/kg, i.p.) in conditions of glucoprivation induced by 2-DG injection (250 mg/kg, i.p.). (F) Effect of β -blocker sotalol (3 mg/kg, i.p.) and rimonabant (3 mg/kg, i.p.) in conditions of lipoprivation induced by MA injection (68 mg/kg, i.p.). Data are means \pm SEM. $n = 5$ –8 mice per group. Statistics by two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

substrates of PKA showed that rimonabant administration increases PKA activity (Fig. S3A). Despite the heterogeneity of the bands, semiquantitative evaluation revealed that rimonabant increased overall PKA-dependent phosphorylation by ~70%, 120%, and 1,000% in fed, fasted, and re-fed conditions, respectively (Fig. S3A). These results were in agreement with increased cAMP levels in the same samples, as measured by ELISA (Fig. S3B). Quantitative RT-PCR analysis revealed that the expression levels of β 1- and β 2-adrenoreceptor subtypes were not altered by rimonabant treatment, whereas CB_1 receptor blockade specifically reduced β 3-adrenoreceptor mRNA expression in the duodenum (Fig. S3C). In line with several reports showing that increased sympathetic activity is able to rapidly and strongly decrease β 3-adrenoreceptor mRNA both in vitro and in vivo (33–35), this effect has been proposed as a mechanism of receptor desensitization and is mediated by a cAMP-dependent process of transcriptional repression (36). Thus, increased β -adrenergic signaling in the duodenum seems to be the main event responsible for the β 3-adrenoreceptor-mediated hypophagic effect of rimonabant. To further confirm the activation of peripheral SNS under our study conditions, we analyzed different biochemical parameters also in the brown adipose tissue (BAT), an organ whose functions are critically under the control of the SNS (37). As in the gastrointestinal tract, rimonabant administration was able to increase glucose uptake and metabolic activity also in the BAT (Fig. S3D). Rimonabant action is most likely mediated by β -adrenergic receptor activation, as it was blocked by sotalol cotreatment (Fig. S3D). Furthermore, rimonabant increased PKA activity in this tissue when fasted animals were re-exposed to food (Fig. S3E). Direct measurement of NE uptake by PET imaging of ^{11}C -methoxyphedrine, a NE analog (8, 38), revealed that rimonabant increased tracer uptake in the BAT of both free-fed and fasted

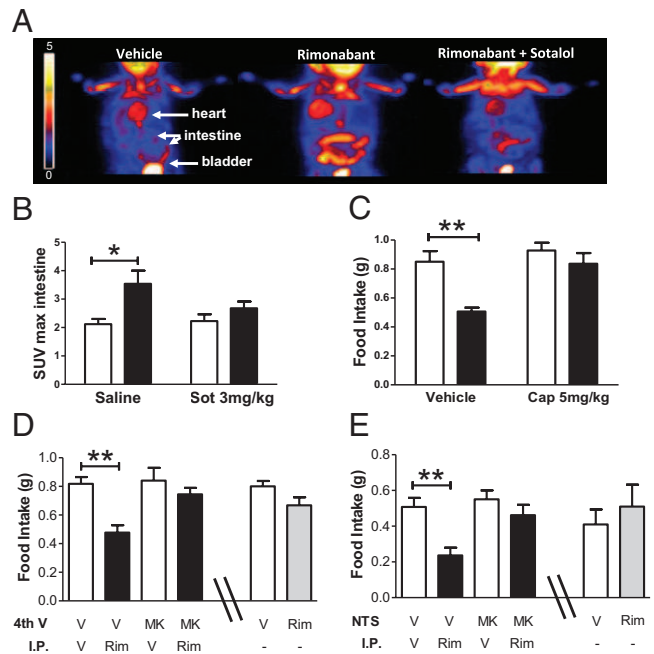


Fig. 3. CB_1 receptor blockade enhances gastrointestinal activity and increases glutamatergic transmission in the caudal brainstem through vagal innervation to reduce food intake. (A) Three-dimensional whole-body small animal PET images showing ^{18}F -FDG uptake in the intestine of mice treated with vehicle, rimonabant (10 mg/kg, i.p.), or rimonabant + sotalol (3 mg/kg, i.p.). Gradation bar, signal intensity expressed as radioactive counts. (B) Quantification [standard uptake value (SUV) max of ^{18}F -FDG uptake] of data in A. Black bars, rimonabant; white bars, vehicle. (C) Effect of capsaicin-induced deafferentation on rimonabant- (3 mg/kg, i.p., black bars) or vehicle- (white bars) induced changes in food intake. (D) The combination of fourth-ventricle injection of MK801 (MK, 2 μ g in 2 μ L) and rimonabant (Rim, 3 mg/kg, i.p., black bars) or their respective vehicles (white bars) on food intake. The effects of a direct injection of vehicle (V, white bar) or rimonabant (Rim, 10 μ g, gray bar) in the fourth ventricle are presented in the last two bars of the graph. (E) Effect of the combination of NTS bilateral injection of MK801 (0.2 μ g in 0.2 μ L) and rimonabant (3 mg/kg, i.p., black bars) or their respective vehicles (white bars) on food intake. The effects of a direct bilateral injection of vehicle (V, white bar) or rimonabant (Rim 1 μ g per site, gray bar) in the NTS are presented in the last two bars of the graph. Data are means \pm SEM. $n = 4$ –12 mice per group. Statistics by two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

animals (Fig. S3F). Taken together, these data show that rimonabant increases noradrenergic tone in peripheral tissues.

Capsaicin-sensitive fibers of the abdominal vagus nerve are known to contribute to both satiety and hyperphagia, particularly when the latter is induced by administration of fatty acid oxidation inhibitors, such as MA (30, 39, 40). To investigate whether vagal sensitive fibers may contribute to the anorectic effect of CB_1 receptor blockade, we pretreated mice with a low dose of capsaicin (5 mg/kg) 1 wk before the experiment. This dose of capsaicin fully blocked cholecystokinin (CCK)-induced hypophagia, but did not alter eye wiping (Fig. S4A and B) (41, 42). Thus, this treatment effectively disrupted vagal signaling, but spared primary sensory reflexes (41, 42). Interestingly, as previously shown with higher doses (7), capsaicin treatment blunted the hypophagia induced by rimonabant (Fig. 3C), suggesting a primary role of vagal transmission in the hypophagic effect of CB_1 receptor antagonism.

Glutamatergic Transmission in the Nucleus Tractus Solitarius Mediates Rimonabant-Induced Hypophagia. Glutamatergic transmission in the caudal brainstem is an important mechanism engaged by satiety signals derived from visceral afferents (12) and plays a specific role in feeding induced by lipoprivation (43, 44). Thus,

it can be expected that glutamatergic transmission in the brainstem is critically involved in rimonabant-induced hypophagia.

Injection of the NMDA receptor antagonist MK801 (MK) into the fourth ventricle or directly into the nucleus tractus solitarius (NTS) fully prevented rimonabant effect on food intake (Fig. 3 *D* and *E*, and Fig. S4C). This effect was not a result of a local enhancing action of rimonabant on glutamatergic transmission, because the microinjection of the drug into the fourth ventricle or into the NTS failed to alter food intake (Fig. 3 *D* and *E*).

Peripheral β -Adrenergic Signaling Mediates the Effects of Rimonabant on Conditioned Freezing and Anxiety-Like Behaviors. After determining that peripheral β -adrenergic signaling mediates the acute hypophagic effect of rimonabant, we wondered whether such a mechanism might also underpin other behavioral effects of CB_1 antagonism. Indeed, brain functions, like fear and anxiety responses, are regulated by interactions between the SNS and brainstem glutamatergic activity (13), and alterations in these functions represent the main side-effects of rimonabant use in humans (14). For example, the increase in SNS activity induced by rimonabant may be partly responsible of the drug's effect on conditioned freezing in fear-conditioning experiments (15). Rimonabant increased freezing of conditioned C57BL/6-N mice (Fig. 4A), and this effect was significantly impaired by sotalol pretreatment (Fig. 4A), suggesting that peripheral β -adrenergic signaling is involved in the effects of CB_1 receptor blockade on fear-induced freezing responses. Given the proposed role of noradrenergic transmission in anxiety disorders (45), we wondered if the anxiogenic effect of rimonabant (46) also depends on SNS activity. Systemic sotalol pretreatment prevented the anxiogenic effect of both systemic (Fig. 4B and Fig. S5A) and central (Fig. 4C and Fig. S5B) CB_1 receptor blockade in the elevated-plus-maze test, without altering locomotor activity (Fig. S5).

Discussion

An incessant cross-talk between periphery and brain guarantees proper control of energy balance. Our study reveals that the acute hypophagic effect of the CB_1 receptor antagonist rimonabant in

fasting-refeeding experiments does not primarily depend on CB_1 receptors expressed in a wide range of brain neuron types. Conversely, modulation of SNS activity, activation of the gastrointestinal tract, and afferent stimulation of glutamatergic transmission in the NTS appear to be necessary mechanisms for the suppression of fasting- or lipoprivic-induced food intake caused by rimonabant. Furthermore, increase in peripheral β -adrenergic transmission seems to account for other behavioral effects of systemic and central pharmacological CB_1 receptor blockade, such as increased fear-induced responses and anxiety-like behaviors.

Deletion of CB_1 receptor in GABAergic or cortical glutamatergic neurons strongly affects the (endo)cannabinoid control of stimulated food intake (4). However, acute rimonabant injection maintained its effect in these two mutant lines, suggesting that CB_1 receptor-dependent control of glutamatergic or GABAergic transmission is not involved in the hypophagia caused by pharmacological CB_1 receptor blockade. Furthermore, although CB_1 receptors are present in serotonergic neurons (47, 48), their expression is not required for the hypophagic effect of rimonabant, in line with the additive, but not synergistic effects of CB_1 receptor blockade and serotonin reuptake inhibition (2, 49). The hypothalamus is a key structure for endocannabinoid-mediated control of energy balance and food intake (2). CB_1 receptors are expressed in several hypothalamic nuclei where they can regulate both glutamatergic and GABAergic transmission (50), and expression and action of both orexigenic and anorexigenic hypothalamic neuropeptides (2, 51).

Among the hypothalamic nuclei, the VMH and the PVN are generally considered to exert food intake suppressant functions (1). The well-known inhibitory role of the ECS on neurotransmission would, therefore, find a logical mechanism of action in regulating the activity of PVN and VMH neurons to eventually increase food intake. Our data suggest that this finding holds true for VMH neurons, but not for PVN ones. Mice lacking CB_1 receptors in the VMH displayed a reduced fasting-induced food intake, whereas mice lacking CB_1 receptor in PVN neurons failed to show any phenotype. Nevertheless, CB_1 receptor deletion in these nuclei did not alter rimonabant-induced acute hypophagia. The phenotype of SF1- CB_1 -KO mice is very similar to the one of Glu- CB_1 -KO one (4), as both these mutant mouse lines display reduced stimulated food intake, but normal response to rimonabant. We recently showed that virally induced partial deletion of the CB_1 gene in the hypothalamus did not alter the rapid hypophagic effect of rimonabant 1 h after refeeding in fasted mice, although the drug did not decrease 24-h food intake (52). Thus, hypothalamic mechanisms may be involved in long-term effects of rimonabant, but not in the rapid hypophagic properties of acute rimonabant administration. A key difference between CaMK- CB_1 -KO mice (not responding to rimonabant) and all of the other mouse lines used in this study is the deletion of CB_1 expression in a subset of peripheral sympathetic neurons (8). CB_1 receptor activation inhibits peripheral noradrenergic transmission (24) and genetic deletion and pharmacological blockade of CB_1 receptors increase the levels of circulating noradrenaline (8, 9). In turn, SNS activity inhibits food intake (22, 23), and specific blockade of peripheral, but not central, β -adrenoreceptors blunted rimonabant-induced hypophagia. Thus, we propose that rimonabant-induced reduction of food intake is because of an increase in SNS activity. At this stage, however, we cannot conclude whether this SNS activation is a result of direct blockade of CB_1 receptors at SNS terminals or because of simultaneous upstream effects of the drug.

Activation of β -adrenergic receptors abolishes lipoprivic-induced hyperphagia (53) and enterocytes might specifically translate fatty-acid oxidation into a vagal afferent signal to control food intake (30). Here, we demonstrate that rimonabant blocks fasting- and lipoprivic-induced food intake by engaging sympathetic transmission in peripheral tissues, including the gastrointestinal tract.

Deafferentiation of vagal afferents by capsaicin pretreatment abolishes satiety signals (refs. 12 and 42, and present results), likely through increase of NMDA signaling in the NTS (12). Similar

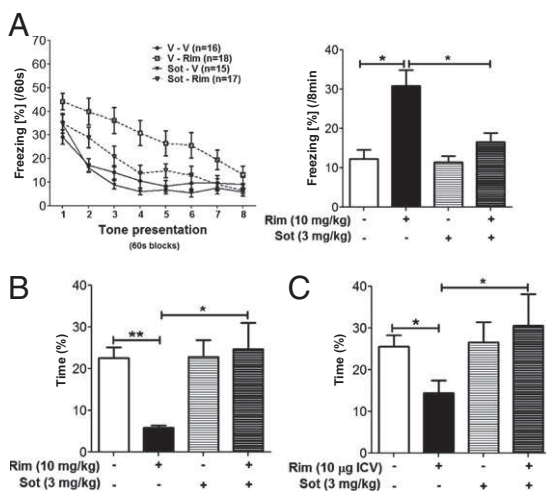


Fig. 4. Peripheral β -adrenergic signaling mediates the effects of rimonabant on fear-induced freezing and anxiety. (A) Effects of sotalol (3 mg/kg) and rimonabant (10 mg/kg) on fear-induced freezing. (Left) Time-course (1-min bins) over the 8-min tone presentation; (Right) total freezing. (B) Effects of sotalol (Sot, 3 mg/kg) and systemic rimonabant (Rim, 10 mg/kg) on the elevated-plus-maze test. (C) Effects of sotalol (3 mg/kg) and central rimonabant (10 μ g intracerebroventricularly) on the elevated-plus-maze test. Data are means \pm SEM. $n = 8$ –10 mice per group. Statistics by using one- or two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$.

mechanisms are likely involved in rimonabant-induced hypophagia, which requires intact abdominal capsaicin-sensitive fibers (ref. 7 and present results) and NMDA receptor activation in the NTS (present results). Vagal afferents contain CB₁ receptors (54). However, it is unlikely that rimonabant directly acts on vagal terminals in the NTS to reduce fasting-induced food intake. First, local injection of rimonabant into the NTS and the fourth ventricle did not acutely alter food intake. Second, CaMK-CB₁-KO mice, where rimonabant effects are abolished, still contain normal levels of CB₁ receptors in the vagal nodose ganglion (8). Conversely, our data suggest that the increased NMDA receptor signaling in the NTS is indirectly mediated by the rimonabant-induced increase of peripheral sympathetic adrenergic transmission. Interestingly, surgical and chemical lesions of vagal afferents, and lesions of sensory terminals in the NTS specifically abolish lipoprivic-induced feeding and Fos expression in the NTS (40, 43, 55). Thus, rimonabant likely exerts its hypophagic action by specifically interfering with a periphery-to-brain mechanism engaged to encode signals related to the use of fatty-acid substrates and availability. This conclusion is in agreement with recent evidence suggesting that gut-derived endocannabinoids exert a critical control over fat intake (6).

Our data suggest that systemic pharmacological CB₁ receptor blockade under fasting or lipoprivic conditions (*i*) directly or indirectly increases SNS activity (particularly in the gastrointestinal tract), eventually leading to (*ii*) activation of afferent fibers sending glutamatergic projections to the NTS, where (*iii*) increased NMDA neurotransmission triggers the decrease of food intake (27, 56). At this stage, we cannot determine which downstream events follow the rimonabant-induced activation of NTS neurons to decrease food intake. However, NTS signaling is known to engage several brain regions to modulate food intake, including hypothalamic circuits and dopaminergic transmission in limbic systems controlling food-related reward (2, 57–59).

Apart from the rapid modulation of food intake, rimonabant administration induces many additional behavioral and neuropsychiatric effects in animals and humans (14, 26). In particular, rimonabant increases freezing responses to conditioned fear stimuli in rodents (15). Interestingly, conditioned freezing shares similar β -adrenergic-dependent mechanisms (13). Our findings surprisingly suggest that rimonabant-induced freezing requires increased peripheral SNS activation. Interestingly, blockade of peripheral β -adrenergic transmission is also able to prevent the anxiogenic effect of systemic rimonabant injections. In addition, when rimonabant treatment is restricted to the central nervous system (intracerebroventricularly), its anxiogenic action still requires active peripheral β -adrenergic transmission. These data indicate that CB₁ receptor blockade is able to act centrally to increase peripheral noradrenaline release, and this may in turn lead to increased freezing and anxiety. This theory can be explained by two main sets of observations: (*i*) increased SNS activity is positively correlated with an increased anxiety status in both humans and laboratory animals (45); and (*ii*) the nutritional status strongly influences mood and behavior, in particular anxiety and

fear. For example, the vagal satiety mediator CCK is also able to increase anxiety via vagal signaling (60). This result is likely because of the widespread expression of CCK receptors in the central nervous system (61), as well as to an increase in noradrenergic-projection signaling, after vagal activation, from the NTS to key brain regions involved in the control of emotional behaviors, such as the PVN, the bed nucleus of stria terminalis, and the basolateral amygdala (62). Hence, rimonabant action in the central nervous system may be a means of increasing peripheral noradrenergic tone and of CCK-mediated vagal transmission (63), thus changing the perception of the nutritional status. The synergistic actions of these two mediators likely result in increased fear and anxiety behavior, as observed after acute rimonabant administration in our experimental setting. Thus, this finding leads us to conclude that the behavioral and hypophagic actions of rimonabant described herein share strong functional connections.

These data reveal a specific CB₁ receptor-dependent circuit linking peripheral lipid-sensing mechanisms to brain activity to modulate food intake in mammals through the SNS. Other behavioral effects of rimonabant, such as those on fear and anxiety, share similar neurobiological substrates. Taken together, the present findings pinpoint a unique CB₁ receptor-dependent bidirectional cross-talk between brain and periphery for the regulation of feeding and anxiety-related behaviors.

Experimental Procedures

Experimental procedures are described in *SI Experimental Procedures*. Procedures discussed are the conditional CB₁R mutant mice used, behavioral procedures, local and systemic pharmacological injections, biochemical experiments, and data analysis (for statistics, see Table S1). All animal procedures were conducted in accordance with standard ethical guidelines (European Communities Directive 86/60-EEC) and were approved by the Committee on Animal Health and Care of Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and French Ministry of Agriculture and Forestry (authorization A3310035).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank N. Aubailly, D. Gonzales and the personnel of the Animal and Genotyping Facilities of the NeuroCentre Magendie for mouse caring and genotyping; S. K. Nave, J. Rubenstein, M. Ekker, G. Schütz, T. Lemberger for providing Cre-expressing mice; and F. Georges and all the members of the G.M. laboratory for valuable suggestions. This work was supported in part by the European Research Council ENDOFOOD, ERC-2010-StG-260515 (to G.M.); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (G.M. and D.C.); the European Foundation for the Study of Diabetes-Sanofi Aventis (D.C. and G.M.); Aquitaine Region (D.C. and G.M.); EU-FP7 REPROBESITY, HEALTH-F2-2008-223713 (to G.M., B.L., and U.P.); EU-FP7 NEUROFAST FPVII-KBBE-2009-3-245009 (to U.P.); Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca-Progetti di Rilevante Interesse Nazionale (MIUR-PRIN) 2007 (to U.P.); FP7-People2009-IEF-251494 (to D.C. and E.B.); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Aquitaine Region PhD Fellowship Programme (to P.C.); the Fondation pour la Recherche Médicale (G.M.); Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), SAF2010-22198-C02-01 (to M.M.-F.) and SAF2012-35759 (to M.G.); Comunidad de Madrid S2010/BMD-2353 (to M.M.-F.) and S2010/BMD-2308 (to M.G.); and an European Molecular Biology Organization Long-Term Fellowship (to L.B.).

- Berthoud HR, Morrison C (2008) The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol* 59:55–92.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27(1):73–100.
- Tam J, et al. (2012) Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell Metab* 16(2):167–179.
- Bellochio L, et al. (2010) Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13(3):281–283.
- Di Marzo V, et al. (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410(6830):822–825.
- DiPatrizio NV, Astarita G, Schwartz G, Li X, Piomelli D (2011) Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(31):12904–12908.
- Gómez R, et al. (2002) A peripheral mechanism for CB₁ cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci* 22(21):9612–9617.
- Quarta C, et al. (2010) CB₁ signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metab* 11(4):273–285.
- Mølhoj S, et al. (2010) Effect of the cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant on lipolysis in rats. *Eur J Pharmacol* 646(1-3):38–45.
- Fu J, et al. (2011) Sympathetic activity controls fat-induced oleylethanolamide signaling in small intestine. *J Neurosci* 31(15):5730–5736.
- Landsberg L (2006) Feast or famine: The sympathetic nervous system response to nutrient intake. *Cell Mol Neurobiol* 26(4-6):497–508.
- Ritter RC (2011) A tale of two endings: Modulation of satiation by NMDA receptors on or near central and peripheral vagal afferent terminals. *Physiol Behav* 105(1):94–99.
- King SO, 2nd, Williams CL (2009) Novelty-induced arousal enhances memory for cued classical fear conditioning: interactions between peripheral adrenergic and brainstem glutamatergic systems. *Learn Mem* 16(10):625–634.
- Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A (2007) Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: A meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 370(9600):1706–1713.
- Marsicano G, et al. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418(6897):530–534.
- Marsicano G, et al. (2003) CB₁ cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302(5642):84–88.

17. Monory K, et al. (2007) Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol* 5(10):e269.
18. Monory K, et al. (2006) The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51(4):455–466.
19. Dubreucq S, et al. (2012) Genetic dissection of the role of cannabinoid type-1 receptors in the emotional consequences of repeated social stress in mice. *Neuropsychopharmacology* 37(8):1885–1900.
20. Dubreucq S, et al. (2012) Cannabinoid type 1 receptors located on single-minded 1-expressing neurons control emotional behaviors. *Neuroscience* 204:230–244.
21. Bingham NC, Verma-Kurvari S, Parada LF, Parker KL (2006) Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* 44(9):419–424.
22. Wellman PJ (2005) Modulation of eating by central catecholamine systems. *Curr Drug Targets* 6(2):191–199.
23. White CL, et al. (2004) Effect of a beta-3 agonist on food intake in two strains of rats that differ in susceptibility to obesity. *Physiol Behav* 82(2-3):489–496.
24. Ishac EJ, et al. (1996) Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 118(8):2023–2028.
25. Tzavara ET, Perry KW, Rodriguez DE, Bymaster FP, Nomikos GG (2001) The cannabinoid CB(1) receptor antagonist SR141716A increases norepinephrine outflow in the rat anterior hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 426(3):R3–R4.
26. Arendt RM, Greenblatt DJ, deJong RH, Bonin JD, Abernethy DR (1984) Pharmacokinetics, central nervous system uptake, and lipid solubility of propranolol, acebutolol, and sotalol. *Cardiology* 71(6):307–314.
27. Emorine LJ, et al. (1989) Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245(4922):1118–1121.
28. Wanke E, et al. (1987) Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca²⁺ current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(12):4313–4317.
29. Ritter RC, Slusser PG, Stone S (1981) Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: Location in the hindbrain. *Science* 213(4506):451–452.
30. Langhans W, Leitner C, Arnold M (2011) Dietary fat sensing via fatty acid oxidation in enterocytes: Possible role in the control of eating. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(3):R554–R565.
31. Bartness TJ, Shrestha YB, Vaughan CH, Schwartz GJ, Song CK (2010) Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Mol Cell Endocrinol* 318(1–2):34–43.
32. Xiang Y, Kobilka BK (2003) Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* 300(5625):1530–1532.
33. Bengtsson T, Redegren K, Strosberg AD, Nedergaard J, Cannon B (1996) Down-regulation of beta3 adrenoceptor gene expression in brown fat cells is transient and recovery is dependent upon a short-lived protein factor. *J Biol Chem* 271(52):33366–33375.
34. Fève B, Piétri-Rouxel F, el Hadri K, Drumare MF, Strosberg AD (1995) Long term phorbol ester treatment down-regulates the beta 3-adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol Chem* 270(18):10952–10959.
35. Granneman JG, Lahners KN (1995) Regulation of mouse beta 3-adrenergic receptor gene expression and mRNA splice variants in adipocytes. *Am J Physiol* 268(4 Pt 1):C1040–C1044.
36. Bengtsson T, Cannon B, Nedergaard J (2000) Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes. *Biochem J* 347(Pt 3):643–651.
37. Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK (2010) Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 34(Suppl 1):S36–S42.
38. Thackeray JT, Beanlands RS, Dasilva JN (2007) Presence of specific 11C-meta-Hydroxyephedrine retention in heart, lung, pancreas, and brown adipose tissue. *J Nucl Med* 48(10):1733–1740.
39. Ritter R, Brenner L, Yox D (1992) Participation of vagal sensory neurons in putative satiety signals from upper gastrointestinal tract. *Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents*, eds Ritter S, Ritter R, Barnes CD (CRC, Boca Raton, FL), pp 221–248.
40. Ritter S, Taylor JS (1989) Capsaicin abolishes lipoprivic but not glucoprivic feeding in rats. *Am J Physiol* 256(6 Pt 2):R1232–R1239.
41. Dogan MD, et al. (2004) Lipopolysaccharide fever is initiated via a capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor. *Br J Pharmacol* 143(8):1023–1032.
42. Garami A, Balaskó M, Székely M, Solymár M, Pétervári E (2010) Fasting hypometabolism and refeeding hyperphagia in rats: Effects of capsaicin desensitization of the abdominal vagus. *Eur J Pharmacol* 644(1–3):61–66.
43. Calingasan NY, Ritter S (1993) Lateral parabrachial subnucleus lesions abolish feeding induced by mercaptoacetate but not by 2-deoxy-D-glucose. *Am J Physiol* 265(5 Pt 2):R1168–R1178.
44. Duva MA, Siu A, Stanley BG (2005) The NMDA receptor antagonist MK-801 alters lipoprivic eating elicited by 2-mercaptoacetate. *Physiol Behav* 83(5):787–791.
45. Pervanidou P, Chrousos GP (2010) Neuroendocrinology of post-traumatic stress disorder. *Prog Brain Res* 182:149–160.
46. Moreira FA, Crippa JA (2009) The psychiatric side-effects of rimonabant. *Rev Bras Psiquiatr* 31(2):145–153.
47. Häring M, Marsicano G, Lutz B, Monory K (2007) Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience* 146(3):1212–1219.
48. Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M, Schlicker E (2000) Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 361(1):19–24.
49. Tallett AJ, Blundell JE, Rodgers RJ (2010) Effects of acute low-dose combined treatment with rimonabant and sibutramine on appetite and weight gain in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 97(1):92–100.
50. Reguero L, et al. (2011) GABAergic and cortical and subcortical glutamatergic axon terminals contain CB1 cannabinoid receptors in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *PLoS ONE* 6(10):e26167.
51. Cota D, et al. (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112(3):423–431.
52. Cardinal P, et al. (2012) Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology* 153(9):4136–4143.
53. Nisoli E, Garosi V, Blundell JE, Carruba MO (1996) Salbutamol antagonizes insulin- and sodium mercaptoacetate-induced but not 2-deoxy-D-glucose-induced hyperphagia. *Pharmacol Biochem Behav* 54(2):409–413.
54. Burdyga G, et al. (2004) Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J Neurosci* 24(11):2708–2715.
55. Langhans W, Scharrer E (1987) Evidence for a vagally mediated satiety signal derived from hepatic fatty acid oxidation. *J Auton Nerv Syst* 18(1):13–18.
56. Gu Q, Lin YS, Lee LY (2007) Epinephrine enhances the sensitivity of rat vagal chemosensitive neurons: Role of beta3-adrenoceptor. *J Appl Physiol* 102(4):1545–1555.
57. Grill HJ, Hayes MR (2009) The nucleus tractus solitarius: A portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. *Int J Obes (Lond)* 33(Suppl 1):S11–S15.
58. Kim EM, Quinn JG, Spanswick D, O'Hare E (2009) Feeding association between the nucleus of the solitary tract and the ventral tegmental area. *Appetite* 53(3):457–460.
59. Sinnayah P, et al. (2008) Feeding induced by cannabinoids is mediated independently of the melanocortin system. *PLoS ONE* 3(5):e2202.
60. Daugé V, Léna I (1998) CCK in anxiety and cognitive processes. *Neurosci Biobehav Rev* 22(6):815–825.
61. Dockray GJ (2009) Cholecystokinin and gut-brain signalling. *Regul Pept* 155(1–3):6–10.
62. Esteban S, García-Sevilla JA (2012) Effects induced by cannabinoids on monoaminergic systems in the brain and their implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 38(1):78–87.
63. Roux J, Wanaverbecq N, Jean A, Lebrun B, Trouslard J (2009) Depolarization-induced release of endocannabinoids by murine dorsal motor nucleus of the vagus nerve neurons differentially regulates inhibitory and excitatory neurotransmission. *Neuropharmacology* 56(8):1106–1115.

Supporting Information

Bellocchio et al. 10.1073/pnas.1218573110

SI Experimental Procedures

Animals. Experimental procedures were approved by the Committee on Animal Health and Care of Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and French Ministry of Agriculture and Forestry (authorization A3310035). Maximal efforts were made to reduce the suffering and the number of animals used. Male mice, aged 2–5 mo, were housed under a 12-h/12-h dark/light cycle (light on 7:00 AM, light off 7:00 PM) and maintained under standard conditions with food and water ad libitum unless otherwise specified. Mutant mouse lines were as described: constitutive CB_1 -KO (1), CaMK- CB_1 -KO [deletion in principal forebrain neurons and part of sympathetic neurons (2, 3)], GABA- CB_1 -KO [deletion in brain GABAergic neurons (4)], Glu- CB_1 -KO [deletion in cortical glutamatergic neurons (4)], Sim- CB_1 -KO [deletion in paraventricular hypothalamic neurons and scattered neurons in other brain regions (5)], TPH2- CB_1 -KO [deletion in serotonergic neurons (6)]. To generate steroidogenic factor-1 (SF1)- CB_1 -KO lines, CB_1 -floxed mice (2) were crossed with the SF1-Cre mouse line (7) by a three-step backcrossing method, as previously described (2, 4, 8). Cannabinoid type-1 (CB_1) mutant mice (Glu- CB_1 -KO, GABA- CB_1 -KO) were obtained, maintained and genotyped as described (1, 2) (see ref. 9 for a detailed anatomical characterization). All lines were in a mixed genetic background, with a predominant C57BL/6N contribution. All animals used in experiments involving mutant mice were littermates. Wild-type C57BL/6N mice were purchased from Janvier. Experimenters were always blind to genotypes and treatments.

Generation of Paraventricular, Ventromedial, and Serotonergic CB_1 -KO Mice. Cre-expressing mice were crossed with homozygous CB_1 -floxed mice ($CB_1^{fl/fl}$) to obtain heterozygous Cre-expressing/ CB_1 -floxed mice ($CB_1^{Cre;fl/+}$, step 1). These mice were again crossed with $CB_1^{fl/fl}$ to obtain homozygous $CB_1^{Cre;fl/fl}$ mice (step 2). Male mice from step 2 were finally bred with $CB_1^{fl/fl}$ females to generate experimental animals (step 3). Genotyping for the Cre transgene was performed by PCR using the following primers: forward: 5'-GATCGCTGCCAGGATATACG; reverse: 5'-CATCGCCATCTTCCAGCAG for both lines, whereas genotyping for the CB_1 -floxed locus was performed as previously described (2). Effective Cre-mediated deletion of CB_1 in the paraventricular (PVN) or in the ventromedial (VMH) mice was assessed by double in situ hybridization. For the generation of serotonergic CB_1 -KO mice, CB_1 -floxed mice (2) were crossed with the TPH2-Cre-ERT2 mouse line (10) by a three-step backcrossing method as above. Genotyping for the Cre transgene was performed by PCR using the following primers: forward: 5'-CCACTGCGGGCTCTACTC; reverse: 5'-TGATGATCTTCTGGCACAGCAG, whereas genotyping for the CB_1 -floxed locus was performed as previously described (2). To induce Cre translocation in the nucleus and consequent recombination, mice were treated with 1 mg of tamoxifen (Sigma-Aldrich) per mouse in 100 μ L of vehicle solution [10% (vol/vol) ETOH in sesame oil] for 5 consecutive days, at least 4 wk before the experiments (10). To identify the deletion of CB_1 , mice were killed by cervical dislocation and the brains were rapidly removed on ice-cold saline solution. Different brain regions, including the median raphe nucleus, the prefrontal cortex, amygdala, nucleus accumbens, hypothalamus, hippocampus, and dorsal striatum, were dissected using a coronal brain matrix (ASI Instruments) and genomic DNA was extracted by standard methods. The band corresponding to CB_1 genomic deletion was detected by PCR using the following primers: 5'-GCTGTCTCTGGTCTCTTAAA; reverse: 5'-CTCCTGTATGCCATAGCTCTT.

Double Fluorescent in Situ Hybridization. WT, Sim1- CB_1 -KO, and SF1- CB_1 -KO mice (two per genotype) were killed by cervical dislocation and their brains were analyzed for CB_1 and VGluT2 mRNA expression (11). Briefly, brains were isolated, quickly frozen on dry ice and stored at -80°C until sectioning in a cryostat (14 μm ; Microm HM 500M; Microm Microtech). DIG-labeled riboprobes against mouse VGluT2 receptor and FITC-labeled riboprobes against mouse CB_1 were prepared as previously described (1, 5). For signal amplification we used the TSA Plus System Cyanine 3/Fluorescein (Perkin-Elmer). Blocking buffer TNB and wash buffer TNT were prepared according to the manufacturer's protocol. Slides were analyzed by epifluorescence microscopy at 20 \times (Leica).

Surgery. Using a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments), mice were implanted with cannulae under ketamine and xylazine anesthesia. Cannulae were placed into the lateral cerebral ventricle (AP -0.5 mm from bregma, L -1.2 mm, and DV -2.1 mm below skull), in the fourth ventricle (AP -6.0 mm from bregma, L 0 mm, and DV -4.0 mm below skull), or bilaterally in the nucleus tractus solitarii (NTS) (AP -7.0 mm from bregma, L ± 0.7 mm, and DV -4.0 mm below skull) (12). One week after surgery, an internal injector was inserted into the implanted cannula (projecting 1-mm below the tip), connected via polyethylene tubing to a 25- μ L Hamilton syringe. The different drugs used (see below) were slowly injected by an automatic pump (Harvard Apparatus) at a rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. The correct placement of the cannulae was afterward confirmed as follows. For lateral ventricle cannulae, correct placement was verified by administering 5 μg of the well-known potent orexigenic peptide neuropeptide Y (NPY) (Phoenix Pharmaceuticals) in 1 μL of 0.9% physiological saline. Two mice that failed to eat a minimum of 0.5 g of chow within 2 h after the administration of NPY were removed from the study. For the fourth ventricle and NTS cannulae placement, mice were injected with 1% (wt/vol) toluidine blue solution (Sigma-Aldrich) and the brains were removed and processed for histological analysis.

Food-Intake Studies. Before the experiments, mice were singly housed for at least 7 d. Two hours after the light onset, animals were food-deprived for 24 h and then given free access to a preweighed amount of standard chow (Standard Rodent Diet A03; SAFE). Thirty minutes before refeeding the animals were injected with rimonabant (3 or 10 mg/kg, kindly obtained from National Institute of Mental Health Chemical Synthesis and Drug Supply Program) or vehicle [1.25% (vol/vol) DMSO, 1.25% (vol/vol) Tween80 in saline]. The β -blockers propranolol and sotalol (Sigma-Aldrich) were injected 3.5 h before rimonabant. For both systemic and intracerebroventricular injections, propranolol and sotalol were dissolved in 0.9% physiological saline solution, used as vehicle. Intracerebroventricular injections of sotalol (2 μg in 1 μL) were performed 5 min before the intraperitoneal injection of rimonabant. To characterize the role of glutamatergic brainstem transmission in the hypophagic effect of rimonabant, the NMDA antagonist MK801 (Tocris) was administered into the fourth ventricle (2 μg in 2 μL) or into the NTS (0.2 μg in 0.2 μL) 5 min prior the intraperitoneal injection of rimonabant. MK801 was dissolved in 10% (vol/vol) DMSO, 10% (vol/vol) Cremophor EL, and 80% (vol/vol) saline. Food intake was recorded 1, 2, 4, and 8 h after refeeding. Under these conditions, spillage of food was minimal. However, spillage was controlled by inspection of litter and calculated as uneaten food. To test glucoprivic feeding,

ad libitum-fed mice were injected intraperitoneally with saline (0.9%) or 2-deoxy-D-glucose (2-DG; Sigma-Aldrich; 250 mg/kg). To test lipoprivic feeding, mercaptoacetate (MA; Sigma-Aldrich; 68 mg/kg, 1 mL/kg) was injected via the same route. The doses for the two compounds were chosen according to previous studies in mice (13). In these experiments the β -blocker sotalol and rimonabant were administered 4 h and 30 min before treatment, respectively. Fresh food was presented immediately after 2-DG or MA injection and intake was measured 2 h and 4 h later (13).

Cued Fear Conditioning. Classic fear conditioning was carried out in a square conditioning box (Imetronic) made of gray Perspex (length, 26 cm; width, 18 cm; height, 25 cm) with a metal grid floor and located in a soundproof chamber (length, 55 cm; width, 60 cm; height, 50 cm). A video camera placed above the conditioning box allowed observation of the animals' behaviors. On the conditioning day, each mouse was placed into the conditioning chamber and left free to explore for 2 min. A single footshock (0.5 mA, 1 s, "squared" scrambler) was then coadministered during the last second of a 20-s tone (1.5 kHz, 60 dB). Twenty-four hours after conditioning, mice received the assigned treatment and were placed back in the chamber in their home cage to attenuate novelty-induced exploratory behaviors. They were then exposed to the tone (conditioned stimulus) for 8 min preceded by a 2-min pretone. Freezing (i.e., lack of movements except those associated with breathing) was scored by an experimenter blind to treatments and expressed as a percentage of time. Mice were injected with sotalol or saline vehicle (3 mg/kg, i.p.) and 10 mg/kg of rimonabant subcutaneously or its vehicle solution, described above.

Elevated-Plus-Maze Test. The apparatus consisted of four elevated arms 66-cm high, 45-cm long, and 10-cm wide. The arms were arranged in a cross-like disposition, with two opposite arms being enclosed by 50-cm-high walls and the two other arms being open. The four arms were connected by a squared central platform. Both the central platform and the open arms were under bright illumination (100–120 lx), and the closed arms were under weak illumination (30 lx). One-hour before the test, mice were injected with sotalol or saline vehicle (3 mg/kg, i.p.) and 10 mg/kg of rimonabant subcutaneously or its vehicle solution, as described above. In another set, mice received the sotalol dose mentioned above and then 10 μ g of rimonabant in 2 μ L intracerebroventricularly. The vehicle used was 10% (vol/vol) DMSO, 10% (vol/vol) Cremophor EL, and 80% (vol/vol) saline. Each mouse was placed on the central platform, facing an open arm. The number of visits to, and the time spent on, the open arms and the closed arms were recorded for 5 min using a video camera placed above the apparatus.

Biochemical Characterization of Sympathetic Nervous System Activity. Free-fed, fasted, and fasted-refed mice were injected intraperitoneally with vehicle or 10 mg/kg of rimonabant and 1.5 h after injection mice were deeply anesthetized with ketamine/xylazine as described above. Blood was collected by intracardiac puncture using EDTA as anticoagulant and then centrifuged at 4 °C to obtain plasma. This plasma was used for free fatty acids measurement by a kit based on colorimetric enzymatic assay (Biovision) according to the manufacturer's instructions. Samples of duodenum and brown adipose tissue (BAT) were dissected, quickly washed in ice-cold PBS, and frozen in dry ice. For Western blotting and cAMP detection, proteins were extracted by sample lysis in a buffer containing 50 mM Tris, 0.1% Triton X-100, 1 mM ethylene glycol tetra-acetic acid (EGTA), 50 mM NaF, 10 mM sodium β -glycerophosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, and 1 mM sodium orthovanadate (pH 7.5) supplemented with a protease inhibitor mixture (Roche), 0.1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, and 1 μ M microcystin, and then quantified by Bradford reactive

(BioRad). The running buffer consisted of 200 mM glycine, 25 mM Tris and 0.1% SDS (pH 8.3), and the transfer buffer contained 200 mM glycine, 25 mM Tris and 20% (vol/vol) methanol (pH 8.3). Blots were incubated with Tris-buffered saline (20 mM Tris and 0.5 mM NaCl, pH 7.5)/Tween-20 (0.1%) supplemented with 1% (wt/vol) dry milk. Phosphorylated substrates of PKA were detected by using a specific phospho-(Ser/Thr) PKA substrate antibody (Cell Signaling) and anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich) was used as loading control. cAMP was measured by an enzyme-linked immunoassay kit (Cell Signaling) according to the manufacturer's instructions and data expressed as nanomole per milligram of extracted protein. RNA from the duodenum was extracted and converted into cDNA, as previously described (3). mRNA for the three β -adrenergic receptor subtypes was measured by quantitative real-time PCR as previously described (3). Oligonucleotides used were the following: β 1-AdR (NM_007419) forward TTCTCCTAGAGGGCAAACCTTGT, reverse CAGAGTGAGGTA-GAGGACCCACA; β 2-AdR (NM_007420) forward GAGGATGCCCCAGGCATG, reverse TGGGAGTCAACGCTAAGGCT; β 3-AdR (NM_013462) forward CGACATGTTCCCTCCACAAA-TCA, reverse TGGATTCTGCTCTCAAATAACC. Two house-keeping genes were used as reference: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, NM_008084.2) forward TCAAGAA-GGTGGTGAAGCAG, reverse TGGGAGTTGCTGTTGAAG-TC; succinate dehydrogenase complex A (SDHA, NM_023281.1) forward TACAAAGTGCGGGTTCGATGA, reverse TGTTCC-CCAAACGGCTTCT.

Capsaicin-Induced Sensory Deafferentiation. One week before the experiments, animals were injected intraperitoneally with 5 mg/kg of capsaicin (Tocris). The drug was dissolved in saline with 1/20 of EtOH and 1/20 of Cremophor EL (Sigma-Aldrich). To test the efficacy of vagal deafferentiation, mice were fasted for 24 h and injected with saline or cholecystokinin (CCK) (20 μ g/kg, Sigma), and food consumption was assessed during 30 min. Nearly no effect of CCK should be expected in animals with functionally impaired (desensitized) gut vagal afferents. To test the specificity of the deafferentiation, the eye-wiping test (14, 15) was performed. A drop of 1% (wt/vol) NH₄OH solution was applied in the mouse's eye and the number of wipes during the first 30 s was counted. If the desensitization of afferent nerve fibers extended to locations outside the abdominal cavity, thus resulting in the abolition of the chemosensitivity of the cornea, the test was expected to reveal a suppression of the wiping defense (14, 15).

Small Animal PET Studies. The 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose (¹⁸F-FDG) small animal PET analyses were performed as previously described (3). Fasted 8-wk-old C57BL/6N mice were analyzed by two different imaging sessions. In the first session mice were treated intraperitoneally with vehicle or rimonabant (10 mg/kg) and 1 h later the ¹⁸F-FDG PET examination started. The same procedure was repeated 1 wk later, but this time animals were pretreated with sotalol (3 mg/kg, i.p.) and then randomly assigned to rimonabant or vehicle treatment as above. Experiments with ¹¹C-metahydroxyephedrine were performed on fasted and free-fed mice, as previously described (3).

Sotalol Determination in Mouse Serum and Brain by LC/MS. Analysis of sotalol in serum and tissues was performed by LC/MS using (\pm)-sotalol-d₇•HCl as internal standard, as described previously (16, 17). Serum samples or homogenated brain samples, together with the internal standard [(\pm)-sotalol-d₇•HCl; CDN Isotopes], were centrifuged at 3,000 \times g for 10 min, the supernatants were diluted 1:1 (vol/vol) with 25 mM ammonium acetate (pH 5) and applied to a molecularly imprinted solid-phase extraction cartridge for β -blockers (SupelMIP SPE Beta-blockers 3-mL SPE tube; Supelco), which was previously equilibrated with methanol

(1 mL), deionized (DI) water (1 mL), and 25 mM ammonium acetate (pH 5, 1 mL). The cartridge was then washed with 50 mM ammonium acetate (pH 6.5, 1 mL), DI water (1 mL), acetonitrile (1 mL), 60% (vol/vol) acetonitrile in DI water (1 mL), and dichloromethane (1 mL), applying gentle vacuum between each wash step. Finally, the elution step was carried out with 3 × 1 mL of 10% (vol/vol) acetic acid in methanol. The solvent was evaporated under a stream of nitrogen and the samples were reconstituted in 100 μL of DI water, 60 μL of which were analyzed by LC/MS. LC/MS analysis was performed using an Agilent 1200LC-MSD VL instrument. LC separation was achieved with an Agilent Eclipse XDB-C18 column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) together with a guard column (5 μm, 4.6 mm × 12.5 mm). The gradient elution mobile phases consisted of A (95:5 water:methanol) and B (95:5 methanol:water) with 0.1% formic acid as the solvent modifier. The gradient started at 0% B, was kept in an isocratic mode for 6 min, increased linearly to 40% B over the course of 4 min, with a flow rate of 0.5 mL/min, raised to 100% B over 6 min,

followed by isocratic gradient for 5 min, and finally reduction to 0% B for 4 min and equilibration at 0% B for 5 min. MS analysis was performed with an electrospray ionization source. The capillary voltage was set to 3.0 kV and the fragmentor voltage was set at 70 eV. The drying gas temperature was 350 °C, the drying gas flow rate was 10 L/min and the nebulizer pressure was 20 psi. LC/MS measurements were made by selected ion monitoring. Fractions were quantified by measuring the area under the peak. In all cases, control experiments—with plasma or tissues from mice which were not treated with sotalol—were performed to rule out the presence of endogenous levels or other metabolites with the same molecular weight or retention time.

Statistical Analysis. Data are presented as mean ± SE of individual datapoints. Data were analyzed using one or two-way ANOVA, using genotype and treatment as variables, and Bonferroni post hoc test (Table S1). Graphs and statistics were generated by GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software; <http://www.graphpad.com>).

- Marsicano G, et al. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418(6897):530–534.
- Marsicano G, et al. (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302(5642):84–88.
- Quarta C, et al. (2010) CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metab* 11(4): 273–285.
- Monory K, et al. (2006) The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51(4):455–466.
- Dubreucq S, et al. (2012) Cannabinoid type 1 receptors located on single-minded 1-expressing neurons control emotional behaviors. *Neuroscience* 204:230–244.
- Dubreucq S, et al. (2012) Genetic dissection of the role of cannabinoid type-1 receptors in the emotional consequences of repeated social stress in mice. *Neuropsychopharmacology* 37(8):1885–1900.
- Bingham NC, Verma-Kurvari S, Parada LF, Parker KL (2006) Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* 44(9):419–424.
- Monory K, et al. (2007) Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol* 5(10):e269.
- Marsicano G, Lutz B (2006) Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest* 29(3):Suppl:27–46.
- Weber T, Schönig K, Tews B, Bartsch D (2011) Inducible gene manipulations in brain serotonergic neurons of transgenic rats. *PLoS ONE* 6(11):e28283.
- Bellocchio L, et al. (2010) Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13(3):281–283.
- Paxinos G, Franklin K (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic, San Diego, CA).
- Wu X, Wiater MF, Ritter S (2010) NPAS2 deletion impairs responses to restricted feeding but not to metabolic challenges. *Physiol Behav* 99(4):466–471.
- Dogan MD, et al. (2004) Lipopolysaccharide fever is initiated via a capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor. *Br J Pharmacol* 143(8): 1023–1032.
- Garami A, Balaskó M, Székely M, Solymár M, Pétervári E (2010) Fasting hypometabolism and refeeding hyperphagia in rats: Effects of capsaicin desensitization of the abdominal vagus. *Eur J Pharmacol* 644(1–3):61–66.
- Badaloni E, et al. (2003) Enantioselective liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric assay of beta-adrenergic blockers: Application to a pharmacokinetic study of sotalol in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 796(1):45–54.
- Läer S, Neumann J, Scholz H, Uebeler P, Zimmermann N (1996) Determination of sotalol in human cardiac tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 681(2):291–298.

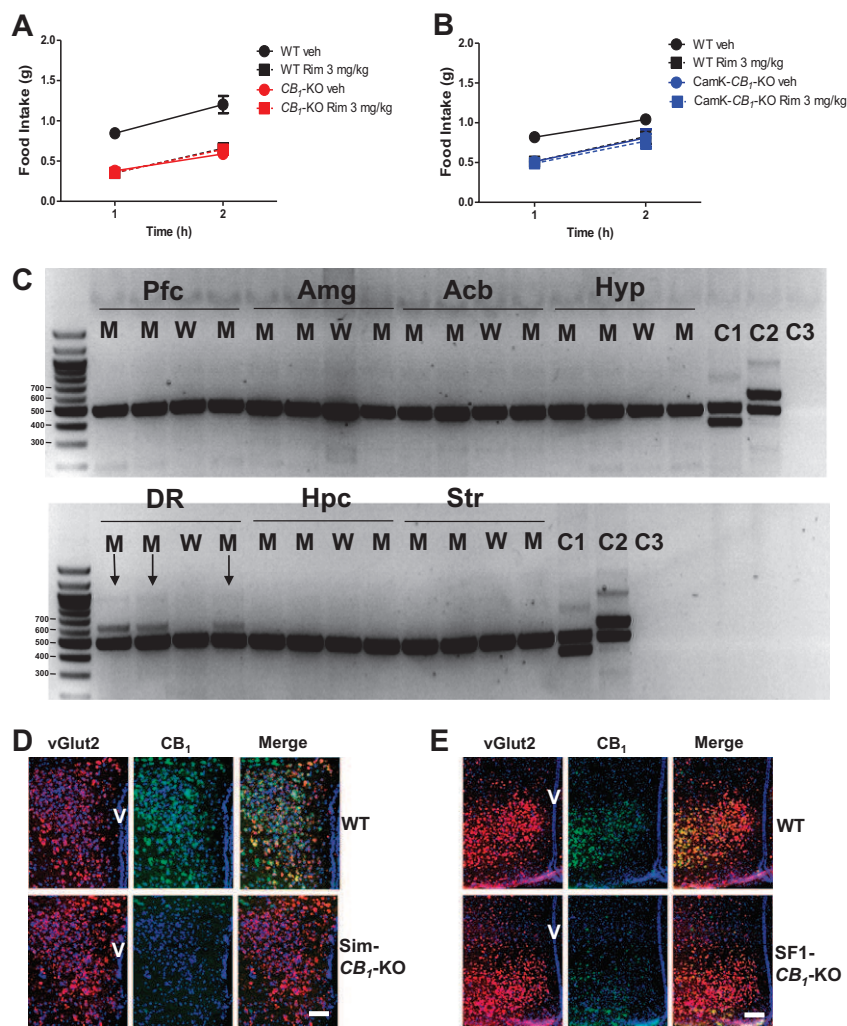


Fig. S1. (A) Effect of rimonabant (Rim, 3 mg/kg, i.p.) or its vehicle in WT and CB₁-KO mice. *n* = 5–6 mice per group. (B) Effect of rimonabant (Rim, 3 mg/kg, i.p.) or its vehicle in WT and CaMK-CB₁-KO mice. *n* = 5–6 mice per group. Data are means ± SEM. Statistical analysis was done using two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest. (C) PCR on genomic DNA extracted from different brain regions of WT (W) and TPH2-CB₁-KO mice (M). L, DNA ladder; C1, positive control for floxed CB₁ allele; C2, positive control for both CB₁-floxed allele (Lower) and excised CB₁ allele (Upper); C3, negative PCR control. Note the presence of the deleted CB₁ allele in the dorsal raphe (DR) of mutant mouse (arrows, see also Fig. 1C, Inset). The low intensity of the deleted band is due to the fact that only a minority of cells in the DR is serotonergic and express TPH2. Acb, nucleus accumbens; Amg, amygdala; Hpc, hippocampus; Hyp, hypothalamus; Pfc, prefrontal cortex; Str, dorsal striatum. (D) Double fluorescent in situ hybridization for CB₁ and the marker of glutamatergic neurons vesicular glutamate transporter 2 (Vglut2) mRNAs in the paraventricular hypothalamus (PVH) of WT and Sim-CB₁-KO mice. V, third ventricle. (Scale bar, 400 μm.) (E) Double fluorescent in situ hybridization for CB₁ and the marker of glutamatergic neurons vesicular glutamate transporter 2 (Vglut2) mRNAs in the ventromedial hypothalamus (VMH) of WT and SF1-CB₁-KO mice. V, third ventricle. (Scale bar, 200 μm.)

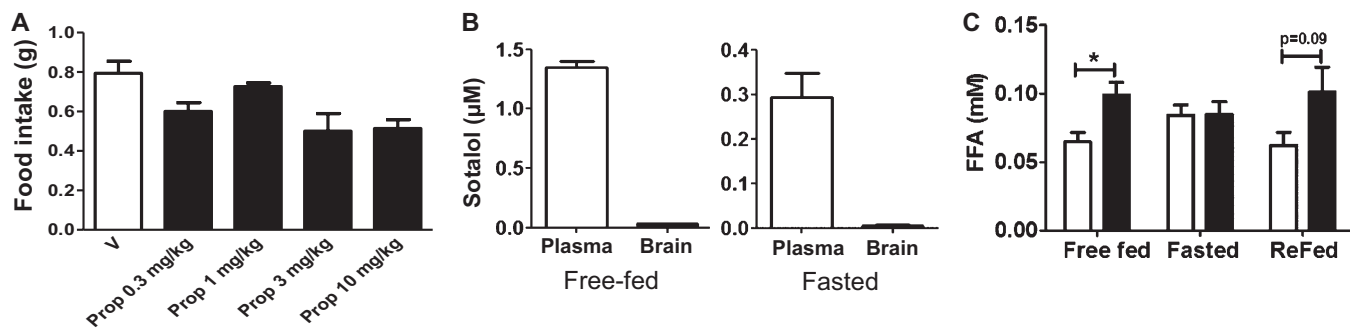


Fig. S2. (A) Dose-response of propranolol (Prop) injection on fasting-induced food intake in C57BL/6Ncr1 mice. $n = 5$ per group. Data are means \pm SEM. Statistical analysis was done using one-way ANOVA followed by Tukey's posttest. (B) Measurement of sotalol by LC-MS in plasma and brain of mice in two different conditions: free-fed mice injected (3 mg/kg, i.p.) 1 h before being killed and 24-h fasted mice injected 4 h before being killed. In both conditions sotalol is 40–50 times more abundant in plasma indicating its peripheral specificity. $n = 5$ per group. (C) Effect of rimonabant injection on circulating free fatty acids (FFA) in different nutritional status; $n = 6$ –7 per group. Data are means \pm SEM. Statistical analysis was done using two-way ANOVA or Student t test. $*P < 0.05$.

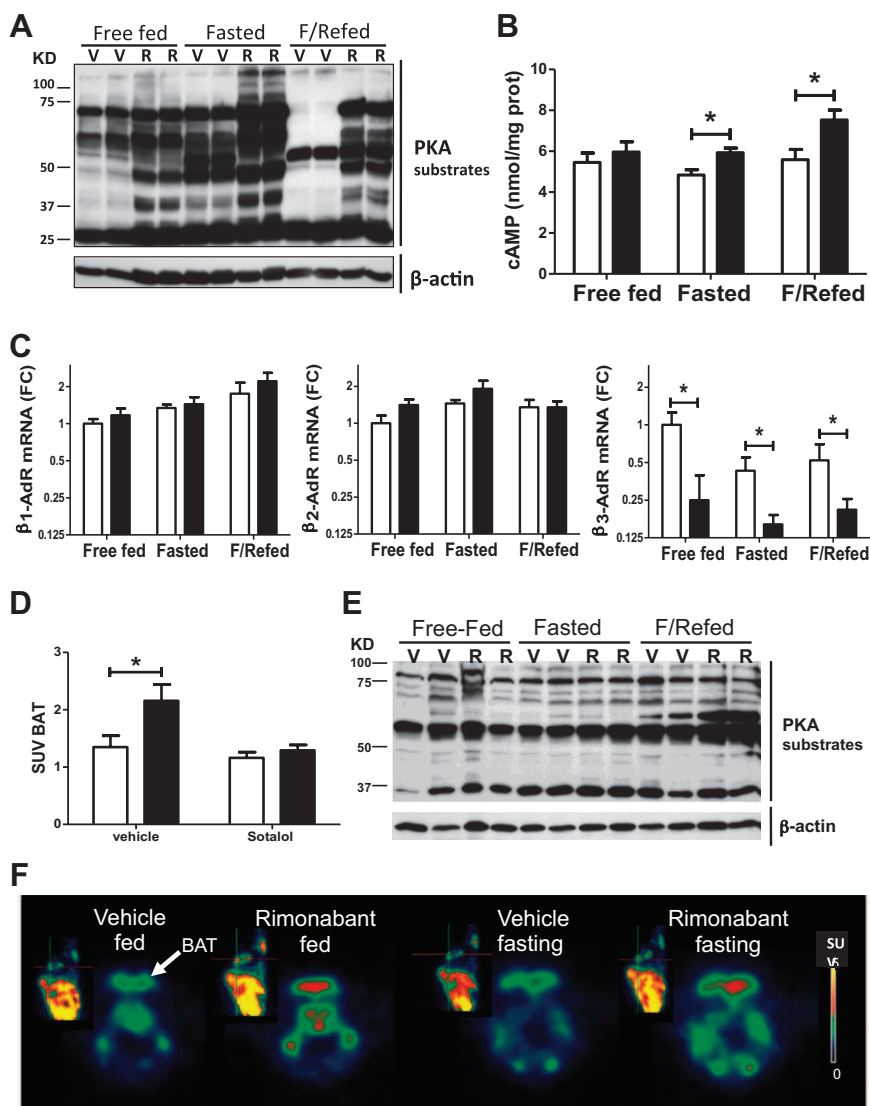


Fig. 53. (A) Representative Western blot for phosphorylated PKA substrates in the duodenum of animals injected with vehicle (V) or rimonabant (10 mg/kg, i.p., R) in different experimental conditions (6–7 per group); values of molecular weight markers (kDa) are shown on the left side of the picture. (B) Effect of rimonabant (10 mg/kg, i.p., black bars) or vehicle (white bars) on cAMP content in the duodenum. (C) Effect of rimonabant (10 mg/kg, i.p., black bars) or vehicle (white bars) on the expression of the three isoforms of β -adrenergic receptors (β -AdR) in the duodenum; note the log scale of fold-change (FC) on the y axis. (D) Quantification [standard uptake value (SUV) max of ^{18}F -FDG uptake] in the BAT of mice injected with vehicle (white bars) or rimonabant (10 mg/kg, i.p., black bars) with or without sotalol pretreatment. (E) Representative Western blot for phosphorylated PKA substrates in the BAT of animals injected with vehicle (V) or rimonabant (10 mg/kg, i.p., R) in different experimental conditions (two animals representative of six to seven per group); values of molecular weight markers (kDa) are shown on the left side of the picture. (F) Representative PET image showing the uptake of ^{11}C -metahydroxyephedrine in the interscapular BAT (arrow) of vehicle- and rimonabant-treated mice in both fed and fasted conditions. Radioactive counts are expressed as standard uptake values; smaller insets on the left represent sagittal view. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

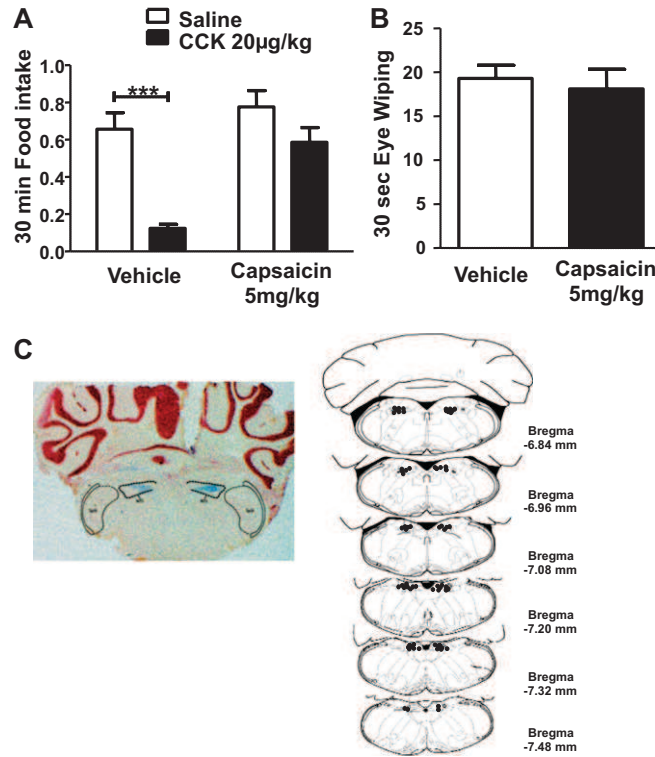


Fig. 54. (A) CCK (20 µg/kg) administration induces a significant reduction in food intake compared with saline-treated mice. This anorectic effect is blunted after treatment with capsaicin (5 mg/kg), indicating a functional desensitization of the afferent fibers in the abdominal cavity. $n = 5$ mice per group. Data are means \pm SEM. Statistical analysis was done using two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest. $***P < 0.001$. (B) Capsaicin (5 mg/kg) bore no effect on eye wiping, indicating that functional desensitization of the afferent fibers did not extend outside the abdominal cavity, as suggested by the presence of other chemosensory reflexes, such as the corneal one. $n = 10$ mice per group. Data are means \pm SEM. Statistical analysis was done using Student's t test. (C) Successful performance of NTS local injections was verified by injection of skyblue toluidine solution through the same guide cannula used for the experiments, followed by brain slicing and neutral red counterstaining. Representative histological analysis (Left) and schematic representations (Right, black dots) of the injection sites in the NTS of WT animals.

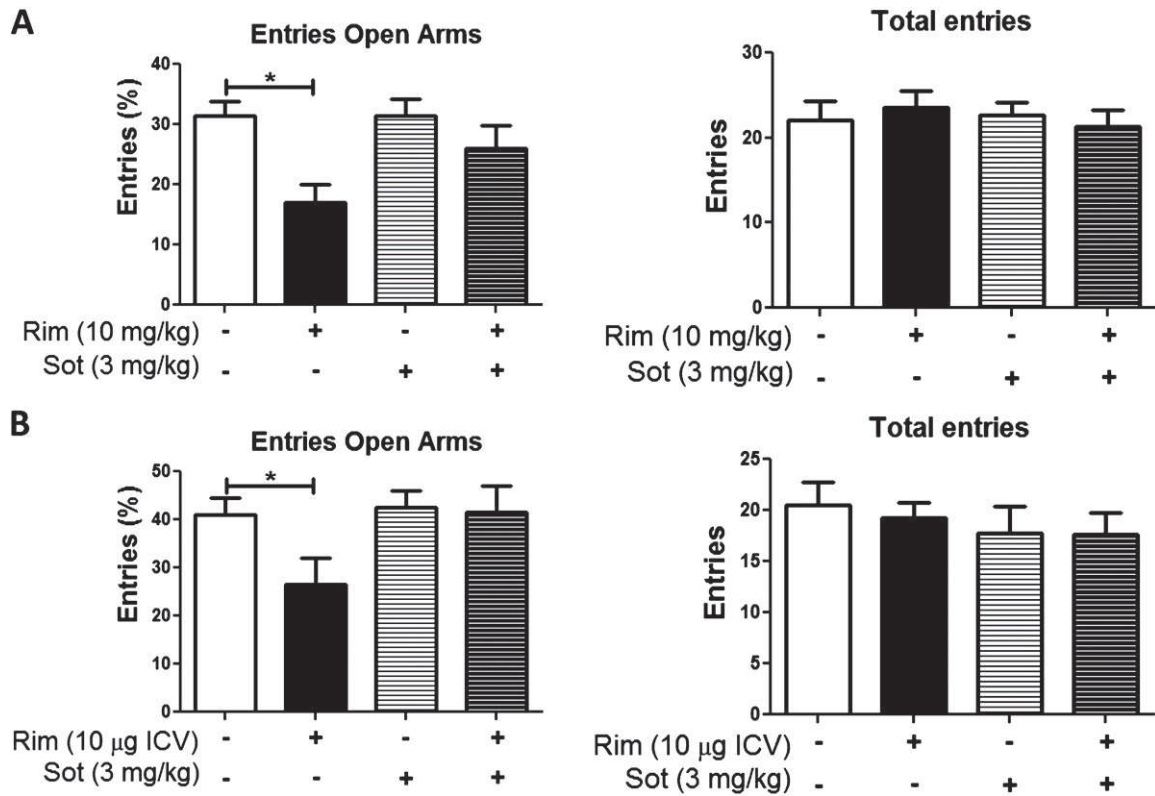


Fig. 55. (A) Effects of sotalol (Sot, 3 mg/kg) and systemic rimonabant (Rim, 10 mg/kg) administration, on anxiety (expressed as entries in the open arms) and locomotor activity (expressed as total entries) in the elevated-plus-maze test. $n = 9-10$ mice per group. Data are means \pm SEM. Statistical analysis was done using one-way ANOVA followed by Tukey's posttest. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$. (B) Effects of sotalol (Sot, 3 mg/kg) and central rimonabant (Rim, 10 μ g, ntracerebroventricularly) administration, on anxiety (expressed as entries in the open arms) and locomotor activity (expressed as total entries) in the elevated-plus-maze test. $n = 8-10$ mice per group. Data are means \pm SEM. Statistical analysis was done using one-way ANOVA followed by Tukey's posttest. $*P < 0.05$.

Table S1. Statistical test used for each figure

Figure	Conditions	<i>n</i>	Analysis (post hoc test reported in figure)	Factor analyzed		<i>P</i> value
Fig. 1A	Rimo vs. veh/Glu-CB1-KO vs. WT	5–6	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Genotype × treatment	$F(1,19) = 0.02$	$P > 0.05$
Fig. 1B	Rimo vs. veh/GABA-CB1-KO vs. WT	6–8	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Genotype × treatment	$F(1,22) = 0.42$	$P > 0.05$
Fig. 1C	Rimo vs. veh/TPH-CB1-KO vs. WT	8–9	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Genotype × treatment	$F(1,30) = 0.03$	$P > 0.05$
Fig. 1D	Rimo vs. veh/Sim1-CB1-KO vs. WT	5–9	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Genotype × treatment	$F(1,26) = 0.28$	$P > 0.05$
Fig. 1E	Rimo vs. veh/SF1-CB1-KO vs. WT	5	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Genotype × treatment	$F(1,12) = 1.03$	$P > 0.05$
Fig. 2A	Rimo vs. veh/propranolol vs. veh	5–7	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Pretreatment × treatment	$F(1,20) = 20.07$	$P < 0.001$
Fig. 2A	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	5–7	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Pretreatment × treatment	$F(1,32) = 59.17$	$P < 0.001$
Fig. 2B	Rimo vs. veh/sotalol (ICV) vs. veh	7–8	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Pretreatment × treatment	$F(1,30) = 0.02$	$P > 0.05$
Fig. 2C	Rimo vs. veh/SR59230A vs. veh	7–8	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Pretreatment × treatment	$F(1,27) = 3.02$	$P < 0.05$
Fig. 2D	Rimo vs. veh/Hexamethonium vs. veh	8	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Pretreatment × treatment	$F(1,28) = 15.34$	$P < 0.01$
Fig. 2E	Rimo vs. veh/2DG vs. veh/sotalol vs. veh	5–8	One-way ANOVA (Tukey)		$F(35) = 28.74$	$P < 0.001$
Fig. 2F	Rimo vs. veh/MA vs. veh/sotalol vs. veh	5–8	One-way ANOVA (Tukey)		$F(35) = 14.34$	$P < 0.001$
Fig. 3B	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	7–12	One-way ANOVA (Tukey)		$F(36) = 3.75$	$P < 0.05$
Fig. 3D	Rimo vs. veh	6–7	One-way ANOVA (Tukey)		$F(35) = 5.29$	$P < 0.05$
Fig. 3E	beta3 - Rimo vs. veh	5–7	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Treatment	$F(1,34) = 14.66$	$P < 0.01$
Fig. 3F	Rimo vs. veh/capsaicin vs. ctr	5–6	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Capsaicin × treatment	$F(1,17) = 4.41$	$P < 0.05$
Fig. 3G	Rimo vs. veh/Mk801 vs. veh	6–8	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Rimo × MK (fourth V)	$F(1,22) = 5.89$	$P < 0.05$
Fig. 3G	Rimo vs. veh (fourth V)	6–8	Unpaired <i>t</i> test		$t = 1.91$ $df = 15$	$P > 0.05$
Fig. 3H	rimo vs. veh/Mk801 vs. veh	4–6	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Rimo × MK (NTS)	$F(1,17) = 6.04$	$P < 0.05$
Fig. 3H	Rimo vs. veh (NTS)	4–6	Unpaired <i>t</i> test		$t = 0.67$ $df = 6$	$P > 0.05$
Fig. 4A	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	16–18	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Pretreatment × treatment	$F(1,62) = 4.58$	$P < 0.05$
Fig. 4B	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	9–10	One-way ANOVA (Tukey)		$F(34) = 4.35$	$P < 0.05$
Fig. 4C	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	9–10	One-way ANOVA (Tukey)		$F(35) = 3.19$	$P < 0.05$
Fig. S1A	Rimo vs. veh/CB1-KO vs. WT	4–6	Repeated-measures ANOVA (Bonferroni)	Genotype × treatment	$F(1,34) = 40.16$	$P < 0.001$
Fig. S1B	Rimo vs. veh/CamK-CB1-KO vs. WT	4–6	Repeated-measures ANOVA (Bonferroni)	Genotype × treatment	$F(1,32) = 11.22$	$P < 0.001$
Fig. S2A	Veh vs. propranolol	5	One-way ANOVA (Tukey)		$F(24) = 5.25$	$P < 0.05$
Fig. S2C	Rimo vs. veh	6–7	One-way ANOVA (Tukey)		$F(32) = 3.03$	$P < 0.05$
Fig. S3A	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	7–12	One-way ANOVA (Tukey)		$F(32) = 4.94$	$P < 0.01$
Fig. S4A	CCK vs. veh/capsaicin vs. ctr	5–6	Two-way ANOVA (Bonferroni)	Capsaicin × treatment	$F(1,16) = 5.26$	$P < 0.05$
Fig. S4B	Capsaicin vs. ctr	10–11	Unpaired <i>t</i> test		$t = 0.4435$ $df = 18$	$P > 0.05$
Fig. S5A	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	9–10	One-way ANOVA (Tukey)		$F(34) = 5.68$	$P < 0.01$
Fig. S5B	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	9–10	One-way ANOVA (Tukey)		$F(34) = 0.21$	$P > 0.05$
Fig. S5C	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	9–10	One-way ANOVA (Tukey)		$F(35) = 3.29$	$P < 0.05$
Fig. S5D	Rimo vs. veh/sotalol vs. veh	9–10	One-way ANOVA (Tukey)		$F(35) = 0.37$	$P > 0.05$