

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Laboratoire des neurosciences cognitives et adaptatives, UMR7364

THÈSE présentée par :
Florian SCHOUKROUN

soutenue le : **11 décembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

**Rôle du noyau tegmental rostromédian dans la
prise alimentaire**

THÈSE dirigée par :
Mme Katia Befort

Chargée de recherche, CNRS, Université de Strasbourg

EXAMINATEUR :
Mr Michel Barrot

Directeur de recherche, CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Mme Nathalie Thiriet
Mr Giuseppe Gangarossa

Professeure, Université de Poitiers
Professeur, Université Paris Cité

INVITÉS :

Mme Dominique Massotte
Mr Romain Bourdy
Mr Lucas Lecourtier

Directrice de recherche, CNRS, Université de Strasbourg
Ingénieur de recherche, CNRS, Université de Strasbourg
Chargé de recherche, CNRS, Université de Strasbourg

PhD Portfolio

Éducation

Oct. 2020-Dec. 2023

Doctorat de neurosciences. Laboratoire des Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA). Équipe 3 « Abus de drogues et neuroadaptations ». Université de Strasbourg, France.

Sept. 2018-Juin. 2020

Master de Neurosciences Cellulaires Intégrées. Université de Strasbourg

Sept. 2016-Juin. 2018

Licence de biologie, parcours Physiologie Animale et Neurosciences (PAN). Université de Montpellier, France

Expériences

Oct. 2020-Déc. 2023

Thèse de neurosciences. Laboratoire des Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA). Équipe 3 « Abus de drogues et neuroadaptations » Université de Strasbourg, France
« Rôle du noyau tegmental rostromédian dans la prise alimentaire »
Direction : Katia BEFORT
Encadrement : Romain BOURDY

Jan. 2020-Juin 2020

Stage de Master 2. Laboratoire des Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA). Équipe 3 « Abus de drogues et neuroadaptations » Université de Strasbourg, France
« Rôle des projections de la queue de l'aire tegmentale ventrale dans la prise alimentaire hédonique »
Encadrement : Romain BOURDY

Juin 2018

Stage de fin de licence. Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier (CRBM). Équipe « Signalisation & Dynamique du cytosquelette ». *« Neuropathologies liées à Trio et différenciation neuronale »*
Direction : Suzanne SCHMIDT
Encadrement : Christine FAGOTTO-KAUFMANN

Présentations grand public

Juin 2022

Journée Jeunes Chercheurs de la Faculté de Psychologie de Strasbourg
« *Modifications de l'expression du système endocannabinoïde au sein du circuit de la récompense dans l'obésité et l'hyperphagie boulimique* »

Juil. 2022

Journée Jeune Chercheur de la Faculté de Psychologie de Strasbourg. « *Rôle du RMTg dans la prise alimentaire hédonique* »

Oct. 2021 & 2022

Participation à la fête de la science

Posters

Juil. 2022

FENS 2022, Paris, France.
“*Differential role of rostromedial tegmental nucleus outputs in food intake during an obesogenic diet*”
Florian SCHOUKROUN, Katia BEFORT, Romain BOURDY

Avr. 2021

Neurofrance 2021, Strasbourg, France.
“*The RMTg in Hedonic Feeding : a role for sucrose versus fat preference ?*” Romain BOURDY, **Florian SCHOUKROUN**, Katia BEFORT

Avr. 2021

Doctoral School Days, 2021, Strasbourg, France
“*Using Viral Tools to Study the Connectivity of the Tail of the Ventral Tegmental Area*” **Florian SCHOUKROUN**, Katia BEFORT, Romain BOURDY

Formations

Mai 2023

Formation «Nouveau Chapitre de la Thèse » (NCT)

Mai 2022

Formation à la chirurgie sur rongeurs dans le cadre de l'expérimentation animale

Mai 2022

Initiation au logiciel CellProfiler

Jan. 2021

Formation concepteur de projets scientifiques utilisant des animaux

Déc. 2020

MOOC « Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche »

Enseignements

Oct. 2020-Oct. 2023

Moniteur de TD, Faculté de Psychologie de Strasbourg
Fondements en Biologie & Neurosciences, L1 de Psychologie

- TP Mitose & Méiose
- TDs de génétique

Neurobiologie du comportement, L3 de Psychologie

- TD sur l'aspect addictif de la nourriture

Encadrements d'étudiants

Juin 2023-Juil. 2023

Jeanne TYRODE, M1 « Neurosciences Cellulaires Intégrées »

« Étude des conséquences d'une consommation excessive de nourriture palatable »

Nov 2022-Dec. 2022

Maëlwenn LEROUX, Eléonor GUICHARD, M1 « Neurosciences Cellulaires Intégrées / Neurosciences Cognitives ». Stage technique d'IDSN (Introduction à la démarche scientifique en neurosciences). Présentation/Explication de la qPCR.

Juin 2022

Lise SCHMIDT, BTS Biotechnologies, Lycée Jean Rostand, Strasbourg. Co-Encadrement avec Anne-Sophie AUBRY

« Étude des neuroadaptations induites par un comportement d'hyperphagie boulimique dans un modèle murin : approches par RT-qPCR et immunofluorescence »

Avr. 2021

Guillermo SUAREZ, Master 1 « Joint Master in Neurosciences » Université de Strasbourg

“Experimental setting to target FoxP1 expressing neurons in the tVTA/RMTg by immunohistochemistry”

Activité associative

Oct. 2018-Oct.2023

Membre adhérent de l'association Doctoneuro

- Participation aux entraînements du concours de l'école doctorale
- Participation à la rentrée des étudiants de master de neurosciences

Financements

Juin 2020

Allocation ministérielle de recherche de trois ans (Financement de thèse)

*Je refuse toute abstinence plutôt que de m'avouer vaincu
J'invoque ici l'immanence, la transcendance en temps voulu
Ignorants noyés sous la gnose, prenez-le ou non comme une fronde
Mais je ne ferais pas de vos névroses, un modèle pour mon monde*

Matmatah, "La cerise", 2007

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les Drs Nathalie Thiriet, Giuseppe Gangarossa, Michel Barrot d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Un grand merci aux Drs Dominique Massotte et Lucas Lecourtiers (Membres invités) d'avoir voulu participer à mon jury de thèse. Je tiens à les remercier pour leurs échanges et leurs bienveillances lors de mes Comités de Suivi de Thèse.

Je remercie également Jean Christophe Cassel de m'avoir accueilli dans son laboratoire, non seulement pendant ces trois années de thèse, mais aussi pendant mon stage de M2.

Je tiens particulièrement à remercier la meilleure équipe du LNCA, l'équipe 3 « Abus de Drogues et Neuroadaptations ». Un énorme merci à Katia Befort, sans qui rien de cela n'aurait été possible, merci de m'avoir accepté dans l'équipe, de ton soutien depuis le Master, malgré le covid, merci de ton écoute, de ta compréhension, de ta disponibilité et de tout le travail que tu fais pour nous. Je ne crois pas que j'aurais pu avoir une meilleure directrice de thèse, c'est avec un peu de tristesse que je quitte cette équipe </3.

À Romain, je n'ai pas les mots pour te remercier. Tout ce que j'ai appris, c'est grâce à toi, j'ai pris exemple sur toi, ta dévotion, ton acharnement, et ton amour pour la science. Tu as fait de moi le scientifique (si j'ose m'appeler ainsi), que je suis aujourd'hui. Tu es l'une des principales raisons pour lesquelles je garderai toujours un bon souvenir de cette thèse. Je me plains beaucoup de la thèse et du travail, mais en réalité j'ai vraiment aimé travailler avec toi. Je suis attristé que sur le fait que tu ne sois pas considéré comme co-directeur et seulement comme encadrant, les prochains étudiants après moi auront une chance folle de t'avoir. Merci encore.

Merci à Anne Sophie & Cécile qui vont énormément me manquer. Anne Sophie qui a dû me supporter moi et mon humour cynique et sombre pendant trois ans, Anne Sophie grâce à qui j'ai découvert les cannelés, Anne Sophie qui dévoue une passion sans faille aux Butternuts. J'espère qu'il y en aura plein à Paris et que tu t'éclateras dans cette nouvelle aventure !. Cécile avec qui j'ai traversé les galères des PCRs, de la coloration Red-Oil, et l'écriture d'une revue. Bonne chance pour cette dernière année ! J'espère que d'ici peu de temps, dans le monde scientifique, quand les gens verront ton nom, ils ne penseront pas immédiatement à ton sosie neuroscientifique Britny, mais à la brillante Cécile Hildenbrand.

Merci à Henry, tu fais partie de la nouvelle génération, la thèse c'est difficile, il faut s'accrocher, mais en vrai on s'éclate !

Merci aux membres passés du laboratoire, le Dr Gaëlle Awad & Caroline Correia. Caroline qui m'a sorti un jour dans la cafet qu'écrire une thèse c'est comme s'étaler « du beurre sur la

peau », en vrai c'est un peu moins agréable. Gaëlle qui me faisait peur par ses coups d'éclat soudains dans le labo quand elle écoutait ses podcasts en pleine PCR et qui écoutait du Mylène Farmer à fond. Merci à Pascal Romieu que j'ai eu de la chance d'avoir comme professeur pendant mon master et comme collègue, la liste est pas très longue, mais tu es quand même mon marseillais préféré (et ça vient de quelqu'un qui n'est vraiment pas fan du sud de la France 😊).

Je tiens à remercier les meilleures membres du meilleur bureau du LNCA : Brigitte Cosquer, Karin sans « E » Herbeaux, et Aminé Isik. Brigitte, je ne sais pas comment va faire le laboratoire quand tu partiras à la retraite, une partie de moi est convaincue que les locaux vont s'effondrer ce jour fatidique. Karin, je n'ai jamais rencontré une personne d'aussi tenace et d'aussi courageuse que toi. J'espère que tu ne perdras jamais cette force qui t'anime, c'est beaucoup plus difficile d'être optimiste comme toi que d'être pessimiste comme je le suis. N'abandonne jamais face à Voldemort :p.

Aminé, pour moi tu seras toujours « L'impératrice des souris », je te souhaite une merveilleuse carrière et je ne me fais pas de soucis pour toi, tu es attentionnée, brillante et dévouée, peut-être même un peu trop, prends des congés de temps en temps :p. Grâce à vous trois, les questions qu'on m'a posé le plus durant ces 3 dernières années ont été « Elle est ou Brigitte ? » « Tu n'as pas vu Aminé ? » « Karin est là aujourd'hui ? » mais j'accepte avec bon cœur d'avoir été votre secrétaire personnel.

Je tiens à remercier mes compagnons de galère de doctorat du LNCA. Un grand merci à Laurine Boch, je ne serai pas surpris si dans quelques années j'apprends que tu es critique culinaire et que tu fais le tour des restos de France...Ou alors que tu as fondé une secte basée sur l'aquacombat avec Elodie.

Merci à Matthieu Aguilera, mon compère d'humour noir avec qui j'ai passé ma 1re année de thèse à faire des blagues plus que douteuses, sur un monsieur moustachu pendant nos cours d'Allemand aux frais de l'école doctorale.

Merci à Iris Grgurina (il manque une lettre non ?) grâce à qui jusqu'à la fin de ma vie je pourrais raconter l'histoire de la folle qui nous a emmené boire une limonade à 7 euros dans un café pas ouf à Paris. Sache que rien que pour toi je serais prêt à retourner au « Café de Flore » et prendre un milk-shake à 15 euros. Merci à Baptiste Brulé qui a dû me supporter dès la première année de master quand on s'est retrouvé en groupe d'IDSN et avec qui, on a eu l'idée, mais tellement intelligente de se raser la tête quand on a eu la bourse de thèse. Tu m'impressionnes par ton savoir-faire et ton intelligence, et non ironiquement j'ai peur de ton avis quand tu vas assister à ma soutenance parce que je sais que la tienne sera 1000 fois supérieure à tout ce qu'on aura déjà vu !

Merci à Coline Portet, la meilleure sudiste de l'Alsace que j'ai pu voir évoluer du M1 jusqu'à la fin de sa thèse. Quoi que tu fasses plus tard, je n'ai aucun doute sur ton succès.

Merci à Elodie Panzer avec qui j'ai passé pas mal d'heures à me plaindre des étudiants de L1 de psycho, est-ce qu'un jour on retrouvera ces lames de TP ?

Merci à Adrien Vérité qui en fait est quelqu'un de sympa, mais qui le cache, on ne peut pas être méchant et faire de super bons gâteaux, ça ne marche pas !. Par pitié, quand tu auras ta thèse, ouvre un cabinet de voyance « Venez voir l'avenir chez le Docteur Vérité ».

Merci à Vincent Loizeau, le distributeur de Kinder chocobons et peut être futur candidat à la star académie.

Merci à Anaëlle et Noémie, Anaëlle à qui je prends un malin plaisir à faire rire pendant qu'elle mange, Anaëlle dont les pires ennemis sont les vélos, pas très judicieux quand on vit à Strasbourg :p. Noémie qui est ma collègue de CDI préférée #Organisateur efficace.

Merci à Marido de nous avoir fait mourir de rire juste en nous racontant sa vie et ses aléas, à quand le livre « les malheurs de Marido » ?

Merci à Anouk Charlot qui nous a très très gentiment aidé pour les colorations au Red-Oil et la quantification parce qu'on n'arrivait pas à le faire proprement dans notre labo.

Je remercie sincèrement Jean-Jacques Hincker, mon mentor pendant la formation NCT, grâce à sa formation j'ai pu me rappeler pourquoi j'avais décidé de faire une thèse.

Un grand merci à mes compagnons de promotions de master, Etienne, Volodya, Robin, Alexander, Fred, sans vous je n'y serais jamais arrivé, heureusement qu'on était soudé et présent.

Merci à Marie, une future brillante scientifique, j'espère que tu t'éclates en Allemagne, merci à Amira, ma pote de cinoche préférée.

Merci à Bréno, quem é uma pessoa com quem eu posso falar sobre tudo, muito obrigado !

Merci à ma famille de m'avoir soutenu pendant toutes ces années d'études et de m'avoir toujours encouragé. Bienvenue à la nouvelle membre du clan Schoukroun, la petite Edène qui je suis sûr, cache en elle une future scientifique.

SOMMAIRE

Abréviations	1
Table des illustrations	3
INTRODUCTION	6
Chapitre 1 : Les prises alimentaires homéostatiques et hédoniques.....	7
I : La prise alimentaire homéostatique	7
I-A : Définition de la prise alimentaire homéostatique	7
I-B : Régulation de la prise alimentaire homéostatique	8
II : La prise alimentaire hédonique	13
II-A : Définition	13
II-B: La régulation de la prise alimentaire hédonique	14
III : Pathologies liées à l'alimentation	23
III-A : L'obésité	23
III-B : Les troubles du comportement alimentaires (TCA)	31
Chapitre 2 : Le noyau tegmental rostromédian (RMTg).....	39
I : Historique de la découverte du RMTg	39
I-A : Une structure découverte simultanément par deux équipes	39
I-B : Premières observations du RMTg	41
I-C : Caractéristiques cellulaires du RMTg	43
II : Connectivité du RMTg	44
II-A : Afférences du RMTg	44
II-B Efférences du RMTg	46
III : Implications fonctionnelles du RMTg	48
III-A : Réponse du RMTg aux drogues d'abus	48
III-B : Rôle du RMTg dans la motricité	53

III-C : Rôle du RMTg dans le phénotype dépressif et le stress	54
III-D : Rôle du RMTg dans la nociception	54
III-E : Rôle du RMTg dans l'erreur de prédiction et l'aversion	55
III-F : Rôle du RMTg dans la régulation du cycle veille sommeil	57
IV : Rôle potentiel du RMTg dans la régulation de la prise alimentaire	58
IV-A : Indices suggérant un rôle du RMTg dans la prise alimentaire	58
IV-B : Résultats préliminaires : Une lésion excitotoxique du RMTg affecte la consommation de nourriture palatable	59
Chapitre 3 : Le système endocannabinoïde	60
I : Éléments du système endocannabinoïde	60
I-A : Découverte du système endocannabinoïde	60
I-B : Les cannabinoïdes exogènes	66
II : Fonctions générales du système endocannabinoïde	69
II-A Rôle du système endocannabinoïde dans l'anxiété et la dépression	69
II-B : Rôle du système endocannabinoïde dans la mémoire	70
II-C : Rôle du système endocannabinoïde dans le sommeil	71
II-D : Rôle du système endocannabinoïde dans la récompense	71

OBJECTIFS & HYPOTHÈSES _____ **85**

MATÉRIELS & MÉTHODES _____ **89**

I- Les animaux	90
I-A : Souche de rat	90
I-B : Conditions d'hébergement	90
I-C : Réglementation relative à l'expérimentation animale	91
II : Chirurgie stéréotaxique	91
II-A : Procédure de chirurgie stéréotaxique	91
II-B : Vecteurs viraux	92
II-C : Procédure d'injection des vecteurs viraux	94

II-D : Procédure d'injection du traceur antérograde BDA _____	95
III : Protocoles de prise alimentaire. _____	95
III-A : Les aliments utilisés _____	95
III-B : Régime obésogène «free choice high fat high sugar (fCHFHS) _____	96
III-C : Modèle d'hyperphagie boulimique (HB) _____	98
III-D : Protocole de restriction alimentaire _____	100
IV : Tests comportementaux _____	101
IV-A : Test du labyrinthe en croix surélevé _____	102
IV-B : Mesure de l'activité locomotrice des animaux _____	103
IV-C : Protocole du « Food Choice Arena » _____	104
V : Prélèvements des tissus _____	107
V-A : Mise à mort des animaux et fixation des tissus _____	107
V-B : Mise à mort des animaux et prélèvements de tissus frais _____	107
VI : Analyses histologiques _____	108
VI-A : Immunohistochimie et traçage antérograde _____	108
VI-B : Analyses histologiques du tissu hépatique _____	113
VI-C : Acquisition et analyse d'images _____	116
VII : Analyse de l'expression du système endocannabinoïde _____	117
VII-A : Analyse de l'expression du système endocannabinoïde dans le RMTg et les structures associé _____	117
VIII : Statistiques _____	119
VIII-A : Logiciels utilisés _____	119
VIII-B : Vérifications de la normalité et de l'égalité des variances _____	120
VIII-C : Tests statistiques utilisés _____	120
VIII-D : Analyse en clusters et en composantes principales (PCA) _____	121

RÉSULTATS 124

Partie 1 : Caractérisation du rôle de la voie RMTg- VTA et RMTg-LH dans la prise alimentaire hédonique.....	125
---	-----

I : Manuscrit soumis Article 1 : « The rostromedial tegmental nucleus gates fat overconsumption through ventral tegmental area output.....	126
II : Analyses supplémentaires _____	167
II-A : Analyse de l'activation neuronale du RMTg après une restriction alimentaire : suivi de l'expression de c-Fos _____	167
II-B : La voie RMTg-VTA dans la prise alimentaire _____	169
II-C : La voie RMTg-LH dans la prise alimentaire _____	179

Partie 2 : Conséquences de l'obésité et de l'hyperphagie boulimique sur l'expression du système endocannabinoïde.....	184
---	-----

I : Manuscrit article: Binge-eating and obesity induce distinct endocannabinoid system transcriptional regulations in reward-related brain regions	185
II : Analyses supplémentaires _____	209
II-A : La prise alimentaire dans les modèles d'obésité et d'hyperphagie boulimique _____	209
II-C : Les conséquences métaboliques de l'obésité et de l'hyperphagie boulimique _____	216
III : Analyse par clusters _____	223

DISCUSSION GÉNÉRALE 227

I-Synthèse des résultats obtenus _____	228
I-A : Article 1 : The rostromedial tegmental nucleus gates fat overconsumption through ventral tegmental area output _____	228
I-B : Article 2 : Binge-eating and obesity induces different transcriptional regulations of the endocannabinoid system in reward-related brain regions _____	228
II : La voie RMTg-VTA contrôle la consommation de gras _____	229
II-A : Considérations techniques relatives à la lésion de la voie RMTg-VTA _____	229
II-B : Lésion de la voie RMTg-VTA : Vers une hyperdopaminergie ? _____	230
II-C : Rôle de l'ECS dans la voie RMTg-VTA _____	234
II-D : Perspectives sur l'étude de la voie RMTg-VTA _____	237

III : La voie RMTg-LH dans la prise alimentaire _____	240
III-A : Considérations techniques relatives à la lésion RMTg-LH _____	240
III-B : Rôle de cette voie dans la dévaluation de nourriture standard ? _____	240
III-C : Perspectives sur l'étude de la voie RMTg-LH _____	243
IV-Vers une addiction à la nourriture ? _____	244
IV-A : Le concept d'addiction à la nourriture chez l'Homme _____	244
IV-B : Modèles précliniques d'addiction à la nourriture _____	246
V : Conclusion sur la place du RMTg dans le circuit de la prise alimentaire _____	252

REFERENCES _____ **255**

ANNEXE : Nouveau chapitre de la thèse (NCT) _____ **283**

Abréviations

2-AG : 2-arachydonoyglycérol	DAGLα : Lipase diacylglycérol alpha
5HIA : Acide 5 hydroxy indol acétique	DAMGO : [D-Ala ² , NMe-Phe ⁴ , Gly-ol ⁵]-enkephalin; DAGO
5HT1A : Récepteur de la sérotonine 1A	DBC : Décussation du brachium conjunctivum
6-OHDA : 6-hydroxydopamine	DBS : Stimulation cérébrale profonde
AAV : Virus adénoassocié	DREADD : Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs
ABA : Anorexie basée sur l'activité	DR : Noyau du raphé dorsal
ADN : Acide désoxyribonucléique	DS : Striatum dorsal
AEA : Anandamide	DSE : Depolarization-induced suppression of Excitation
AgRP : Peptide agouti	DSI : Depolarization-induced suppression of inhibition
AMPA : Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique	DSM : Manuel de diagnostic et statistique des troubles mentaux
AMY : Amygdale	DV : Dorso-ventral
AN : Anorexie nerveuse	ECS : Système endocannabinoïde
ANOVA : Analyse de la variance	EF1α : Facteur d'élongation 1 alpha
AP : Antéro-postérieur	eGFP : Protéine de fluorescence verte améliorée
ARC : Noyau arqué	EPM : Labyrinthe en croix surélevé
ARN : Acide ribonucléique	FAAH : Hydrolase des amides d'acides gras
BDA : Amine dextrane biotinylé	fcHFHS : Free choice high fat high sugar
BF : Cerveau antérieur basal	Fos : Finkel Biskis Jenkin Osteosarcoma
bHFHS : Binge high fat high sugar	FoxP1 : Forkhead box P1
BLA : Amygale basolatérale	GABA : Acide γ -aminobutyrique
BN : Boulimie nerveuse	GAD : Glutamate décarboxylase
BNST : Noyau du lit de la strie terminale	GHSR : Récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance
CA : Accès continu	GLP-1-R : Récepteur du glucagon-like-peptide 1
CB1 : Récepteur cannabinoïde 1	GLUT : Glutamatergique
CB2 : Récepteur cannabinoïde 2	GPR : Récepteur couple aux protéines G
CBD : Cannabidiol	HB : Hyperphagie boulimique
CeA : Noyau central de l'amygdale	Hippocampe : HPC
CNO : N-oxyde de clozapine	hSyn : Synapsine humaine
CoA : Coenzyme-A	HYP : Hypothalamus
Cre : Cause la recombinaison	I.p : Intrapéritonéale
CTB : Sous unité B de la toxine cholérique	IA : Accès intermittent
D1 : Récepteur dopaminergique 1	ICV : Intracérébroventriculaire
D2 : Récepteur dopaminergique 2	IGF1R : Insulin-Like Growth Factor Receptor 1
DA : Dopaminergique	IHC : Immunohistochimie
DAB : 3,3'-Diaminobenzidine	

PCA : Analyse en composante principale
PCR : Réaction de polymérase en chaîne
PFA : Paraformaldéhyde
PFC : Cortex préfrontal
PHA-L : Phaseolus vulgaris leucoagglutinin
PL : Cortex prélimbique
PNOC : Pronociceptine
POMC : Proopiomélanocortine
PPTg : Noyau pédonculo-pontin
PVH : Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
RDS : Reward deficiency syndrom.
Re : Ré-accès
REM : Phase de sommeil paradoxal
RMTg : Noyau tegmental rostromédian
RN : Noyau du Raphe
Rplp0 : Ribosomal protein lateral stalk subunit P0
RRF : Champs rétro rubral
SEM : Erreur type de la moyenne
SERT : Transporteur de la Sérotonine
SNC : Substance noire compacte
SNP : Polymorphisme nucléotidique
SOM : Somatostatine
Sox14 : SRY-Box Transcription Factor 14
TCA : Trouble du comportement alimentaire
TEP : Tomographie par émission de positon
TEVp : Protéase du virus de la gravure de tabac
TH : Tyrosine hydroxylase
THC : Δ-9-tétrahydrocannabinol
TRPV1 : Récepteur "Transient potential vanilloid 1"
tVTA : Queue de l'aire tegmentale ventrale
vGAT : Transporteur vésiculaire du glutamate
Vglut2 : Transporteur vésiculaire du glutamate 2
VmPFC : Cortex préfrontal ventre médian
vSUB : Subiculum ventral
VTA : Aire tegmentale ventrale
WAT : Tissu adipeux blanc
WD : Sevrage
ZI : Zonula Incerta
IHF : Immunofluorescence
IMC : Indice de masse corporelle
IP : Noyau interpedonculaire
IRES : Internal ribosome entry site
Ki : Constante d'inhibition
K : Knock-Out
LC : Locus coeruleus
LDTg : Noyau tegmental latérodorsal
LDX : Lisdexamphétamine
LepRb : Récepteur à la leptine
LH : Hypothalamus latéral
LHb : Habénula latérale
LM : Lemnisque médian
MC4R : Récepteur de la mélanocortine 4
MCH : Hormone de mélanocortine
MGL : Monoacylglycérol lipase
ML : Médio-latéral
MLF : Fascicule du Lemnisque médian
mPFC : Cortex préfrontal médian
MRF : Formation réticulée médiale
MSH : Hormone mélanotrope
MWF : Lundi-mercredi-vendredi
NA : Sans accès
NAC : Noyau accumbens
NAE : N-acyléthanolamine
NAFLD : Stéatose hépatique non alcoolique
NAPE : N-acylphosphatidyléthanolamine
NeuN : Neuronal Nuclei
NREM : Phase de sommeil lent
Ns : Non significatif
NTS : Noyau du tractus solitaire
OFC : Cortex orbitofrontal
OMS : Organisation mondiale de la santé
OrxA/B : Orexine A / Orexine B
Ox/Orx : Neurone à orexine
PAG : Substance grise périaqueducale
PBN : Noyau parabrachial

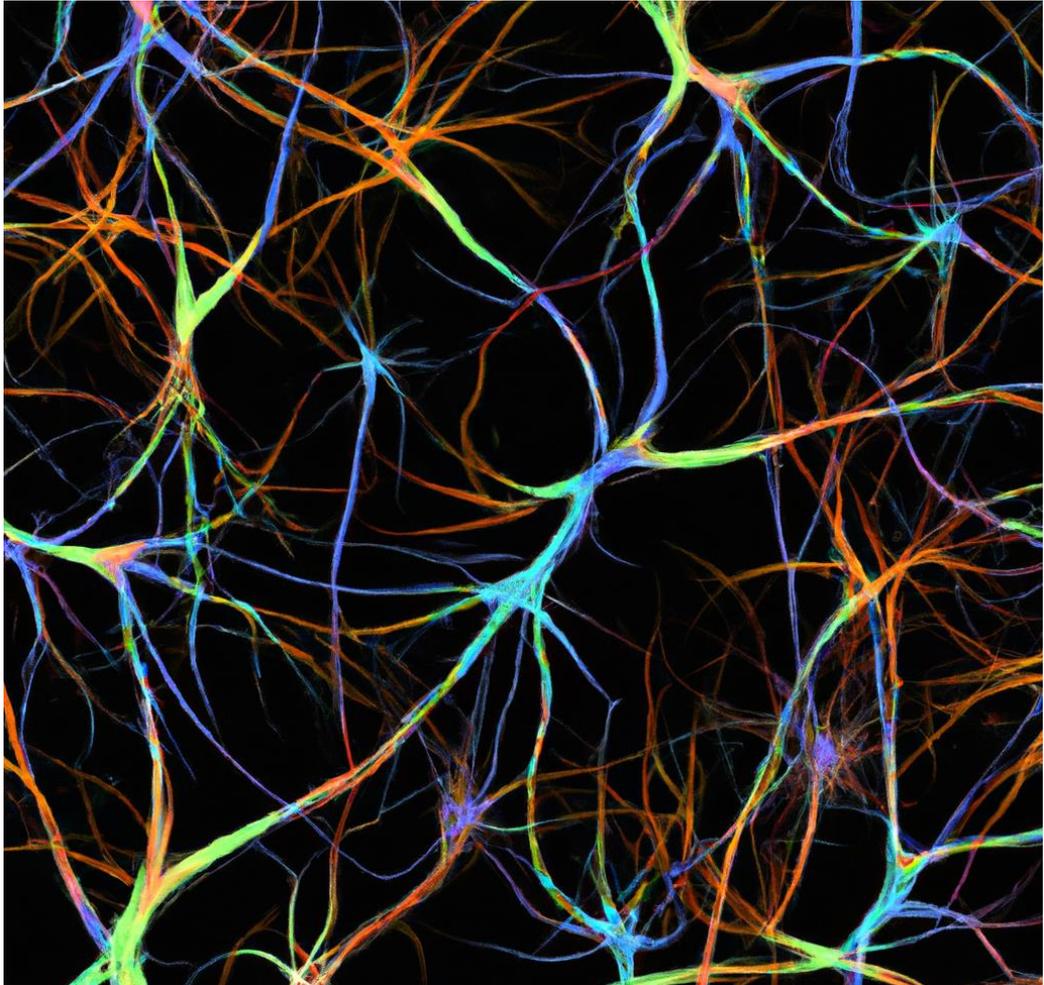
Table des illustrations

Figure 1 : Connectivité des neurones du LH et rôle dans la prise alimentaire	12
Figure 2 : La voie mésocorticolimbique ou « circuit de la récompense »	19
Figure 3 : Circuits nouvellement identifiés dans la régulation de la prise alimentaire hédonique	22
Figure 4 : Une exposition à un régime riche en gras conduit à l'obésité chez le rat	26
Figure 5 : Circuits nouvellement identifiés dans les TCAs	38
Figure 6 : Localisation neuroanatomique du RMTg chez le rat	40
Figure 7 : Localisation neuroanatomique du RMTg chez la souris et le singe	41
Figure 8: Première image du RMTg en 1979	43
Figure 9 : Afférences du RMTg et leurs fonctions	46
Figure 10 : Efférences du RMTg et leurs fonctions	48
Figure 11 : Rôle du RMTg dans la réponse aux drogues	52
Figure 12 : Localisation et distribution des récepteurs CB1 et CB2 dans le corps humain.....	61
Figure 13 : Localisation et densité de l'expression du récepteur CB1 sur une coupe sagittale de cerveau de rongeur	63
Figure 14 : Localisation et densité de l'expression du récepteur CB2 sur une coupe sagittale de rongeur	64
Figure 15 : Valeurs de KI de certains ligands des récepteurs CB1/CB2.....	69
Figure 16 : Signalisation du système endocannabinoïde dans le LH et la VTA	75
Figure 17 : Neuroadaptations centrales du système endocannabinoïde observées dans des modèles précliniques d'obésité.....	79
Figure 18 : Neuroadaptations centrales du système endocannabinoïde observées dans les modèles précliniques d'hyperphagie boulimique.....	84
Figure 19 : Photo d'un rat mâle de la souche wistar	90
Figure 20 : Caractérisation de la voie RMTg-VTA et RMTg-LH.....	93
Figure 21 : Schématisation de la lésion de la voie RMTg-VTA ou RMTg-LH.....	94
Figure 22 : Illustration du régime obésogène fCHFHS « free choice high fat high sugar	97
Figure 23 : Frise chronologique de l'évaluation comportementale de la lésion RMTg-VTA et RMTg-LH	98
Figure 24 : Frise chronologique du protocole d'HB	100
Figure 25 : Labyrinthe en croix surélevé.....	103
Figure 26 : Système d'actographie utilisé dans la mesure de l'activité locomotrice des animaux.	104

Figure 27 : Arène du protocole de « Food choice Arena.....	106
Figure 28 : Illustration du principe de la séparation en cluster de la méthode des coudes.....	121
Figure 29 : Illustration du principe de la clusterisation en K-moyens & de l'analyse en composante principale.....	122
Figure 30 : Illustration du principe d'analyse en composante principale	123
Figure 31 : Une restriction alimentaire provoque l'expression de c-Fos dans le RMTg.....	169
Figure 32 : Une lésion spécifique de la voie RMTg-VTA ou de la voie RMTg-LH n'affecte pas la prise alimentaire totale pendant la phase diurne.....	171
Figure 33 : Une lésion spécifique de la voie RMTg-VTA ou de la voie RMTg-LH n'affecte pas la consommation cumulée de nourriture standard et palatable pendant la phase diurne	172
Figure 34 : Une lésion spécifique de la voie RMTg-LH, mais pas de la voie RMTg-VTA, réduit la prise alimentaire totale pendant la phase nocturne.	173
Figure 35 : Une lésion spécifique de la voie RMTg-VTA, mais pas de la voie RMTg-LH, conduit à une consommation de gras et de nourriture standard plus importante	174
Figure 36 : La lésion de la voie RMTg-VTA ou de la voie RMTg-LH affecte la consommation de gras et de nourriture standard pendant la période de ré-accès	176
Figure 37 : Une analyse des K-moyens permet de séparer les animaux lésés pour la voie RMTg-VTA des rats contrôle	178
Figure 38: Une analyse des K-moyens ne permet pas de séparer les RMTg-LH du groupe lésion de ceux du groupe contrôle	183
Figure 39 : Un accès intermittent au régime fCHFHS conduit à un phénotype d'hyperphagie boulimique reproductible.....	211
Figure 40 : La consommation de nourriture palatable a lieu préférentiellement pendant la 1ère heure d'accès intermittent.....	212
Figure 41 : Un accès intermittent au régime fCHFHS conduit à une consommation excessive de gras	213
Figure 42: Un accès intermittent ou continu au régime fCHFHS n'affecte pas le comportement d'approche à la nourriture palatable	216
Figure 43: Un accès intermittent ou continu au régime fCHFHS modifie la prise de poids et la masse de tissu adipeux blanc.	218
Figure 44 : Une analyse des K-moyens montre qu'une forte consommation de saccharose affecte le poids du tissu hépatique et favorise le développement d'une stéatose hépatique non alcoolique	222
Figure 45 : Une analyse des K-moyens ne montre pas d'effets majeurs d'une forte consommation de saccharose ou de gras sur le profil d'expression du système endocannabinoïde.....	225
Figure 46 : Résultats des analyses statistiques de la comparaison de l'expression génique entre clusters	226

Figure 47 : La lésion de la voie RMTg-VTA conduit à une hyperdopaminergie et à une surconsommation de gras (Proposition de modèle).....	233
Figure 48 : Le système endocannabinoïde dans le RMTg module différemment la consommation de gras dans l'hyperphagie boulimique et l'obésité (Proposition de modèle)	237
Figure 49 : Modulation de la prise alimentaire par la voie RMTg-LH (Proposition de modèle).....	243
Figure 50 : Questionnaires de la « Yale food addiction scale ».....	245
Figure 51 : Circuits neuronaux centrés sur le RMTg et impliqués dans la prise alimentaire. Proposition de modèle	254

INTRODUCTION



Chapitre 1 : Les prises alimentaires homéostatiques et hédoniques

I : La prise alimentaire homéostatique

I-A : Définition de la prise alimentaire homéostatique

I-A-1 : Définition de l'homéostasie

Le terme « Homéostasie » apparaît au XIXe siècle, il est issu du grec ancien *ὁμοιος* (*omoios*) « semblable » et *στάσις* (*statis*) « pause/arrêt ». L'homéostasie est définie par Walter Cannon (1871-1945) comme la capacité de l'organisme vivant à maintenir ses constantes malgré les contraintes extérieures. Cependant, la première notion moderne de l'homéostasie provient de Claude Bernard (1813-1878), médecin physiologiste qui décrit la présence d'« ...Une force intérieure [qui vient] lutter contre les influences [du monde extérieur] et maintenir malgré elles l'équilibre des fonctions vitales » (Bernard, 1865). Le principe d'homéostasie concerne l'ensemble des constantes de l'organisme vivant et comprend la régulation du pH, de la température interne et du métabolisme énergétique par le biais de la prise alimentaire.

I-A-2 : Rôle de la prise alimentaire homéostatique

La prise alimentaire homéostatique correspond à la consommation de nourriture dans l'objectif de maintenir l'intégrité physique de l'organisme. Cette prise alimentaire s'articule autour de l'équilibre entre la dépense énergétique de l'organisme et l'apport calorique fait par l'alimentation (Lutter & Nestler, 2009 ; Cifuentes & Acosta, 2021). La prise alimentaire homéostatique s'organise en un cycle de trois grandes étapes définies par Blundell & Halford : une phase de faim, caractérisée par un désir inconfortable de vide au sein de l'estomac accompagné par une envie persistante de se nourrir, une phase de consommation qui aboutit à la « satiété » : la sensation de satisfaction du besoin, et se termine par la phase de satiété, une phase postprandiale dont la durée va déterminer le temps jusqu'au prochain repas (Blundell & Halford, 1994). Cette prise alimentaire est dirigée dans un but de survie avec la mise en place de réserves énergétiques quand la prise calorique excède la dépense énergétique. Ces réserves énergétiques sont le glycogène hépatique servant de réserve de

glucides pendant environ 48h (Rothman *et al.*, 1991) et le tissu adipeux blanc constitué d'adipocytes contenant une réserve de triglycérides (Ameer *et al.*, 2014). Ces triglycérides sont utilisés après une privation alimentaire de plus longue durée (>48h) jusqu'à leur épuisement.

I-B : Régulation de la prise alimentaire homéostatique

I-B-1 : Le système homéostatique

I-B-1-a : Les neurones du noyau arqué

La prise alimentaire homéostatique est dirigée par les différentes populations de neurones localisées au sein des noyaux hypothalamiques (Ferrario *et al.*, 2016, Campos, Port et Acosta, 2022). Dans le noyau arqué (ARC) les neurones AgRP/NPY (Agouti-Related-Peptide & Neuropeptide Y) constituent la principale population de neurones qui stimulent la prise alimentaire. L'activité de ces neurones est régulée par les hormones de la périphérie telles que la ghréline, hormone synthétisée par la paroi de l'estomac en période de jeûne, et la leptine, hormone synthétisée par le tissu adipeux blanc et dont la concentration plasmatique est positivement corrélée avec le taux de graisse d'un individu (Considine *et al.*, 1996). La ghréline, en agissant sur les neurones NPY, stimule la prise alimentaire. En effet, une immunohistochimie (IHC) contre cette hormone montre son accumulation autour des neurones NPY et des administrations intrapéritonéales (i.p) et intracérébroventriculaires (ICV) de ghréline conduisent à une augmentation de la fréquence de décharge des neurones NPY et stimulent la prise alimentaire chez le rat (Cowley *et al.*, 2001). Ces effets sont consécutifs à la liaison de l'hormone sur les récepteurs « Growth hormone secretagogue » (GHSR). Les neurones NPY sont également sensibles à la leptine. On retrouve à leur surface des canaux potassiques rectifiants entrants sensibles à cette hormone et qui sont capables d'induire une hyperpolarisation en présence de leptine (Baver *et al.*, 2014). Les neurones POMC/CART (Proopiomelanocortin/Cocaïne & Amphetamine Related Transcripts) constituent la seconde population principale de neurones de l'ARC. Ces neurones inhibent la prise alimentaire par la synthèse et libération d' α -MSH (alpha-melanocyte-stimulating hormone) et β -MSH qui activent les neurones à mélanocortine (MC4R) du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVH) (Fenselau *et al.*, 2017). Les neurones POMC/CART sont également activés par

la leptine. Une administration i.p de l'hormone induit l'expression de c-Fos, marqueur d'activité cellulaire, dans les neurones POMC (Elias *et al.*,1999). De plus, une activation chronique des neurones POMC par des outils pharmacogénétiques conduit à une diminution de la prise alimentaire et de la prise de poids chez la souris (Zhang *et al.*,2013). Au contraire, l'administration de ghréline a une action inhibitrice sur ces neurones en provoquant une diminution soudaine de leur fréquence de décharge (Cowley *et al.*,2001). La leptine permet également une réorganisation des réseaux neuronaux dans l'ARC. En effet, une administration i.p de cette hormone dans une souche de souris déficiente en leptine (souche ob/ob) conduit à une diminution des afférences excitatrices sur les neurones NPY/AgRP et une augmentation du nombre d'afférences excitatrices sur les POMC/CART (Pinto *et al.*,2004). Ainsi, la leptine joue un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire en affectant la dynamique des circuits neuronaux dans l'ARC. De plus, une caractérisation des réseaux neuronaux de l'ARC par des études de traçage de voies en neuroanatomie montre la présence de projections des neurones AgRP/NPY sur les neurones POMC/CART. La stimulation optogénétique de cette voie conduit à une inhibition des neurones POMC et favorise la prise alimentaire, montrant une forte interaction entre les deux sous-populations dans la régulation de la prise alimentaire (Atasoy *et al.*,2012).

I-B-1-b : Les neurones de l'hypothalamus latéral (LH)

L'hypothalamus latéral (LH) est une structure cérébrale impliquée dans de nombreuses fonctions englobant la régulation de la prise alimentaire, du cycle veille sommeil, de l'anxiété et des processus associés à la récompense (Bonnavion *et al.*,2016). Cette structure est composée de 5 principaux types de neurones incluant les neurones Orexinergiques (Orx), GABAergiques, glutamatergiques, à hormone de mélanocortine (MCH) et des neurones sensibles à la leptine (LepRb) (Bonnavion *et al.*,2016). Le LH a été précocement caractérisé comme un centre majeur de la régulation de la prise alimentaire, notamment par l'étude d'Anand & Brobeck de 1951 qui a montré qu'une lésion électrolytique du LH chez le rat aboutit à une mort par cachexie (Anand & Brobeck, 1951). Les principaux neurones du LH étudiés dans la régulation de la prise alimentaire sont les neurones MCH et Orx, bien que les neurones à acide γ -aminobutyrique (GABA) et glutamatergiques aient récemment été identifiés comme jouant un rôle majeur dans ce comportement. Le rôle des neurones MCH dans la prise alimentaire est mis en évidence en observant le phénotype de souris

déficientes en MCH : celles-ci présentent une prise alimentaire plus faible et une prise de poids moins importante que des souris contrôles (Alon & Friedman, 2006). Cette fonction des neurones MCH est étroitement liée à leur connectivité avec le circuit de la récompense. Un traçage antérograde révèle que les neurones MCH projettent sur le noyau accumbens et l'activation pharmacogénétique de cette voie conduit à une consommation plus importante, à la fois de nourriture standard et de nourriture palatable telle que des pastilles de saccharose (**Fig. 1**) (Terrill *et al.*,2020). Les neurones Orx du LH constituent la deuxième population de neurones du LH à avoir été largement étudiée dans la régulation de la prise alimentaire. Ces neurones synthétisent et libèrent l'orexine-A (OrxA) et l'orexine-B (OrxB), deux peptides dont l'administration ICV favorise la prise alimentaire (Sakurai *et al.*,1998). L'activité de ces neurones est influencée par l'état énergétique de l'organisme, notamment grâce à leur sensibilité à la leptine et la ghréline. Des enregistrements de ces neurones sur tranches en whole-cell patch clamp montrent que l'administration de ghréline augmente la fréquence de décharge des neurones Orx tandis que la leptine la diminue (Sheng *et al.*,2014). Tout comme les neurones MCH, les neurones Orx sont en étroite connexion avec les structures du circuit de la récompense. Cela a été montré initialement lorsqu'une administration d'OrxA dans le LH a conduit à une importante expression de c-Fos dans le NAc (Mullett *et al.*,2000). Cette connectivité entre le NAc et les neurones Orx du LH (**Fig.1**) et leur rôle dans la prise alimentaire a été plus amplement exploré dans une étude récente qui a démontré, à l'aide d'injections de fluorogold, un traceur rétrograde, dans l'écorce du NAc, la présence d'afférences provenant de neurones Orx du LH. Dans cette étude, une stimulation électrique du LH augmente la fréquence de décharge des neurones du NAc et une infusion d'OrxA dans le NAc conduit à une augmentation de la consommation de lait concentré sucré (Liu *et al.*,2020). Les neurones Orx projettent également sur les neurones dopaminergiques de la VTA (Korotkova *et al.*,2003) et une stimulation optogénétique de la voie LH (Orx)-VTA (Dopaminergiques) provoque une libération de dopamine dans le NAc ainsi qu'une augmentation du nombre d'appuis sur levier qu'effectue la souris pour obtenir des pastilles de saccharose dans une tâche de conditionnement opérant (**Fig.1**) (Thomas *et al.*,2021). Récemment, l'implication des neurones GABAergiques et glutamatergiques du LH a été étudiée dans la prise alimentaire. L'injection locale d'un traceur viral rétrograde a révélé une projection des neurones GABAergiques du noyau du lit de la strie terminale (BNST) vers les neurones glutamatergiques du LH. La

Introduction

stimulation optogénétique de cette voie inhibe la prise alimentaire, même chez des souris en restriction alimentaire (Jennings *et al.*,2013). Un protocole similaire, combinant un traçage viral antérograde et une stimulation optogénétique, a permis de montrer que les neurones GABAergiques et glutamatergiques du LH ciblaient les interneurons GABAergiques de la VTA (**Fig.1**), lesquels, à leur tour, régulaient les neurones dopaminergiques de la VTA. Ainsi, la stimulation optogénétique des neurones GABA du LH conduit à une désinhibition des neurones dopaminergiques et une libération de dopamine dans le NAc mesurée par voltamétrie, favorisant la consommation de nourriture standard et de saccharose dans un protocole de conditionnement opérant (Nieh *et al.*,2015 & 2016). Les neurones LepRb constituent une sous-population des neurones GABAergiques du LH exprimant le récepteur à la leptine et projetant également sur la VTA. Il a été récemment démontré que ces neurones, contrairement aux neurones GABAergiques classiques du LH, n'avaient pas un rôle modulateur positif sur la prise alimentaire mais permettaient d'encoder l'aspect plaisant d'une récompense (**Fig.1**). Dans cette étude, l'ablation de ces neurones n'a pas d'effet sur la prise alimentaire mais altère la capacité d'apprentissage des souris dans une tâche de conditionnement opérant. En effet, les rongeurs ayant subi une ablation de ces neurones se dirigent moins vers la zone de délivrance de la récompense quand l'indice lumineux qui précède l'obtention de la pastille de saccharose apparaît (Siemian *et al.*,2021). L'ensemble de ces études montre ainsi un rôle ambigu du LH. Cette structure semble impliquée à la fois dans la prise alimentaire homéostatique par son rôle modulateur de la prise alimentaire en fonction des signaux hormonaux périphériques comme la leptine et la ghréline et dans la prise alimentaire hédonique avec ses interactions avec le circuit de la récompense.

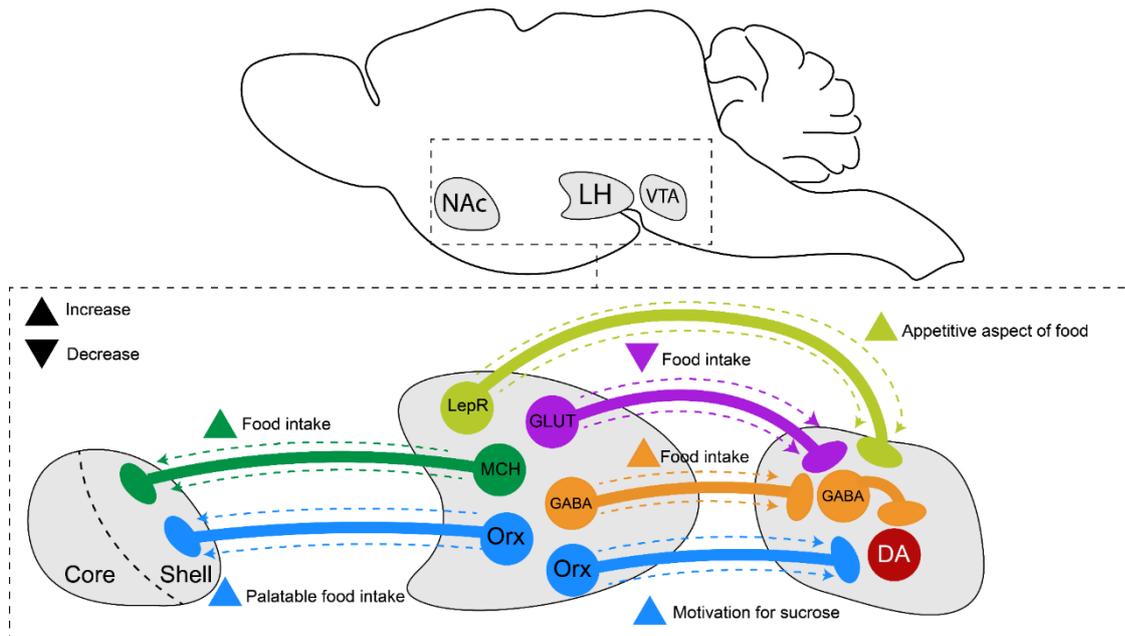


Figure 1 : Connectivité des neurones du LH et rôle dans la prise alimentaire

L'hypothalamus latéral (LH) est composé de cinq populations distinctes de neurones, chacune jouant un rôle spécifique dans la régulation de la prise alimentaire. Les neurones à mélanocortine (MCH) projettent sur l'écorce (Shell) du noyau accumbens (NAc) et stimulent la prise alimentaire. Les neurones orexines (Orx) projettent également sur l'écorce du NAc et stimulent la consommation de nourriture palatable tandis que leurs projections sur les neurones dopaminergiques (DA) de l'aire tegmentale ventrale (VTA) augmentent la motivation pour le saccharose dans des protocoles opérants. Les neurones GABAergiques (GABA) et glutamatergiques (GLUT) du LH projettent sur les interneurones GABAergiques de la VTA. Dans le LH, les neurones glutamatergiques inhibent tandis que les neurones GABAergiques stimulent la prise alimentaire. Les neurones exprimant le récepteur à la leptine (LepR) constituent une sous-population de neurones GABAergiques qui projette sur les neurones GABAergiques de la VTA et module l'aspect plaisant d'un aliment. Les flèches en pointillées représentent la direction de la projection. Adaptée de Bonnavion *et al.*, 2016.

II : La prise alimentaire hédonique

II-A : Définition

II-A-1 : Définition de l'hédonisme

L'hédonisme est une doctrine de pensée philosophique qui considère la recherche du plaisir comme le principal objectif dans l'optique d'une vie heureuse. Le terme « hédonisme » est issu du grec ancien « ἡδονή » (hédoné) « plaisir » et « ἰσμός » (ismos) suffixe qui rapporte à une doctrine. Elle a été fondée par le philosophe « Aristippe de Cyrène » (435-356 av. J.-C.) qui a également fondé l'école de pensée du Cyrénaïsme, une branche de l'hédonisme qui prône la recherche d'un plaisir immédiat sans se soucier des conséquences à long terme. Aristippe de Cyrène aurait dit à propos des plaisirs « Je possède [des plaisirs], je ne suis pas possédé [par ces plaisirs] » montrant que malgré la recherche de plaisirs, ce courant de pensée s'oppose à la perte de contrôle de l'individu sur ces plaisirs, comme ce qui peut être observé dans les addictions. La recherche du plaisir selon les hédonistes cyrénéens passerait notamment par la consommation de nourriture riche et de vins raffinés.

II-A-2 : Rôle de la prise alimentaire hédonique

La prise alimentaire hédonique est principalement orientée dans un but de recherche de plaisir (Lutter & Nestler, 2009). Elle concerne principalement la consommation d'aliments riches en gras et/ou en sucre définis comme étant « palatables » ou « savoureux » et associés à une sensation de plaisir et une forte valeur récompensante (Lutter & Nestler, 2009). Cette notion de valeur récompensante repose sur deux aspects distincts décrits par Berridge : le « wanting » qui qualifie l'attribution d'un caractère motivationnel et le « liking » qui évoque la sensation de plaisir ressentie lors de la consommation de ces aliments. Dans les modèles précliniques, le « wanting » peut être représenté dans des protocoles de conditionnement opérant comme la motivation pour obtenir une récompense et le « liking » peut être mesuré en regardant la réaction orofaciale des rongeurs suite à l'application d'une solution palatable (saccharose) ou aversive (quinine) (Grill & Norgren, 1978 ; Berridge et al., 2009). Ces deux aspects peuvent être dissociés l'un de l'autre et sont sous-tendus par des mécanismes neurobiologiques différents. Le « wanting » est principalement contrôlé par les neurones dopaminergiques puisque l'administration d'un antagoniste

dopaminergique D2, la spiropéridole (i.p, 0.1mg/kg), conduit à une diminution la motivation des rats à obtenir de la nourriture standard dans un protocole de conditionnement opérant (Rolls *et al.*,1974) sans affecter l'intensité de la réponse orofaciale « plaisante » des rats suite à la consommation d'une solution de saccharose (Treit & Berridge, 1990). Le « Liking » repose sur la signalisation opioïdérique dans le NAc. En effet, l'administration d'agoniste des récepteurs μ dans l'écorce du NAc conduit à une expression de c-Fos importante dans une sous-région de la structure et l'activation de cette sous-région augmente le « liking » associé à la consommation de saccharose (Peciña & Berridge, 2000). Cette sous-région a été identifiée comme étant un « hedonic hotspot » et une cartographie de l'écorce du NAc a également mis en évidence la présence d'une sous-région caudale du NAc dont l'activation accentue la réaction aversive à la quinine. Cette région est qualifiée de « hedonic cold-spot » (Peciña & Berridge, 2005). Chez l'Homme, une étude de population a permis de montrer que les aliments les plus récompensants sont les aliments riches en gras et en sucre, plus particulièrement ceux dont la proportion cumulée de gras et de sucre avoisine ou dépasse 30% (Schulte *et al.*,2015).

II-B: La régulation de la prise alimentaire hédonique

II-B-1 : Régulation centrale de la prise alimentaire hédonique

II-B-1-av : Modèle classique : Rôle du circuit de la récompense

La régulation de la prise alimentaire hédonique dépend principalement de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA et de leurs projections sur le striatum et le PFC formant le circuit de la récompense. La VTA a été identifiée pour la première fois par Tsai en 1925 chez l'opossum dans le cadre d'une étude des tractus optiques (Tsai, 1925). Elle est constituée de quatre sous-régions distinctes : le noyau parabrachial pigmenté, le noyau paranigral, le noyau interfasciculaire et le noyau rostral linéaire. Cette structure est composée de neurones dopaminergiques (60%) mais également de neurones glutamatergiques (5%) et GABAergiques (35%) qui modulent l'activité des neurones dopaminergique (Morales & Margolis, 2017, Chen *et al.*,2020 ; Nieh *et al.*,2015 & 2016, Nair-Roberts *et al.*,2008). Les neurones dopaminergiques ont été formellement identifiés en 1964 (Dahlström & Fuxe, 1964) et projettent densément sur le striatum et sur des structures corticales telles que le PFC

(Oades & Halliday, 1987), formant la voie mésocorticolimbique ou « circuit de la récompense ». Les projections des neurones dopaminergiques de la VTA vers le PFC ont surtout un rôle dans la modulation des fonctions exécutives comme l'impulsivité (**Fig.2**), qui est augmentée après une stimulation optogénétique de la voie dans le test « 5-choice serial reaction time task » (Flores-Durojouani *et al.*,2021). Les projections de la VTA sur le striatum visent plus particulièrement la partie ventrale, et plus précisément l'écorce du NAc (Haber *et al.*,2000). En effet, le striatum peut être distingué en deux grandes sous-régions : la partie dorsale du striatum, composée chez l'Homme du noyau caudé & putamen (CPU), mais qui chez le rongeur se dissocie en partie médiale (DMS) et latérale (DLS) du striatum dorsal. La partie ventrale du striatum est constituée très essentiellement par le NAc, qui se divise anatomiquement en « écorce du NAc » ou NAcShell et en « cœur du NAc » ou NAcCore. Le striatum est composé à 95% de neurones GABAergiques épineux moyens (MSN) (Matamales *et al.*,2009) et 5% d'interneurones (Muñoz-Manchado *et al.*,2018).

En termes de fonction, le DS a surtout un rôle dans les processus liés à la motricité, le DLS a notamment pour fonction de mettre en place les comportements d'habitudes. En effet, des rats entraînés à appuyer sur un levier pour obtenir une solution de saccharose continuent par habitude d'appuyer sur le levier permettant l'obtention de saccharose lors de la période d'extinction, même si la valeur appétitive du saccharose est diminuée par co-administration de chlorure de lithium. Chez des rats avec une lésion excitotoxique du DLS, l'appui sur levier est réfréné lors de cette période d'extinction, stipulant une abolition de la formation des habitudes comportementales (Yin *et al.*,2004). Le DMS lui aurait plutôt pour rôle l'acquisition des comportements moteurs dirigés vers un but, une étude similaire par le même groupe de recherche mais cette fois-ci procédant à une lésion du DMS a montré que cette lésion rend les rats insensibles à la dévaluation de la récompense dans un protocole de conditionnement opérant où l'appui sur levier permet l'obtention de saccharose ou d'une croquette (Yin *et al.*,2005). Dans le NAc, le cœur a surtout un rôle dans l'orientation du comportement moteur vers l'obtention d'une récompense. Dans une expérience de conditionnement où un son est associé à l'obtention d'une solution d'éthanol, l'inhibition du cœur du NAc conduit à une diminution du nombre d'entrées que fait le rat dans la zone où il obtient l'éthanol (Chaudhri *et al.*,2010). L'écorce du NAc, elle, aurait essentiellement pour rôle d'encoder la valeur de la récompense. Par exemple, une étude en voltamétrie *in vivo* montre que les indices prédisant l'obtention

d'une récompense importante (deux morceaux de sucre) conduisent à une libération de dopamine plus importante dans l'écorce alors que l'indice prédisant une récompense plus petite (un morceau de sucre) conduit à une libération de dopamine plus faible (Sackett *et al.*, 2017). L'écorce a également un rôle important dans la modulation des aspects de « liking » et « wanting » avec la présence de zones riches en récepteurs opioïdes : le « hedonic hotspot » dont l'activation par un agoniste opioïde μ tel que le DAMGO ([D-Ala², NMe-Phe⁴, Gly-ol⁵]-enkephalin; DAGO) conduit à une augmentation du « liking » avec la manifestation d'une réaction orofaciale du rat associée au plaisir, mais également du « wanting », caractérisé par une prise alimentaire plus importante. Un « hedonic cold spot » dont l'activation diminue le « liking » (Castro & Berridge, 2014 ; Berridge *et al.*, 2009) est également présent. Les projections dopaminergiques au DS sont principalement issues de la substance noire compacte (SNc) (Gerfen *et al.*, 1990) mais une cartographie par traçage transsynaptique montre que les neurones dopaminergiques de la VTA y projettent également (Beier *et al.*, 2015). Ainsi, les projections dopaminergiques de la VTA visent l'intégralité du striatum.

Dans le striatum, les neurones recevant les afférences dopaminergiques peuvent être séparés en deux catégories sur la base de leur expression des récepteurs à la dopamine: les neurones « MSN-D1 », exprimant le récepteur dopaminergique de type 1 et les neurones « MSN-D2 », exprimant le récepteur dopaminergique de type 2 sont découverts en 1990 par hybridation *in situ* réalisée sur le striatum de rats contre D1 et D2 (Gerfen *et al.*, 1990). Ces deux récepteurs couplés aux protéines G ont différentes voies de signalisation, ce qui confère un rôle différent aux neurones MSN-D1 et MSN-D2 dans la réponse à la dopamine. En effet, les récepteurs D1 sont couplés aux protéines Gs tandis que les récepteurs D2 sont couplés aux protéines Gi. Ainsi, la libération de dopamine dans ces structures conduit à une activation des neurones MSN-D1 et une inhibition des neurones MSN-D2 (Nishi *et al.*, 2011). Ces différents types de neurones MSN-D1 et MSN-D2 sont impliqués dans les voies directes et indirectes qui modulent notamment le comportement moteur (Cox & Witten, 2019).

La voie directe prend son origine dans le striatum où l'activation des neurones MSN-D1 par les afférences dopaminergiques conduit à une désinhibition du thalamus par l'intermédiaire du globus pallidus, les projections excitatrices envoyées par le thalamus au PFC moteur permettent la facilitation du mouvement. Au contraire, la voie indirecte inhibe le comportement moteur via les afférences dopaminergiques qui

inhibent les neurones MSN-D2, cette inhibition conduit alors à une désinhibition des noyaux sous-thalamiques qui inhibent le thalamus par l'intermédiaire du globus pallidus. L'inhibition du thalamus diminue la transmission glutamatergique jusqu'au PFC moteur et inhibe le mouvement (Roshan *et al.*, 2016). La modulation des neurones MSN-D1, notamment dans le DS, participe au développement d'habitudes comportementales (Bromberg-Martin, 2010). Ces voies sont essentielles pour la régulation de la motricité en permettant l'initiation d'un mouvement précis et en inhibant les mouvements « parasites » pouvant interférer. Elles sont notamment affectées dans la maladie de Parkinson suite à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc, conduisant aux symptômes moteurs de la pathologie (Calabresi *et al.*, 2014). De ce fait, les transmissions dopaminergiques de la part de la VTA sur le striatum peuvent moduler ces comportements moteurs (**Fig.2**) dans l'objectif d'obtenir une récompense et peuvent ainsi contribuer aux mécanismes de l'addiction. En effet, la prise de substances addictives et de nourriture conduit à une libération importante de dopamine dans le striatum (Volkow *et al.*, 2018, Hedges *et al.*, 2017 ; Zetterstrom *et al.*, 1984, Wang *et al.*, 2001, Volkow *et al.*, 2011) qui en agissant sur le DS peut participer au développement d'une habitude comportementale associée à la prise de la substance/nourriture. Cette libération excessive de dopamine en agissant sur le NAc permet l'intégration de l'aspect motivationnel d'un stimulus puisqu'une lésion spécifique de la voie VTA-NAc par administration de 6-OHDA, un agent pharmacologique lésant spécifiquement les afférences dopaminergiques, directement dans le NAc, conduit à une diminution importante de la prise alimentaire des rats sans atténuer l'aspect hédonique du saccharose (Berridge *et al.*, 1989).

La distinction fonctionnelle des neurones MSN-D1 et MSN-D2 au sein du NAc (**Fig.2**) a été récemment étudiée dans le cadre de la prise alimentaire. Deux études utilisant des outils viraux innovants (Matikainen-Ankney *et al.*, 2022 ; Guillaumin *et al.*, 2023) ont mis en évidence qu'un blocage spécifique des neurones D1 du NAc par injection locale d'un AAV-Floxé exprimant la toxine tétanique conduisait à une diminution de la motivation des souris à obtenir des croquettes dans un protocole de conditionnement opérant. De plus, l'inhibition de ces neurones par la toxine tétanique diminue la prise alimentaire et la prise de poids, même lors d'une exposition *ad libitum* à un régime riche en gras (60% du contenu des croquettes). Au contraire, un blocage par la toxine tétanique des neurones D2 du NAc conduit à une motivation plus importante pour obtenir les croquettes mais n'affecte pas la prise alimentaire lors d'une exposition à un

régime riche en gras (Matikainen-Ankney *et al.*,2022). De plus, un enregistrement des neurones D1 et D2 par une approche de photométrie par fibre montre que les neurones D1 sont activés, tandis que les neurones D2 sont inhibés lors de la consommation d'un aliment palatable (« milkshake ») (Guillaumin *et al.*,2023). Par ailleurs, la stimulation des neurones D1 augmente le « wanting », caractérisé dans l'étude par le nombre de léchages que fait la souris sur le biberon contenant la solution de milkshake et le « liking », déterminé par la diminution du temps entre deux léchages (**Fig.2**). Cependant, la stimulation des neurones D2 diminue le « liking » (**Fig.2**), faisant écho aux effets de l'activation pharmacologique des D2 dans un protocole de préférence de place en temps réel qui conduit à un phénotype aversif, représenté par un évitement du compartiment dans lequel a lieu la stimulation (Soares-Cunha *et al.*,2020). Ainsi, ces études montrent que les neurones D1 du NAc encodent à la fois les aspects motivationnels et hédoniques de la prise alimentaire. Cependant le rôle des récepteurs D2 dans ces aspects est moins évident. En effet, jusqu'à récemment l'activation des neurones MSN-D1 et MSN-D2 a initialement été cru comme ayant un rôle opposé dans l'attribution d'une valence motivationnelle avec l'activation des MSN-D2 conduisant à une aversion dans un protocole de préférence de place (Kravitz *et al.*,2012, Soares-Cunha *et al.*,2020) mais une activation optogénétique des neurones MSN-D2 du NAc, projetant au pallidum ventral (VP), conduit à une augmentation de la motivation à obtenir une récompense (croquette). Cet effet a lieu si l'activation a lieu précisément au moment de la présentation de l'indice lumineux indiquant la disponibilité de la récompense. Au contraire, l'activation de cette voie au moment de la délivrance de la récompense conduit à une baisse de motivation (Soares-Cunha *et al.*,2022). De la même manière, la stimulation des neurones MSN-D2 est vue comme récompensante dans un protocole d'autostimulation (Cole *et al.*,2018). Il est envisageable que la valence aversive/récompensante assurée par les MSN-D2 diffère selon la voie neuronale dans laquelle sont impliqués ces neurones mais également du moment précis de l'activation de ces neurones.

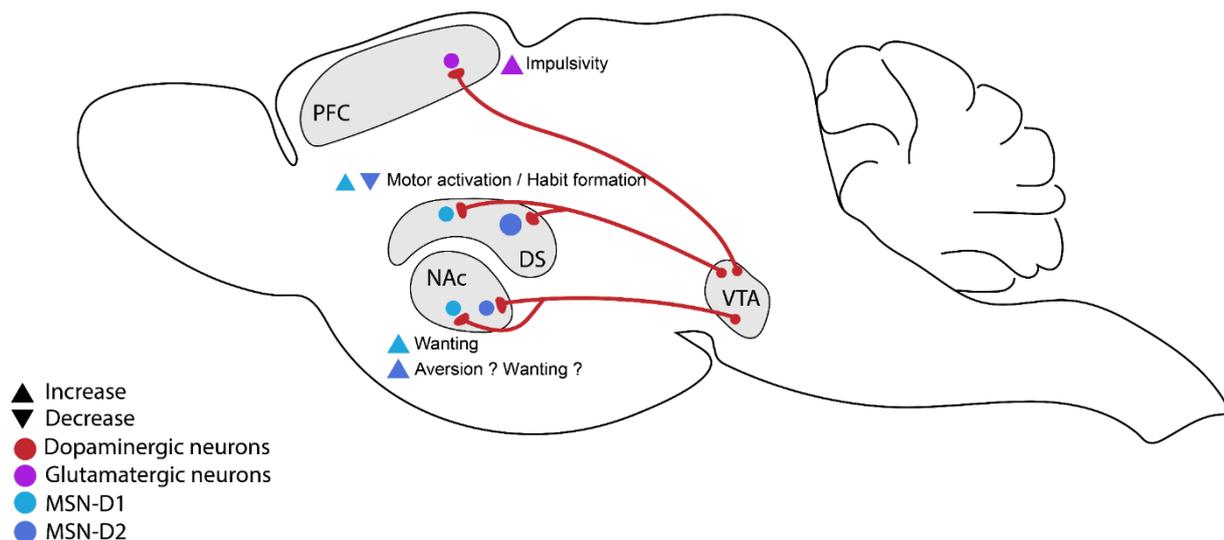


Figure 2 : La voie mésocorticolimbique ou « circuit de la récompense »

Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) projettent sur les neurones glutamatergiques du cortex préfrontal (PFC) et influencent l'impulsivité. Les projections de la VTA vers le striatum dorsal (DS) ciblent les neurones épineux moyens (MSN) exprimant le récepteur dopaminergique D1 et D2 dont l'activation conduit respectivement à une activation/inhibition motrice et favorise/inhibe la formation des comportements habituels. Dans le noyau accumbens (NAc), les neurones dopaminergiques de la VTA ciblent également les neurones MSN D1 ou D2. l'activation des D1 augmente le « wanting » et le « liking » associées à un stimulus tandis que le rôle des neurones D2 dans le NAc dans l'aversion et le « wanting » reste ambigu.

II-B-1-b : Apports récents des nouvelles techniques en neurosciences

Les nouvelles techniques d'étude des réseaux neuronaux (optogénétique, pharmacogénétique, traçage par vecteurs viraux...) ont mis en évidence l'implication de structures atypiques et ont levé le voile sur l'implication de nouveaux circuits cérébraux dans la régulation de la prise alimentaire hédonique. Dans ce contexte, l'hippocampe (HPC) a récemment été découvert comme impliqué dans la régulation de la prise alimentaire (Hsu *et al.*, 2018) (**Fig.3**). Dans cette étude, un traçage antérograde utilisant un vecteur viral exprimant une protéine fluorescente montre que les neurones glutamatergiques de la partie ventrale de l'HPC projettent sur le PFC médian (mPFC) et que l'activation pharmacogénétique de cette voie inhibe la prise alimentaire et la motivation à obtenir des croquettes riches en gras (35% de l'apport calorique total) dans un protocole opérant. Similairement, une étude de traçage

rétrograde par vecteur viral a montré la présence de projections des neurones MC4R du subiculum ventral (vSub), structure de la formation hippocampique sur l'écorce du NAc (**Fig.3**). La stimulation de cette voie par des outils pharmacogénétiques augmente la motivation à la nourriture palatable dans un protocole opérant (Singh *et al.*,2022). Un autre circuit mis en évidence dans la régulation de la prise alimentaire hédonique grâce aux nouveaux outils est la projection des neurones somatostatines (SOM) du cerveau antérieur basal sur le LH (**Fig.3**), ce circuit a été mis en évidence par une approche de traçage rétrograde utilisant un vecteur viral et sa stimulation optogénétique augmente sélectivement la consommation de nourriture palatable (croquettes, 20% de sucre, 60% de gras) sans affecter la consommation de nourriture standard (Zhu *et al.*,2017). Un rôle du complexe amygdalien a également été mis en évidence dans la régulation de la prise alimentaire. Les neurones GABAergiques du noyau central de l'amygdale (CeA) projettent sur le CPF ventromédian (vmPFC) et une activation optogénétique de cette voie chez la souris augmente le nombre de « nose-pokes » pour obtenir une solution palatable de saccharose (**Fig.3**) (Seo *et al.*,2016). De plus, le CeA contient des neurones à prepronociceptine (PNOC) qui sont activés par la prise alimentaire et qui projettent sur le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau parabrachial pigmenté (PBN), deux structures de la prise alimentaire hédonique (Berland *et al.*,2020 ; Boughter *et al.*,2019) (**Fig.3**). Une lésion spécifique de ces neurones entraîne une diminution de la consommation de nourriture palatable et une résistance à l'obésité lors d'une exposition *ad libitum* à un régime riche en gras (Hardaway *et al.*,2019). D'autres noyaux du complexe amygdalien semblent impliqués dans la régulation de la prise alimentaire hédonique. En effet, la stimulation optogénétique des neurones glutamatergiques du cortex orbitofrontal (OFC) latéral projetant sur le noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) augmente le nombre d'appuis sur levier qu'effectue la souris pour obtenir une solution de saccharose (**Fig.3**) (Malvaez *et al.*,2019). L'utilisation de ces nouvelles techniques a également révélé l'existence de nouveaux circuits incluant des structures préalablement identifiées dans la régulation de la prise alimentaire. C'est le cas d'une population de neurones de l'ARC exprimant le peptide PNOC (**Fig.3**). Une étude combinant l'approche de traçage antérograde et de photométrie en fibre montre que ces neurones projettent sur le BNST (Noyau du lit de la strie terminale) et sont activés chez la souris vigile pendant la consommation de nourriture palatable (croquettes contenant 21% de saccharose et 60% de gras). Une lésion spécifique de ces neurones diminue la consommation de

Introduction

nourriture palatable sans affecter la consommation de nourriture standard (Jais *et al.*,2020). Une autre structure mise en avant par ces nouvelles techniques est le NTS où un traçage antérograde a révélé que les neurones de la structure exprimant le récepteur du Glucagon-Like-Peptide-1 (GLP-1-R) projettent sur les neurones dopaminergiques de la VTA (Wang *et al.*,2015) (**Fig.3**). De manière intéressante, la stimulation pharmacogénétique de cette voie augmente la consommation de nourriture palatable (croquettes contenant 45% de gras). C'est également le cas des projections des neurones MCH du LH sur l'écorce du NAc (**Fig.3**) dont l'activation stimule la consommation de nourriture palatable (Terrill *et al.*,2020). Également, la projection réciproque NAc-VTA peu étudiée a été récemment mise en évidence dans ce comportement, une inhibition de cette voie inhibe notamment la consommation de nourriture palatable (Bond *et al.*,2020). Ces études montrent l'étendue des structures cérébrales impliquées dans la prise alimentaire et la complexité de circuits dans ce comportement. La poursuite de ces études visant à identifier ces réseaux est nécessaire afin de pouvoir établir une cartographie précise de la régulation de la prise alimentaire. L'élargissement de ces connaissances pourrait permettre d'identifier les circuits impliqués dans les troubles du comportement alimentaire (TCA) ou dans l'obésité, pathologies où la neurobiologie associée est encore peu connue. Il serait intéressant de poursuivre ces études en examinant des structures situées à l'interface entre la prise alimentaire homéostatique et la prise alimentaire hédonique.

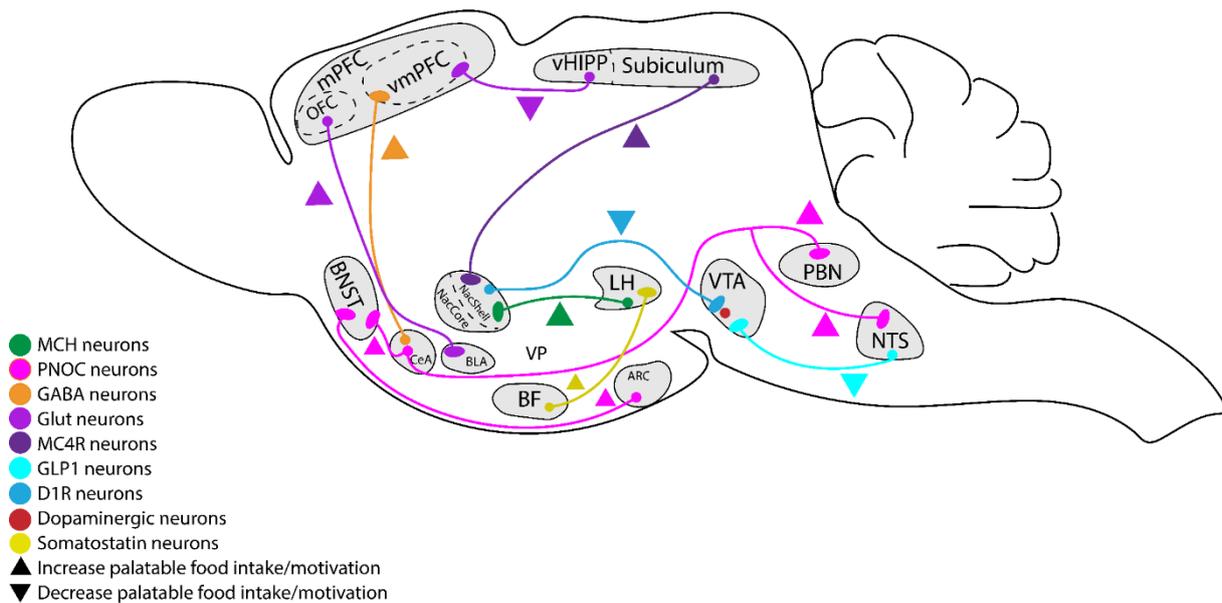


Figure 3 : Circuits nouvellement identifiés dans la régulation de la prise alimentaire hédonique

Les études publiées entre 2012 et 2023 ont permis de mettre en évidence de nouveaux circuits cérébraux impliqués dans la prise alimentaire hédonique (motivation à obtenir de la nourriture palatable ou consommation de nourriture palatable). Une activation par des outils pharmacogénétiques des neurones glutamatergiques de l'HPC (HPC) et des neurones MC4R du subiculum projetant au cortex préfrontal ventro médian (vmPFC) et à l'écorce du noyau accumbens (NacShell) augmente la motivation à obtenir de la nourriture palatable. La stimulation optogénétique des neurones somatostatine du cerveau antérieur basal (BF) projetant à l'hypothalamus latéral (LH) augmente la consommation de nourriture palatable. Une activation optogénétique des neurones GABAergiques du noyau central de l'amygdale (CeA) projetant au vmPFC augmente la motivation pour obtenir du saccharose. Une lésion spécifique des neurones Pro-nociceptine (PNO) qui projettent au noyau parabrachial (PBN) et au noyau du tractus solitaire (NTS) conduit à une diminution de la consommation de gras. Une stimulation pharmacogénétique des neurones glutamatergiques du cortex orbitofrontal (OFC) projetant à l'amygdale basolatérale (BLA) augmente la motivation pour obtenir du saccharose. Dans le noyau arqué (ARC), les neurones PNO projettent sur le noyau du lit de la strie terminale (BNST) et une lésion spécifique de ces neurones inhibe la consommation de nourriture palatable. Les neurones du noyau du tractus solitaire (NTS) contiennent des neurones exprimant le récepteur du Glucagon-Like-Peptide-1 (GLP-1-R) qui projettent sur les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA). La stimulation pharmacogénétique de cette voie augmente la consommation de nourriture palatable. La stimulation des neurones à mélanocortine (MCH) du LH projetant au NAc augmente la consommation de nourriture palatable et la stimulation optogénétique des neurones D1 du NAc projetant à la VTA inhibe la consommation de nourriture palatable.

III : Pathologies liées à l'alimentation

III-A : L'obésité

III-A-1 : Définition et causes de l'obésité

L'obésité est définie, selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme une accumulation de graisse qui est nocive pour la santé. Le principal critère de définition de l'obésité est l'IMC (Indice de Masse Corporelle). Cet indice est calculé comme le rapport de la masse en kg sur la taille en m² de l'individu. Les valeurs normales de l'IMC se situent entre 18.5 et 24.9 kg.m⁻², un IMC inférieur à 18.5 kg.m⁻² indique que l'individu est en insuffisance pondérale tandis que l'IMC d'une personne en surpoids est situé entre 25 et 29.9 kg.m⁻². Une personne est considérée comme obèse quand son IMC dépasse 30 kg.m⁻². La prévalence mondiale de l'obésité est en augmentation depuis une quarantaine d'années : elle était de 5% en 1980 et atteint 14% en 2020. Cette augmentation concerne l'ensemble des continents avec l'Amérique du Nord et le continent européen comme étant les plus affectés avec respectivement 22.5 et 20% de la population diagnostiquée comme étant atteinte d'obésité. En France, l'obésité concerne 17% de la population (Rapport de l'OMS, 2022 ; Fontbonne, 2023). L'obésité touche plus de femmes que d'hommes, et ceci à toutes les tranches d'âges mais cette différence s'illustre beaucoup plus à partir de l'âge adulte. L'origine de cette différence homme/femme n'est pas clairement identifiée mais peut être partiellement expliquée par certains facteurs biologiques tels que l'occurrence de pathologies propres au sexe féminin comme le syndrome des ovaires polykystiques qui s'accompagne d'une résistance à l'insuline pouvant accentuer la prise de poids ou la prise d'une contraception hormonale tout au long de la vie qui conduit à des fluctuations plus ou moins importantes du poids (Kapoor *et al.*, 2021 ; Link & Reue, 2017). Selon l'OMS, l'augmentation de la prévalence de l'obésité est fortement liée à la plus grande facilité d'accès aux aliments palatables riches en gras et en sucre qui a drastiquement augmenté en parallèle de la prévalence de l'obésité (Demeke, 2023).

III-A-2 : Conséquences métaboliques de l'obésité

Les études sur la population montrent que l'obésité augmente significativement le risque de développer des troubles cardiovasculaires (Cameron *et al.*,2009). En effet, l'obésité conduit à une dyslipidémie et une formation des plaques d'athérosclérose dans les artères qui conduisent à une insuffisance cardiaque (Head *et al.*,2015). L'obésité s'accompagne également de troubles métaboliques tels que le diabète de type 2 ou diabète « non insulino-dépendant » caractérisé par une hyperglycémie chronique (>1.10 g/L de sang) causée par une désensibilisation des tissus à l'insuline. Environ 30% des patients diabétiques de type 2 sont obèses et ce trouble métabolique conduit à une neuropathie périphérique ainsi qu'à des troubles vasculaires pouvant aboutir à des accidents vasculaires cérébraux (Papatheodorou *et al.*,2015). Une autre conséquence métabolique de l'obésité est l'accumulation de lipides dans le tissu hépatique conduisant à une stéatose hépatique non alcoolique ou « Non-alcoholic fatty liver disease » (NAFLD). Chez les patients, le développement de cette pathologie est étroitement lié à la surconsommation d'aliments riches en sucre, notamment le fructose, un monosaccharide retrouvé dans les sodas. En effet, la métabolisation du fructose a lieu exclusivement dans le foie par les hépatocytes. Le métabolisme du fructose conduit à une accumulation d'acétyl-CoA, qui active la voie de la lipogénèse hépatique et provoque à une accumulation de lipides (Lim *et al.*,2010). La NAFLD conduit progressivement à une fibrose du tissu hépatique qui aboutit à une insuffisance hépatique sévère pouvant causer la mort (Eng & Estall .,2021). L'obésité est donc une pathologie qui conduit à des altérations métaboliques et vasculaires graves pouvant entraîner la mort, et son augmentation constante fait de la lutte contre cette pathologie un enjeu majeur de santé publique.

III-A-3 : Modèles animaux d'obésité

III-A-3-1 : Critères de l'obésité dans les modèles murins

Dans l'optique de développer de nouvelles thérapeutiques efficaces pour lutter contre l'obésité, il est nécessaire d'étudier les mécanismes sous-jacents grâce à l'utilisation de modèles animaux. La littérature scientifique ne propose pas de critères universels pour caractériser l'obésité dans les modèles précliniques. Selon les études, les animaux sont qualifiés comme obèses lorsque leur consommation et leur poids dépassent ceux d'un groupe contrôle du même âge (Martire *et al.*,2013 ; Rossi *et al.*,2019 ; Boggiano *et al.*,2007). Dans d'autres expériences, c'est la masse de tissu

adipeux blanc qui est utilisée comme critère d'obésité (Bourdy *et al.*,2021 ; Krashes *et al.*,2011 ; Hardaway *et al.*,2019). Certaines études définissent les animaux comme obèses lorsqu'ils présentent les atteintes métaboliques retrouvées dans l'obésité (La Fleur *et al.*,2010 ; Slomp *et al.*,2019) et quelques études utilisent l'IMC comme critère d'obésité (Bourdy *et al.*,2021 ; Novelli *et al.*,2007). L'IMC chez le rongeur est calculée de la même manière que chez l'homme (masse en gramme / (distance museau-anus) en cm²). Une étude dans laquelle différents paramètres métaboliques sont mesurés chez des rats exposés à un régime standard ou un régime obésogène montre que l'IMC normal d'un rat se situe entre 0.45 et 0.68 g.cm⁻² et qu'une valeur supérieure peut être utilisée comme critère d'obésité chez le rat (Novelli *et al.*,2007).

III-A-3-2 : Modèles génétiques : Exemple de la souris *ob/ob* et du rat Zucker

Une partie des modèles utilisés pour étudier l'obésité sont des souches de rats/souris qui deviennent obèses naturellement (Suleiman *et al.*,2020 ; Lutz & Woods, 2012). Le modèle le plus connu chez la souris est la souche « *ob/ob* mouse » découverte accidentellement en 1951 quand une reproduction classique de souris a donné naissance à un grand nombre d'individus qui ont naturellement développé une résistance à l'insuline et une prise de poids importante sans exposition à un régime obésogène (Ingalls *et al.*,1950). Un séquençage de ces souris montre alors une mutation sur le gène *ob* (Zhang *et al.*,1994). Ce gène sera identifié une année plus tard comme responsable de la synthèse de l'hormone leptine. La mutation de ce gène chez les souris *ob/ob* les rend incapables de synthétiser l'hormone (Halaas *et al.*,1995), provoquant une hyperphagie et phénotype d'obésité. Ce modèle illustre fidèlement la symptomatologie de l'obésité chez l'Homme, notamment avec une prise alimentaire excessive ainsi qu'une prise de poids importante (Halaas *et al.*,1995). Cependant, l'étiologie de cette forme d'obésité est différente de ce qui est observé chez l'Homme. En effet, la déficience complète en leptine chez l'Humain existe et conduit à une obésité et une hyperphagie dès l'enfance mais elle reste extrêmement rare avec moins d'une centaine de cas identifiés (Montague *et al.*,1997). Un modèle similaire à la souris *ob/ob* existe chez le rat, la souche « Zucker » de rat qui est partiellement déficiente en récepteur à la leptine . Ces rats résistants à la leptine sont hyperphagiques, ont une hyper-insulinémie et une prise de poids plus importante que des animaux contrôles (Bray, 1977). Cette souche de rat modélise une résistance à la leptine et non pas une déficience complète de la synthèse de l'hormone, modélisant

ainsi plus fidèlement l'obésité. Ces modèles génétiques ne prennent cependant pas en compte la consommation d'aliments palatables, facteur important du développement de l'obésité chez l'Humain. Ces aspects sont caractérisés dans les modèles d'obésité induite par la diète.

III-A-3-3 : Modèles d'obésité induite par la diète

Les principaux modèles non génétiques d'obésité reposent sur une exposition des animaux à un régime généralement riche en gras et/ou en sucres, mimant ainsi plus fidèlement la pathologie observée chez l'Homme (Slomp *et al.*, 2019). Les modèles les plus souvent utilisés sont ceux riches en gras, décrits en détail dans la revue de la littérature sur le sujet (Hairiri & Thibault, 2010). Ces régimes varient en termes de durée d'accès allant de 4 semaines pour les plus courts (Harrold *et al.*, 2000) jusqu'à 41 semaines pour les plus longs comme le 1^{er} modèle décrit d'obésité induite par un régime (**Fig.4**) (Mickelsen *et al.*, 1955).

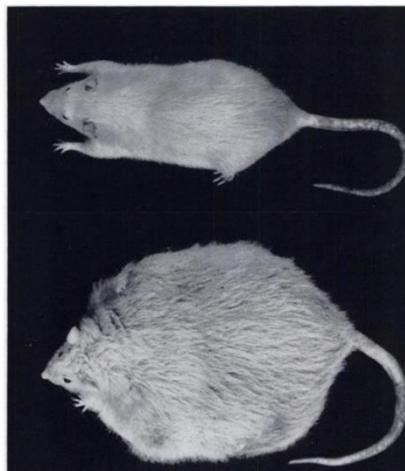


Figure 4 : Une exposition à un régime riche en gras conduit à l'obésité chez le rat

Le premier modèle de diète obésogène réalisé par Mickelsen en 1955 consiste à exposer les rats Osborne-Mendel pendant 41 semaines à un régime obésogène composé d'un mélange de nourriture standard avec 60% de gras d'un bloc de graisse végétale. Les rats du groupe contrôle exposés à un régime standard (image du haut) atteignent un poids de 555g au terme des 41 semaines de protocole tandis que les rats exposés à la diète obésogène (image du bas) atteignent 1455g après 41 semaines d'exposition. Extrait de Mickelsen *et al.*, 1955.

La composition de ces régimes varie également, allant de 20% de gras (Ainslie *et al.*, 2000) jusqu'à 100% (La Fleur *et al.*, 2010 ; Bourdy *et al.*, 2021 ; Koekkoek *et*

al.,2021&2022). On constate que dans les régimes uniquement riches en gras, la prise de poids n'est pas toujours plus importante que celle de rats contrôles du même âge. Cependant, la masse de tissu adipeux blanc est plus importante que ce soit chez des rats exposés à un régime à teneur plus faible (20%) (Ainslie *et al.*,2000) ou plus élevée (60%) en gras (Okere *et al.*,2006). Un autre type de régime obésogène moins utilisé est le régime enrichi en sucres dans lequel les animaux ont soit accès à des croquettes riches en saccharose ou à une solution de saccharose ou de fructose (entre 10 et 30%) en plus de leur nourriture standard (Bocarsly *et al.*,2010 ; Harris & Apolzan, 2012 ; Harris, 2019). Les conséquences métaboliques de ces régimes sont différentes selon le type de sucres et la concentration. Un accès *ad libitum* à une solution de fructose 10% pendant trois semaines conduit à une prise de poids plus importante et une augmentation de la masse du tissu adipeux blanc (Bocarsly *et al.*,2010) tandis qu'un accès *ad libitum* à une solution de saccharose 30% conduit chez les femelles à une masse de tissu adipeux blanc plus importante ainsi qu'à une résistance à la leptine. Cependant , leur prise de poids est plus faible que des rattes contrôles ayant accès uniquement à la nourriture standard. L'accès à la solution de saccharose 30% conduit à la fois à une surconsommation de saccharose de jour comme et de nuit et à une importante diminution de la consommation de nourriture standard, ce qui aboutit à une diminution du poids et à la présence d'altérations métaboliques retrouvées dans l'obésité (Harris *et al.*,2019). Il est proposé que ce type de régime dans lequel le sucre est consommé sous forme liquide constitue un modèle plus fidèle aux habitudes alimentaires humaines où la consommation de boissons sucrées comme les sodas constitue jusqu'à 10% de l'apport calorique quotidien (Ruff *et al.*,2014). Un régime de type « free choice high fat high sucrose » (fcHFHS), qualifié de plus représentatif de l'environnement obésogène a été développé par le groupe de de La Fleur (La Fleur *et al.*, 2010). Dans ce régime, les animaux ont accès, en plus de leur eau et la nourriture standard, à deux aliments palatables correspondants à un bloc de lipides saturés (blanc de bœuf, 100% de gras) et une solution de saccharose de concentration variable allant de 10 à 30% (w/v). Cette notion de choix avec la disponibilité d'aliments standards et palatables permet de modéliser plus fidèlement l'environnement obésogène dans lequel l'Homme évolue. Comparativement à un régime riche en gras ou riche en saccharose, les rats du protocole fcHFHS développent une hyperphagie qui se maintient pendant l'intégralité du régime ainsi qu'une prise de poids plus importante que des animaux contrôles, qui n'ont pas accès à la nourriture palatable.

Cette prise de poids est accompagnée par une accumulation de tissu adipeux blanc, combinée à une résistance à l'insuline et une diminution de la tolérance au glucose, permettant une modélisation fidèle des conséquences métaboliques de l'obésité (La Fleur *et al.*, 2010 & 2011).

Ces régimes obésogènes affectent la motivation des animaux pour les aliments palatables ou standards, notamment l'exposition à un régime riche en gras conduit à une augmentation de la motivation pour obtenir du saccharose dans un protocole opérant (Figlewicz *et al.*, 2013, La Fleur *et al.*, 2007). De plus, une exposition à un régime riche en gras conduit également à une dévaluation de la nourriture standard face à la nourriture palatable. En effet, des souris exposées à un régime riche en gras (60% de la densité calorique) en plus de leur nourriture standard présentent un désintérêt vis-à-vis de la nourriture standard. Ce désintérêt s'illustre par le choix volontaire de consommer le régime riche en gras et ne pas consommer de la nourriture standard après une restriction alimentaire de quelques heures (Mazzone *et al.*, 2020). De plus, l'accès continu à un régime obésogène riche en gras, riches en sucres et combinant le gras et le sucre conduit à une diminution des capacités mnésiques (Blanco-Gandia *et al.*, 2019 ; Abbott *et al.*, 2019), similairement à ce qui est observé chez des patients obèses (Deckers *et al.*, 2017). Ces régimes conduisent aussi à une sensibilisation plus importante aux effets des drogues addictives (Fordahl *et al.*, 2016 ; Peleg-Raibstein *et al.*, 2016). Une telle sensibilisation est retrouvée chez les patients obèses après une chirurgie bariatrique (Li & Richard, 2017). Ainsi, ces modèles permettent fidèlement de modéliser l'obésité chez les patients et les conséquences métaboliques et cognitives associées.

III-A-4 : Neuroadaptations liées à l'obésité

III-A-4-1 : Observations chez les patients obèses

Les études réalisées chez l'Homme avec les techniques d'imagerie ont pu mettre en évidence des altérations de la transmission dopaminergique chez les patients obèses. L'une des études pionnières sur la neurobiologie de l'obésité est celle qui a montré, par tomographie à émission de positon (TEP), la diminution de la disponibilité des récepteurs D2 dans le striatum d'adultes obèses (Wang *et al.*, 2001). Cette diminution de la densité de récepteur D2, témoignage d'une hypoactivité du circuit de la récompense peut être envisagée comme la conséquence d'une

désensibilisation des voies mésolimbiques chez les patients obèses les rendant moins sensibles à l'aspect récompensant associé aux aliments palatables. La théorie du « reward deficiency syndrom » (RDS) a été proposée afin d'expliquer la diminution de l'activité du circuit dopaminergique. Cette théorie suggère que le développement d'une dépendance aux drogues ainsi que la surconsommation de nourriture palatable sont liées à un circuit de la récompense moins sensible face aux stimuli récompensant, ce qui conduit à une prise excessive de drogues/nourriture (Blum *et al.*,1996). Cette théorie se base notamment sur la présence de polymorphismes de gènes du système dopaminergique, tel que l'allèle Taq1 A1 du gène *drd2*, initialement découvert chez les patients alcooliques et qui contribue à une réduction de la capacité de liaison de la dopamine sur le récepteur D2 (Noble *et al.*,1993). Ce polymorphe Taq1 A1 a été extensivement étudié comme un potentiel facteur majeur du RDS qu'on retrouve dans les troubles d'abus de substances et la surconsommation de nourriture. Une étude chez l'Humain a montré que ce variant est notamment présent chez 12.3% des personnes souffrantes d'alcoolisme, 41.6% des fumeurs de cigarettes et 18.6% de patients présentant une surconsommation de nourriture (Blum *et al.*,1996, Comings & Blum, 2000). La présence de ce variant est notamment associée à un risque plus important pour développer une obésité chez des enfants (Cardel *et al.*,2019) et l'adulte (Barnard *et al.*,2009) et une étude en imagerie a pu mettre en évidence une réduction de l'activité du striatum chez des patients ayant l'allèle Taq1 A1 (Stice *et al.*,2008). De plus, des analyses *post-mortem* montrent une diminution de l'expression du transporteur de la dopamine (DAT) et une réduction de la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante de la synthèse de dopamine, dans le mésencéphale de patients obèses (Wu *et al.*,2017) qui vont dans le sens de la théorie du RDS.

Cependant, certaines études montrent des résultats contraires à la théorie du RDS. Notamment, certaines études ont montré une corrélation positive entre l'IMC et la disponibilité des récepteurs D2 dans le striatum chez des patients obèses (Cosgrove *et al.*,2015 ; Dunn *et al.*,2012, Dang *et al.*,2016). D'autres études ne montrent pas de différences sur la capacité de liaison du récepteur D2 chez des patients obèses et non obèses (Steele *et al.*,2010 ; Karlsson *et al.*,2015). Les résultats parfois contradictoires observés entre ces études peuvent être liés à la différence d'âge des sujets entre les études. En effet, les études ne montrant pas de changement sur la disponibilité des récepteurs D2 sont des études réalisées sur des sujets jeunes (40 ans) et une étude utilisant des sujets jeunes et âgés a montré que la diminution de la disponibilité des

récepteurs D2 n'est présente que chez les patients obèses âgés (Dang *et al.*,2016). Un autre système de neurotransmission possiblement affecté par l'obésité est le système sérotoninergique. En effet, une étude post-mortem en IHC sur des cerveaux d'anciens obèses montre une réduction de la présence des transporteurs de la sérotonine (SERT) dans l'ARC (Borgers *et al.*,2014). Cette diminution fait écho à ce qui est observé dans le cas du traitement de la dépression où les molécules agissant comme des inhibiteurs de la SERT peuvent conduire à une prise de poids plus importante (Fava, 2000). Une autre étude a révélé une réduction du taux d'acide 5 hydroxy-indol-acétique (5HIA), un métabolite de la sérotonine, dans le liquide céphalo-rachidien d'individus obèses (Markianos *et al.*,2013) allant également dans le sens d'une augmentation du tonus sérotoninergique pouvant participer à l'augmentation de la prise de poids dans l'obésité. Ainsi, l'obésité conduit à une altération des systèmes de neurotransmission, notamment au sein du circuit de la récompense, mais ces adaptations restent encore floues et nécessitent de plus larges investigations, notamment par le biais de modèles précliniques permettant une étude plus approfondie des mécanismes sous-jacents.

III-A-4-2 : Données issues des modèles précliniques

Les études précliniques réalisées jusqu'à présent sur les neuroadaptations liées à l'obésité montrent également des résultats contradictoires selon les études. Une analyse dans le NAc par qRT-PCR (Réaction de polymérase en chaîne) et chromatographie liquide à haute performance montre que des souris exposées à un régime riche en gras (60%) présentent une réduction de l'expression des récepteurs D1 et D2 et une diminution de la libération de dopamine (Carlin *et al.*,2013). Une étude réalisée dans notre laboratoire a conduit à des résultats similaires après une exposition de six semaines à un régime de type fCHFHS. Dans nos conditions, l'analyse de l'expression des gènes associés au système dopaminergique dans la VTA montre une diminution de l'expression de D2 et de la TH (Bourdy *et al.*,2021). Ces études soutiennent l'hypothèse d'une réduction de la transmission dopaminergique dans le circuit de la récompense dans le contexte de l'obésité. Cependant, une exposition des rats à un régime riche en gras (30%) pendant 12 semaines conduit à une hypersensibilité des neurones dopaminergiques à l'amphétamine et à une expression de la TH augmentée dans le NAc, illustrant une hyperdopaminergie (Naneix *et al.*,2017). De plus, une exposition de 8 semaines à un régime riche en gras (45%)

conduit à une motivation plus importante des rats pour la nourriture riche en gras ainsi qu'à un taux de dopamine extracellulaire plus importante dans le NAc (Narayanaswami *et al.*, 2013). La composition en lipides saturés/insaturés de la diète obésogène peut également être un facteur influençant l'activité du système dopaminergique. Dans une étude où les animaux sont exposés à un régime riche en acides gras saturés (50% de lipide saturés) pendant 8 semaines, le régime conduit à une diminution de l'expression de la DAT, des récepteurs D2 ainsi qu'à une augmentation de l'expression des récepteurs D1, un effet non retrouvé après une exposition à un régime riche en acides gras insaturés (Hryhoczuk *et al.*, 2016). Les modèles précliniques d'obésités montrent également à une modification de la transmission glutamatergique. Une exposition de 10 jours à un régime de type « junk food » composé à 20% de gras et 50% de saccharose conduit à une augmentation de la signalisation AMPA dans le NAc, participant à une sensibilisation des animaux à l'effet récompensant de la cocaïne et suggérant une hypersensibilité du circuit de la récompense (Oginsky *et al.*, 2016). On retrouve dans ces modèles des modifications concernant le système sérotoninergique. En effet, l'exposition à un régime obésogène induit une augmentation de la liaison de la sérotonine aux récepteurs 5HT1A/1B/2A dans l'hypothalamus ainsi qu'à une diminution de la libération de sérotonine dans cette structure (Park *et al.*, 1999 ; Routh *et al.*, 1994). Des travaux récents ont également pu mettre en évidence des modifications de l'expression du système endocannabinoïdes (ECS) dans des structures du cerveau associées à la récompense dans des modèles précliniques d'obésité. Ces aspects seront discutés en détail dans le chapitre sur le système endocannabinoïde (**Cf Chapitre 3, II-D-3-b : Observations dans des modèles précliniques**).

III-B : Les troubles du comportement alimentaires (TCA)

III-B-1 : Définition et épidémiologie des TCAs

Les troubles du comportement alimentaires ou TCA sont des pathologies mentales caractérisées par un comportement alimentaire inapproprié associé à des complications métaboliques (obésité, diabète) et psychiatriques (troubles de l'humeur, anxiété ou abus de substance) lourdes. Les critères diagnostiques des TCAs sont détaillés dans la 5ème édition du Manuel diagnostique et statistique des troubles

mentaux (DSM-5, Association Américaine de Psychiatrie) les plus connus étant l'anorexie mentale ou « *anorexia nervosa* » (AN) et la boulimie nerveuse (BN) ou « *bulimia nervosa* ». L'anorexie mentale concernerait jusqu'à 1.5% des femmes et 0.3% des hommes en France (Rapport de la Haute Autorité de Santé, 2010). Elle est caractérisée par une restriction alimentaire stricte et volontaire, une peur pathologique de la prise de poids et une recherche incessante de minceur. La boulimie nerveuse, elle, concerne jusqu'à 2.3% des femmes et 1.6% des hommes (Bagaric *et al.*,2020). Cette pathologie se manifeste par des crises d'hyperphagie suivies de mécanismes de compensation pouvant inclure des « purges » avec des vomissements et une activité physique exacerbée dans le but d'éviter la prise de poids (Aubry *et al.*,2022). Depuis la 5^e et dernière édition du DSM, une nouvelle pathologie a été classifiée comme un TCA : l'hyperphagie boulimique (HB) ou « binge-eating disorder ».

III-B-2 : Exemple de l'hyperphagie boulimique (HB)

L'HB est un TCA caractérisé par des crises d'hyperphagie avec une fréquence d'au moins une fois par semaine pendant trois mois pendant laquelle l'individu va, en l'absence d'une sensation de faim, ingérer une grande quantité de nourriture pendant une courte période (>1000 kcal en moins de 2h ; Hildebrandt & Ahmari, 2021). Un sondage réalisé chez les patients atteints d'HB montre que la plupart des aliments consommés pendant les crises sont pour la plupart riches en gras et en sucres (Kales *et al.*,1990). Contrairement à la boulimie nerveuse, la prise alimentaire dans l'HB n'est pas compensée par une activité physique exacerbée ou par des vomissements (DSM-5). L'HB est le trouble du comportement alimentaire le plus prévalent avec des taux de 2.6% chez les femmes et de 1% chez les hommes (Guerdijkova, 2019). Cette pathologie est souvent associée avec l'obésité puisqu'il est estimé que plus de 40% des patients atteints d'HB sont également obèses (Spitzer, 1993). Aujourd'hui la seule thérapeutique médicamenteuse efficace contre l'HB est la lisdexamphétamine (LDX) commercialisée sous le nom Vyvanse© disponible en Amérique du Nord et certains pays européens. Cependant, cette molécule n'est pas prescrite en France pour cette pathologie. Le LDX est une amphétamine initialement utilisée dans les troubles de l'attention (McElroy *et al.*,2015) qui a montré son efficacité chez les patients en permettant d'atteindre la sensation de satiété plus rapidement. Cela a pu être démontré par une diminution de la vitesse de consommation d'aliments et une réduction de la prise alimentaire chez les patientes ayant pris une unique dose orale

de 50 mg de LDX avant un repas (Schneider et al., , 2021). Cependant, ce traitement s'accompagne d'effets secondaires comme de l'insomnie, des nausées, des douleurs abdominales et un risque de dépendance après une prise à long terme (Najib, 2009 ; Carton *et al.*,2022). Par ailleurs, le traitement permet une réduction du nombre de crises mais ne conduit pas à une guérison complète de la pathologie. Le manque de thérapies efficaces afin de traiter l'HB est fortement lié au manque de connaissance sur la neurobiologie associée à la pathologie.

III-B-3 : Modèles précliniques d'hyperphagie boulimique

III-B-3-1 : Les modèles d'accès intermittent

Les modèles précliniques d'HB se distinguent en deux grands types : les modèles avec un accès intermittent à de la nourriture palatable et les modèles comportant une restriction alimentaire (avec ou sans stress). Ces modèles ont été décrits en détail dans des revues de la littérature (Hildebrandt & Ahmari 2021 ; Brown *et al.*, 2023). Les modèles d'accès intermittent consistent à donner un accès limité aux animaux, généralement sur une période comprise entre 1h et 4h, à de la nourriture palatable tous les jours ou plusieurs fois par semaine. L'un des premiers modèles décrits d'accès intermittent consistait à exposer des rats, en plus de leur nourriture standard, à un bloc de gras végétal (100% de lipide) pendant 2h le lundi, le mercredi et vendredi (protocole MWF : Monday, Wednesday, Friday) où tous les jours de la semaine (Corwin *et al.*, 1998). Dans ce protocole, les rats avec l'accès intermittent consomment près de 50% de leur apport calorique quotidien en gras les jours d'accès, illustrant la consommation excessive pendant un temps court (Corwin *et al.*,1998 ; Berner *et al.*,2008). Il existe d'autres modèles d'accès intermittent plus longs. C'est le cas des protocoles d'accès intermittent au saccharose mis en place dans notre laboratoire chez la souris et le rat. Chez la souris, ce modèle consiste à une exposition 4h/jour, quotidiennement, à une solution de saccharose à une concentration de 17.1%. Cet accès conduit à une consommation excessive de saccharose, essentiellement lors de la première heure d'accès (Awad *et al.*,2020). Chez les rats, ce protocole consiste à une exposition de 12 heures par jour, sur une période de 4 semaines à une solution de saccharose 10%. Comme chez la souris, la mesure pendant la première heure montre une consommation excessive de saccharose comparée à des rats ayant un accès *ad libitum* à la solution de saccharose (De Sa Nogueira *et al.*,2021). La plupart

des modèles d'accès intermittent utilisent cependant des protocoles comportant des périodes d'accès relativement courtes allant de 20 minutes (Stamatakis *et al.*,2016) à 4 heures (Awad *et al.*,2020) dans l'optique de mieux représenter les épisodes d'hyperphagie et la symptomatologie de l'HB. En effet, une étude comparative des différentes durées d'accès dans un protocole d'HB avec des périodes d'accès de 2, 4 ou 8 heures à un régime riche en saccharose (66% des calories totales), à une fréquence de 5 jours par semaine, montre que les accès les plus courts, 2 h ou 4h, conduisent à une consommation excessive pendant les heures d'accès (Kreisler *et al.*,2018).

III-B-3-2 : Les modèles de restriction alimentaire

D'autres modèles d'HB reposent sur une restriction calorique afin d'induire une consommation excessive de nourriture. Dans ces modèles, les rats sont restreints à 75% de leur apport calorique quotidien habituel pendant 5 jours avant de recevoir un accès *ad libitum* à des cookies sur une période de deux jours. Au terme de douze semaines, la consommation de cookies pendant la période de ré-accès surpasse largement celle de rats n'ayant pas subi de restriction alimentaire et correspond à près de 70% de la prise calorique totale (Hagan & Moss, 1997). Un autre modèle utilise un protocole similaire mais combine en plus un stress supplémentaire où l'aliment palatable est placé dans la cage de l'animal pendant quinze minutes sans qu'il ne puisse y avoir accès, induisant un stress de frustration chez l'animal. Après 4 semaines, ce protocole conduit à une consommation de nourriture palatable deux fois plus élevée comparée à des rats ayant uniquement la restriction calorique ou le stress de frustration (Cifani *et al.*,2009).

III-B-4 : Neurobiologie de l'hyperphagie boulimique

III-B-4-1 Modifications observées chez l'Homme

La plupart des informations actuelles sur les neuroadaptations liées à l'HB proviennent d'études en imagerie fonctionnelle (Kessler *et al.*,2016). La mesure de l'activité de structures du cerveau en IRM fonctionnelle chez des patients obèses atteints ou non d'HB montre une réduction de l'activité du vmPFC, de l'OFC, du cortex insulaire et du striatum ventral chez les patients atteints d'HB (Balodis *et al.*,2013 & 2014) et une mesure en TEP montre que les patientes atteintes d'HB ont une

transmission dopaminergique plus importante dans le striatum (Wang *et al.*,2011). Ces études en imagerie montrent ainsi une altération de la transmission dopaminergique dans les structures du circuit de la récompense, similairement à ce qui est observé dans l'obésité. Ces altérations de la transmission dopaminergique peuvent potentiellement expliquer l'altération des fonctions exécutives observée chez les patients atteints d'HB comme attestée par une étude où une série de tests réalisée chez des patients atteints d'HB a montré une altération de la flexibilité cognitive (Duschene *et al.*, 2010). En dehors de ces altérations de la transmission dopaminergique, les études en imagerie ont également mis en évidence une altération de la signalisation sérotoninergique. En effet, les patientes atteintes d'HB présentent une diminution de la liaison de la sérotonine au SERT dans les structures mésencéphaliques (Kuikka *et al.*,2001). Ces études indiquent la présence de modifications importantes de la transmission dopaminergique et sérotoninergique qui nécessitent d'être complétées par des études plus invasives réalisées sur des modèles précliniques.

III-A-4-2 Apport des modèles précliniques

Les études précliniques ont permis de mettre en évidence un ensemble de neuroadaptations liées à l'HB et les nouvelles techniques en neurosciences ont permis d'étendre la connaissance des réseaux neuronaux sous-tendant cette pathologie (Yu *et al.*,2022). Les neuroadaptations observées, comme pour l'obésité, concernent principalement la transmission dopaminergique et les structures du circuit de la récompense. Cela a été observé dans un protocole avec un accès intermittent à un régime riche en gras, qui a conduit à une diminution de l'expression du récepteur D2 dans le NAc et une baisse de l'expression du récepteur D1 dans l'OFC et la VTA ainsi qu'une baisse de l'expression de la TH dans le PFC (Corwin *et al.*,2016, Chalwa *et al.*,2017). Par ailleurs, un accès intermittent à une solution de saccharose 12h/jour conduit à une diminution de la dopamine et à une augmentation des niveaux extracellulaires d'acétylcholine dans le NAc (Avena *et al.*,2008). L'ensemble de ces études suggère une hypodopaminergie dans les structures du circuit de la récompense. Cependant, chez des ratte ayant un accès quotidien de 2h à une solution de saccharose 10%, le blocage des récepteurs D2 par l'antagoniste Raclopride administré dans le NAc réduit la consommation de saccharose, suggérant que l'HB pourrait reposer également sur une hyperdopaminergie et qu'il existerait peut-

être un changement de l'activité du système dopaminergique au cours de la pathologie (Suarez-Ortiz *et al.*, 2018). Les modifications de l'HB sur la transmission dopaminergique restent encore à éclaircir et nécessite de mettre en place des études longitudinales afin de déterminer si une alternance entre un état d'hypo et d'hyperdopaminergie a lieu dans cette pathologie.

III-A-4-3 Apports récents des nouvelles techniques en neurosciences dans l'identification des réseaux impliqués dans les TCAs

Les études de ces dix dernières années mettent en avant trois structures nouvellement impliquées dans les TCA : l'habénula latérale (LHb), le noyau raphé dorsal (DR) et l'amygdale (**Fig.5**). La LHb contient essentiellement des neurones glutamatergiques. Elle a principalement été étudiée dans le contexte de l'erreur de prédiction négative (**Cf Chapitre II, III-E : Rôle du RMTg dans l'erreur de prédiction et l'aversion**) car elle inhibe fortement les neurones dopaminergiques, en réponse à un stimulus aversif ou à des signaux prédictifs associés, notamment par l'intermédiaire du RMTg (Laurent *et al.*, 2017). Étant donné que la LHb est fortement connectée au circuit de la récompense et au LH, un corpus récent de travaux s'est intéressé à son rôle dans la régulation de la prise alimentaire. Un traçage rétrograde par l'intermédiaire de billes fluorescentes injectées dans la LHb montre que les neurones glutamatergiques du LH envoient des projections vers la LHb et que l'inhibition spécifique de cette voie par une approche optogénétique favorise la consommation d'un liquide calorique accessible 20 minutes par jour (Stamatakis *et al.*, 2016). Cela suggère que la LHb pourrait réguler la prise alimentaire compulsive d'aliments palatables comme observé dans l'HB. Il a été proposé que cette modulation pourrait passer par l'activation d'une structure cérébrale inhibitrice ciblant les neurones dopaminergiques de la VTA, l'une de ces régions potentielles étant le RMTg. Plus récemment, les neurones NPY de la CeA projetant vers la LHb ont été étudiés dans la modulation de la consommation d'aliments palatables, notamment dans des conditions stressantes (Ip *et al.*, 2023). Une ablation spécifique de ces neurones à l'aide de vecteurs viraux où une inhibition, par des outils pharmacogénétiques, des neurones de la LHb exprimant NPYR conduit à une moindre consommation de nourriture riche en gras après des chocs électriques. Par le biais d'un traçage rétrograde, il a été montré que les neurones de la LHb ciblés par les neurones NPY projettent directement sur la VTA, mettant ainsi en lumière un nouveau circuit CeA-LHb-VTA capable de favoriser la consommation de nourriture

palatables dans des conditions stressantes et ainsi participer à la mise en place de TCA.

La deuxième région cérébrale récemment mise en avant dans les TCA est le DR situé sur la ligne médiane du tronc cérébral et composé essentiellement de neurones sérotoninergiques. Une approche de traçage antérograde a montré que ces neurones projetaient vers la VTA. De plus, l'activation de cette voie par une approche optogénétique conduit à une réduction de la consommation de nourriture palatale dans un protocole d'accès intermittent à un régime riche en gras (Xu *et al.*,2017). L'utilisation de traceurs viraux antérogades a également pu mettre en évidence que les neurones du RN envoyaient des projections excitatrices vers les neurones GABAergiques du noyau de la zonula incerta (ZIR) et que la stimulation optogénétique de cette projection accentuait le phénotype d'HB dans un protocole d'accès intermittent. Cette étude a ainsi démontré la présence d'une voie RN-ZIR impliquée dans l'HB (Ye *et al.*,2022). Une population d'interneurones GABAergiques inhibant les neurones du PFC projetant vers le DR a été identifiée comme atténuant l'apport alimentaire chez des souris adolescentes soumises à un protocole d'anorexie basée sur l'activité (ABA). Cette étude a initialement examiné le rôle de la projection mPFC-DR dans l'anorexie par activation pharmacogénétique et les auteurs ont découvert que la stimulation de cette voie induisait une augmentation de l'expression de c-Fos dans les interneurones GABAergiques du mPFC. De plus, cette expression était négativement corrélée avec la prise alimentaire lors du protocole ABA, suggérant l'existence d'un réseau de neurones dans le PFC impliqué dans l'anorexie (Du *et al.*,2022).

Enfin, l'amygdale a été récemment mise en évidence dans l'HB lorsqu'une lésion spécifique des neurones PNOC de l'ARC projetant vers la BLA, le NTS et le BNST a conduit à une réduction de la consommation d'aliments palatables riches en gras dans un protocole d'accès intermittent (Hardaway *et al.*,2019). L'amygdale semble également avoir un rôle dans l'anorexie causée par les traitements chimiothérapeutiques puisqu'une inhibition pharmacogénétique des neurones glutamatergiques du PBN projetant vers le CeA est responsable d'une réduction de l'anorexie induite par un traitement de chimiothérapeutique (Alhadeff *et al.*,2017).

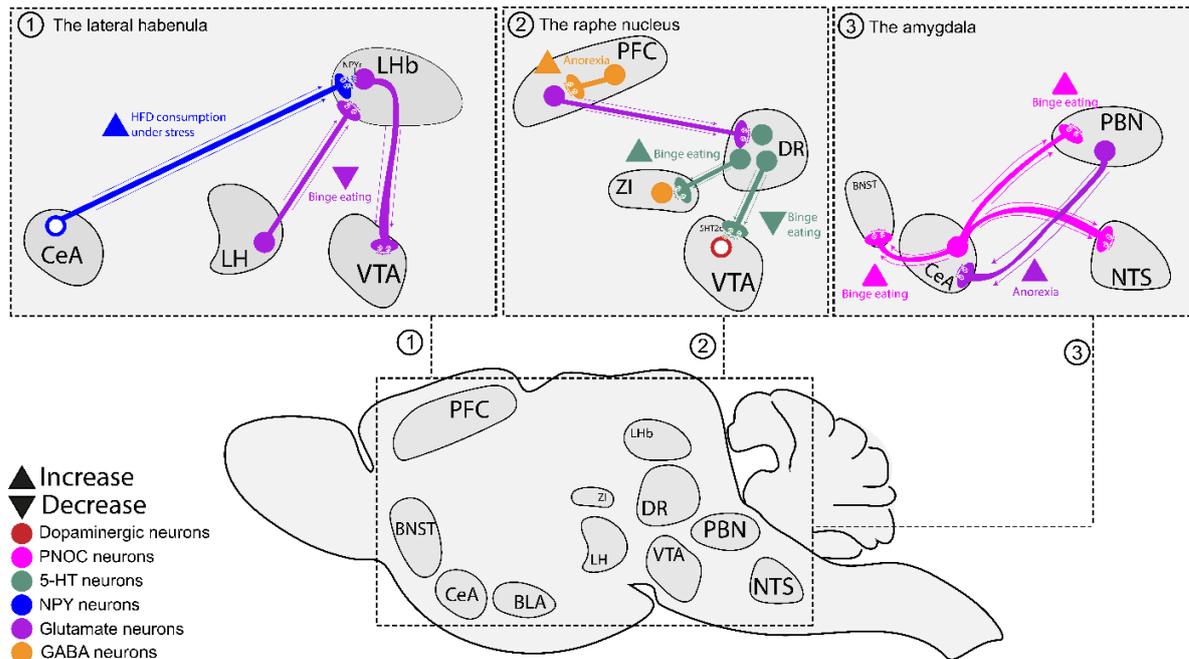


Figure 5 : Circuits nouvellement identifiés dans les TCAs

L'habénula latérale (LHb), le noyau du raphé (RN) et l'amygdale, composée du noyau central (CeA) et basolatéral (BLA) sont des structures récemment mises en évidence comme étant impliquées dans les troubles du comportement alimentaires (TCAs). (1) La projection des neurones glutamatergiques de l'hypothalamus latéral (LH) vers la LHb réduit le phénotype d'HB tandis que les neurones à neuropeptide Y (NPY) du CeA projetant vers la LHb augmentent la consommation d'aliments riches en gras suite à un stress. (2) Les projections du noyau du raphé dorsal (DR) vers les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) ont un rôle inhibiteur sur le phénotype d'HB, tandis que les projections des neurones sérotoninergiques du DR vers la zonula incerta (ZIR) accentuent ce phénotype. Les interneurons GABAergiques inhibant les neurones pyramidaux du cortex préfrontal (PFC) projetant vers le DR diminuent la prise alimentaire dans un protocole d'Activity Based Anorexia (ABA) (3) Les neurones pro-nociceptine (PNOC) du CeA projetant vers le noyau parabrachial (PBN), le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau du lit de la strie terminale (BNST) accentue le phénotype d'HB. Les neurones glutamatergiques du PBN projetant vers le CeA favorisent l'anorexie.

Chapitre 2 : Le noyau tegmental rostromédian (RMTg)

I : Historique de la découverte du RMTg

I-A : Une structure découverte simultanément par deux équipes

Le noyau tegmental rostromédian ou «RMTg » est une structure cérébrale bilatérale mésencéphalique. Elle a été mise en évidence la même année par deux groupes de chercheurs qui l'étudiaient dans des aspects différents.

La première étude consistait initialement à découvrir si une administration de cocaïne pouvait conduire à une expression de Δ Fos-B, un marqueur d'activité chronique des neurones (Nestler *et al.*,2008) dans les neurones de la VTA. Dans cette expérience, les auteurs ont vu que l'auto-administration de cocaïne chez des rats pendant 14 jours conduisait à une augmentation de l'expression de Δ Fos-B exclusivement dans la « partie postérieure de la VTA » ou « queue de l'aire tegmentale ventrale », s'étendant sur l'axe antéro-postérieur (AP) de -6.04 à -7.00 mm par rapport au bregma (**Fig.6**), majoritairement composée de neurones GABAergiques. Il a été suggéré que ces neurones pouvaient moduler l'aspect récompensant des psychostimulants en agissant sur les neurones dopaminergiques (Perrotti *et al.*,2005). Ainsi, du fait de sa localisation en arrière de la VTA, cette structure est considérée comme une extension caudale de cette dernière, et a été nommée : « queue de l'aire tegmentale ventrale » ou « tVTA » (Perrotti *et al.*,2005 ; Kaufling *et al.*,2009)

La deuxième étude s'intéressait aux neurones GABA dans la partie postérieure de la VTA, et les a identifiés dans la modulation de l'inhibition comportementale (« freezing ») face à un stimulus aversif via l'inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA (Jhou *et al.*,2005). Cette structure est caractérisée chez le rat comme un amas de neurones GABAergiques issu de la formation réticulée, proche du noyau du raphé médian (MRN), qui s'imbrique dans la partie postérieure de la VTA et qui inhibe les neurones dopaminergiques de la VTA (Jhou *et al.*,2005). Ce groupe de recherche va attribuer à cette structure le nom « RMTg » (Jhou *et al.*,2009a), nom qui provient de sa localisation au sein de la formation réticulée, similairement à des structures voisines comme le noyau tegmental latérodorsal (LDTg) et qui permet d'appuyer la séparation de cette structure avec la VTA. Contrairement à la VTA, le RMTg contient une grande majorité de neurones GABAergiques (Perrotti *et al.*,2005 ; Kaufling *et al.*,2010 ; Smith

Introduction

et al.,2019), reçoit de denses projections de la part de la LHB et est activé par des stimuli aversifs (Jhou *et al.*,2009a&b). À ce jour, les deux nomenclatures sont interchangeables et désignent la même structure. Dans la suite de ce manuscrit, le nom RMTg a été privilégié.

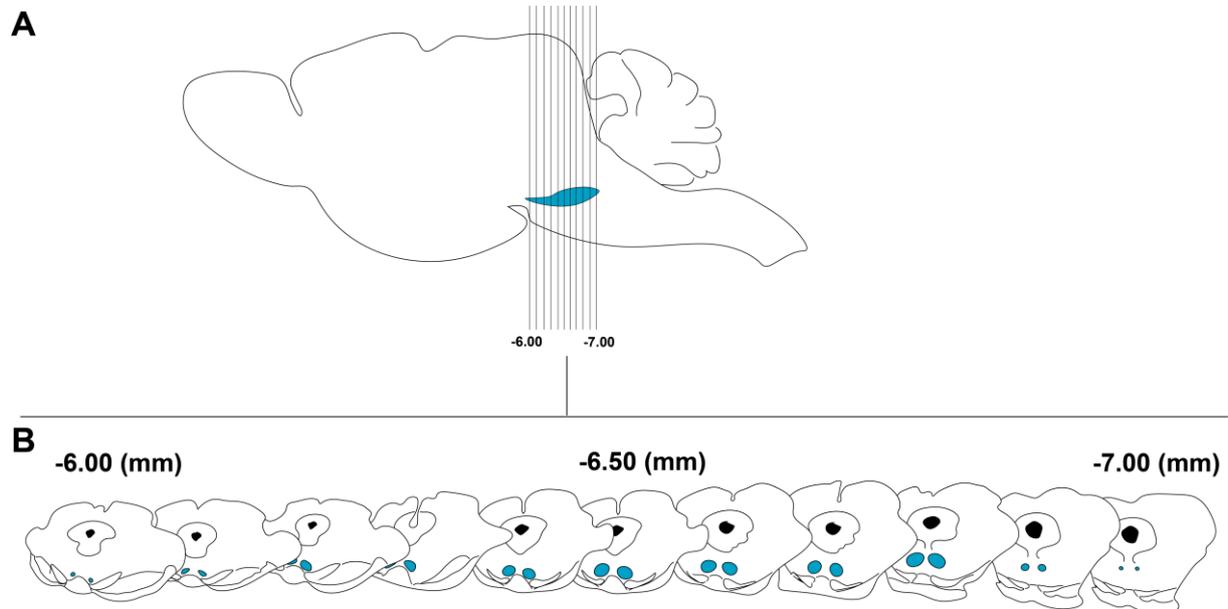


Figure 6 : Localisation neuroanatomique du RMTg chez le rat

A Coupe sagittale d'un cerveau de rat. Le RMTg (représenté en bleu) s'étend de -6.00 mm à -7.00 mm par rapport au bregma avec un aspect de corne. **B** Schématisation de coupes coronales de cerveau de rat couvrant l'étendue antéro-postérieure du RMTg, comprise entre -6.00 mm et -7.00 mm par rapport au point bregma. Le diamètre du RMTg (bleu) s'élargit sur l'axe antéro-postérieur et dorsoventral jusqu'à -6.80 avant de rétrécir et disparaître vers -7.00. Adaptée de Kaufling *et al.*,2009.

Chez le rat, le RMTg s'étend de -6.00 mm à -7.00 mm par rapport au bregma et son diamètre s'élargit sur l'axe AP et dorso-ventral (DV) jusqu'à -6.8 mm avant de

Introduction

diminuer et de disparaître vers -7.00 mm (**Fig.6** ; Jhou *et al.*,2009a ; Kaufling *et al.*,2009 ; Kaufling *et al.*,2010 ; Smith *et al.*,2019). Chez la souris, le RMTg s'étend de -3.6 à -4.84 mm par rapport bregma et présente une forme générale proche de celle observée chez le rat (**Fig.7** Quina *et al.*,2015 ; Smith *et al.*,2019 ; Zhao *et al.*,2022). Au-delà des rongeurs, cette structure a également été identifiée chez le macaque rhésus vers -13.35 mm par rapport au bregma (**Fig.7** ; Hong *et al.*,2011), et chez le chien (Gorbachevskaya, 2013), bien que les études relatives au chien ne fournissent pas les coordonnées stéréotaxiques de la structure. La présence de cette structure n'a pas encore été mise en évidence chez l'Homme mais sa présence dans de nombreuses espèces, dont le primate non humain, suggère fortement qu'une structure analogue existe dans le cerveau humain.

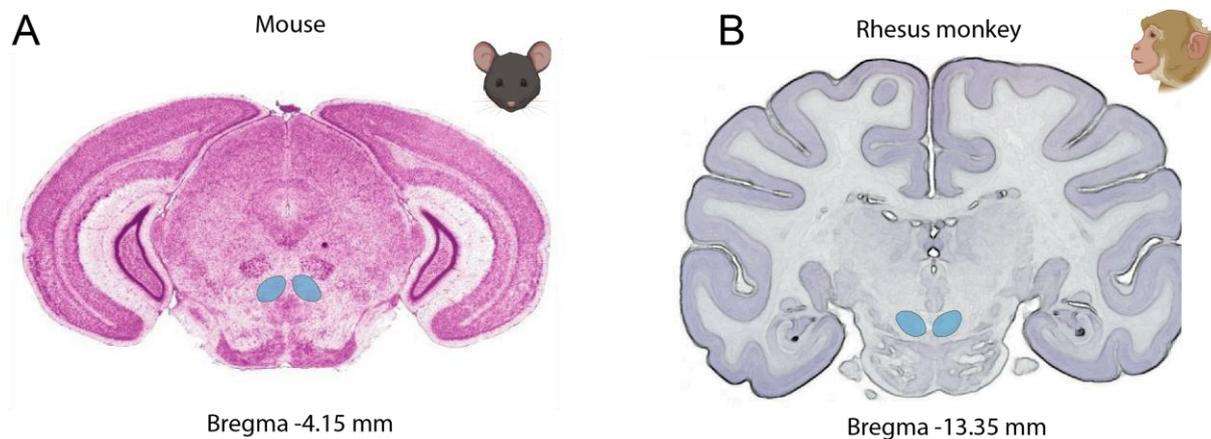


Figure 7 : Localisation neuroanatomique du RMTg chez la souris et le singe

A Coupe coronale d'un cerveau de souris, le RMTg (bleu) atteint sa taille maximale à bregma -4.15 mm. **B** Coupe coronale d'un cerveau de macaque rhésus, le RMTg (Bleu) a été identifié dans le cerveau du macaque rhésus à bregma -13.35 mm. Adaptée de Smith *et al.*,2019 ; Hong *et al.*,2011.

I-B : Premières observations du RMTg

Bien que la caractérisation neuroanatomique du RMTg ait été réalisée au cours des 20 dernières années, des études plus anciennes ont pu mettre en évidence la présence d'une structure mésencéphalique analogue au RMTg et recevant de nombreuses afférences en provenance de la LHb. Dans ce contexte, une étude sur la neuroanatomie des noyaux de la formation réticulée réalisée chez le chat a montré, grâce à l'injection d'un traceur antérograde dans la formation réticulée, la présence d'une région mésencéphalique postérieure qui envoie de nombreuses projections à la VTA (Graybiel, 1977). Plus tard, une étude réalisée chez le rat utilisant le même type de traceur antérograde, mais injecté cette fois dans la LHb, a montré des projections massives sur une structure mésencéphalique non identifiée, postérieure à la VTA, et proche du MRN (Herkenham & Nauta, 1979) dont la localisation et la délimitation correspondent parfaitement aux délimitations du RMTg (**Fig. 8**). Les auteurs ont initialement pensé que cette structure était une extension du noyau pédonculopontin (PPTg). Cependant, la densité des neurones au sein cette structure nouvellement identifiée était faible contrairement à ce qui était connu concernant le PPTg (Herkenham & Nauta, 1979).

Le RMTg sera aussi décrit en 1993 dans une étude qui avait pour but d'évaluer les effets d'une injection sous-cutanée de différentes doses de nicotine (0.1- 1.4 mg/kg) sur l'activation des neurones de la VTA par un immunomarquage dirigé contre la protéine c-Fos. Les résultats de cette étude ont montré que la nicotine était responsable d'une augmentation de l'expression de c-Fos dans « les neurones non dopaminergiques de la VTA », correspondant à priori au RMTg (Pang *et al.*, 1993). Une étude similaire évaluant les effets d'une injection en i.p de modafinil (75 mg/kg) sur l'expression de c-Fos chez le rat a montré une augmentation de l'expression de la protéine dans une région qualifiée de « rétro-VTA » et correspondant également au RMTg (Scammell *et al.*, 2000). Ainsi, ces études antérieures indiquent que le RMTg avait précédemment été identifié, mais associé à d'autres régions cérébrales déjà bien connues.

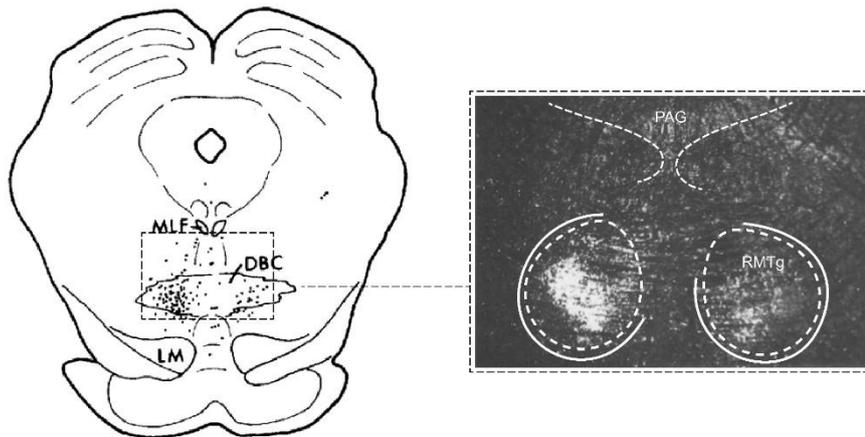


Figure 8: Première image du RMTg en 1979

Une étude neuroanatomique de traçage antérograde dans l'habénula latérale (LHb) chez le rat met en évidence une structure bilatérale proche du noyau du raphé médian (MRN). La localisation neuroanatomique (Image de gauche, ~ -6.80 mm du point bregma) et le grossissement après autoradiographie (Image de droite) confirment qu'il s'agit en réalité du RMTg. PAG : Periaqueductal-Gray-Area ; RMTg : Rostromedial tegmental nucleus ; MLF : Medial longitudinal fasciculus, DBC : Decussation of the tectum conjunctivum, LM : Medial Lemniscus. Adaptée de Herkenham & Nauta, 1979.

I-C : Caractéristiques cellulaires du RMTg

La première étude sur le RMTg montre que 92% des neurones de la structure expriment la protéine GAD (Glutamate décarboxylase) (Perroti *et al.*, 2005). Cependant, le RMTg est imbriqué dans la formation réticulée mésencéphalique (MRF), une région composée d'un réseau dense de neurones glutamatergiques et GABAergiques (Kirjavainen *et al.*, 2022). De ce fait, un marquage contre la GAD ou le transporteur vésiculaire du GABA (VGAT) ne permet pas de distinguer le RMTg des neurones GABAergiques environnant. Ceci rend la délimitation de la structure impossible sans avoir recours à un immunomarquage contre Δ Fos-B, après une administration répétée de psychostimulants. Des marqueurs spécifiques des neurones du RMTg ont été identifiés en 2019, facilitant ainsi son étude et sa délimitation. Dans une étude récente (Smith *et al.*, 2019), un séquençage ARN réalisé sur des cerveaux de rats montre la présence de 3 gènes fortement exprimés dans le RMTg, et pas ou peu exprimés dans la VTA : Le gène *Pnoc* codant pour la prépronociceptine (PNOC), le gène *gad1*, codant pour la GAD et le gène *FoxP1* (Forkhead-Box-Protein-1) codant

pour la protéine du même nom. L'utilisation de PNOC et FoxP1 comme marqueurs spécifiques des neurones du RMTg a été mise en évidence dans cette même étude. Un traçage rétrograde utilisant du CTB (sous unité de la toxine cholérique) injecté dans la VTA et une IHC de FoxP1 montre la présence d'une population de neurones positifs pour FoxP1 au-dessus du noyau interpedonculaire (IP), projetant à la VTA et qui s'étend de -6.00 à -7.00 mm par rapport au bregma. Une hybridation *in situ* dirigée contre l'ARN messenger (ARNm) de *Pnoc* permet d'obtenir le même résultat. De plus, l'IHC de FoxP1 et le marquage contre l'ARNm de *Pnoc* sont colocalisés avec d'autres marqueurs connus du RMTg tels que l'expression de *Gad67* et l'expression de c-Fos après injection de cocaïne. Une quantification des neurones exprimant FoxP1 ou *Pnoc* dans la région du RMTg chez le rat montre que 91% des neurones du RMTg expriment FoxP1 et 68% expriment *Pnoc*, faisant ainsi de FoxP1 le marqueur moléculaire actuel le plus spécifique de la structure. De manière intéressante, cette étude a mis en évidence que quelques neurones du RMTg (9%) n'expriment pas FoxP1. Les auteurs suggèrent que ces neurones n'exprimant pas FoxP1 ont un rôle particulier encore indéfini qui nécessite de plus amples études. Un autre marqueur du RMTg, le facteur de transcription Sox14 (SRY-Box-Transcription Factor 14), a également été identifié chez la souris (Lahti *et al.*,2016). En effet, une approche d'hybridation *in situ* a montré que Sox14 est coexprimé avec FoxP1 dans des neurones localisés dans la région du RMTg. En plus de leur signature moléculaire propre qui les différencie des neurones de la VTA, les neurones du RMTg peuvent être identifiés par leurs propriétés électrophysiologiques. En effet, les neurones GABAergiques de la VTA ont une fréquence de décharge faible allant jusqu'à 5 hertz (Margolis *et al.*,2012) tandis que l'analyse du profil électrophysiologique des neurones du RMTg mesuré *in vivo* montre que les neurones au sein de cette structure ont une fréquence de décharge avoisinant 20 hertz (Lecca *et al.*,2011 ; Jalabert *et al.*,2011).

II : Connectivité du RMTg

II-A : Afférences du RMTg

La caractérisation des afférences du RMTg chez le rat a été réalisée simultanément par deux études publiées en 2009 et dont les résultats sont quasiment identiques (Jhou *et al.*,2009a ; Kaufling *et al.*,2009). Dans ces deux études, les auteurs ont utilisé une approche de traçage rétrograde grâce aux fluorogold et à la CTB

Introduction

injectées directement dans le RMTg. Une comparaison avec l'étude neuroanatomique de la VTA réalisée également avec du fluorogold (Geisler & Zham, 2005) montre que les afférences du RMTg sont très similaires à celles de la VTA. Le RMTg reçoit notamment des afférences de la part du cortex prélimbique (PL), des colliculi supérieurs, de la Lhb, du LH, de la ZI, du DR, du PPTg, du LDTg, du locus coeruleus (LC) et de la substance grise périaqueducale (PAG) (**Fig.9A**). Selon l'étude réalisée par Kaufling *et al.*, l'amygdale ne projette pas au RMTg mais l'étude de Jhou *et al.* indique la présence de quelques neurones de l'amygdale projetant au RMTg. Cette différence pourrait être liée à une hétérogénéité de la localisation des sites d'injection des traceurs rétrogrades dans le RMTg, localisés à -6.3 mm par rapport au bregma dans la première étude et localisés plutôt autour de -6.7 mm par rapport au bregma dans la deuxième étude. Il est possible que le marquage se soit étendu à des structures localisées en arrière du RMTg comme la formation réticulée pontique qui reçoit des afférences de l'amygdale (Takeuchi *et al.*, 1988). Il existe également une différence concernant les afférences du RMTg entre le rat et la souris. Chez la souris, un traçage transsynaptique a montré que les neurones sérotoninergiques du DR projetaient de manière importante au RMTg (Zhao *et al.*, 2022), ce qui n'est pas le cas chez le rat (Kaufling *et al.*, 2009) (**Fig.9A**).

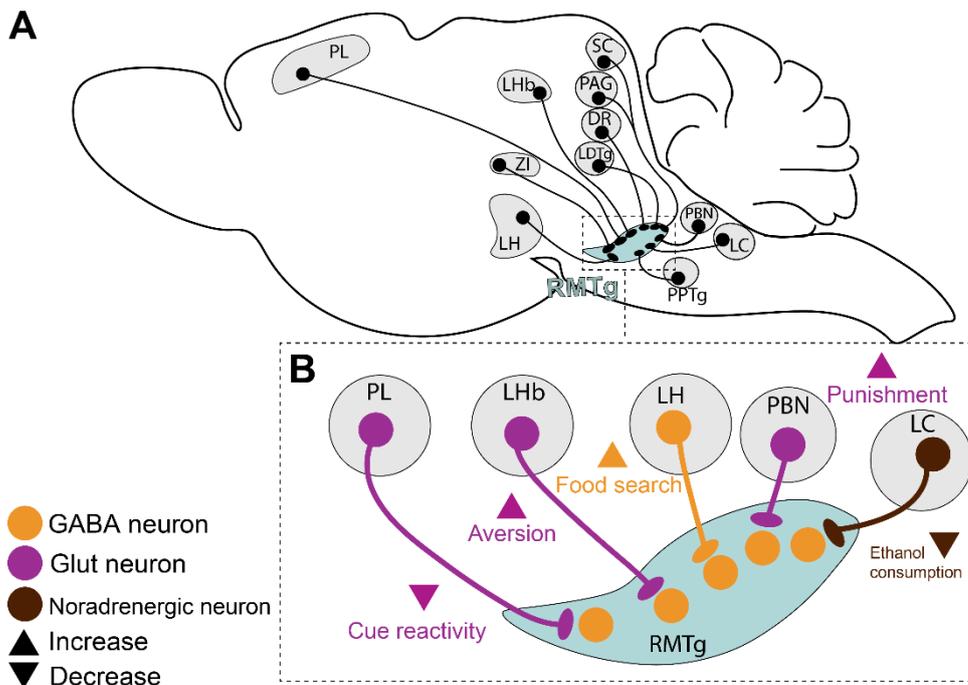


Figure 9 : Afférences du RMTg et leurs fonctions

A Le RMTg reçoit des afférences du noyau cortex prélimbique (PL), de l'hypothalamus latéral (LH), de la zonula incerta (ZI), de l'habénula latérale (LHb), des colliculi supérieurs (SC), de la substance grise périaqueducale (PAG), du noyau pedonculopontin (PPTg), du noyau raphé dorsal (DR), du noyau tegmental laterodorsal (LDTg), du noyau pédonculopontin (PPTg), du locus coeruleus (LC) et du noyau parabrachial pigmenté (PBN). **B** Les afférences glutamatergiques issues du PL inhibent la réactivité à des indices prédictifs d'une récompense/punition (Cruz *et al.*,2021, Li *et al.*,2019), celles de la LHb et du PBN modulent l'aversion et la punition (Hong *et al.*,2011, Laurent *et al.*,2017 ; Li *et al.*,2019). Le RMTg reçoit des projections GABAergiques du LH qui favorisent la recherche de nourriture (Godfrey *et al.*,2022) et noradrénergiques de la part du Locus Coeruleus (LC) qui inhibent la consommation d'éthanol (Dornellas *et al.*,2020).. Adaptée de Bourdy & Barrot, 2012.

II-B Efférences du RMTg

Les premières études sur les efférences du RMTg ont été réalisées par des approches de traçage antérograde via l'utilisation de traceurs comme la BDA (Amine dextrane biotinylée) ou la *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (PHA-L) injectés directement dans la structure afin de déterminer ses régions cibles. Ces études ont montré que le RMTg projette massivement à la VTA, à la SNc, au LH, au champ rétro-rubral (RRF) et dans une moindre mesure sur des structures comme la ZI, la PAG, le DR, le PPTg, le LDTg, le DS, et le NAc (Jhou *et al.*,2009a ; Kaufling *et al.*,2010 ; Bourdy et Barrot, 2012). La combinaison de ces études de traçage avec un immunomarquage contre la TH montre que les neurones du RMTg ciblent particulièrement les neurones dopaminergiques de la VTA et de la SNc, renforçant l'hypothèse d'une implication du RMTg dans les processus liés à la récompense et potentiellement dans la motricité.

De plus, l'identification du marqueur FoxP1 a permis de mettre en évidence que les projections du RMTg vers la SNc et la VTA sont dissociables l'une de l'autre. En effet, une injection de CTB et fluorogold dans la SNc et la VTA couplée à un immunomarquage contre FoxP1 montre que 55% des neurones du RMTg projettent à la VTA, 21% projettent à la SNc et seulement 8.6% des neurones du RMTg co-projettent à la VTA et à la SNc (Smith *et al.*,2019). Comme pour les afférences, peu d'études jusqu'à présent se sont intéressées spécifiquement aux fonctions des efférences du RMTg. En effet, la plupart des études sur le RMTg se basent sur une

Introduction

étude globale de la structure par une lésion excitotoxique (Jhou *et al.*,2009b ; Bourdy *et al.*,2014 ; Glover *et al.*,2019 , Sheth *et al.*,2016 ; Faivre *et al.*,2020 ; Yang *et al.*,2018). Cependant, quelques études récentes se sont intéressées au rôle spécifique des voies RMTg-VTA (Li *et al.*,2019 ; Weitz *et al.*,2021 ; Parrilla-Carrero *et al.*,2021), RMTg-SNc (Sun *et al.*,2020) et RMTg-LH/LTDg (Zhao *et al.*,2022) (**Fig.10**) (Li *et al.*, 2019 ; Weitz *et al.*,2021 ; Parilla-Carrero *et al.*,2021 ; Sun *et al.*,2020 ; Zhao *et al.*,2022). Ces études seront discutées plus en détail dans la partie sur les fonctions du RMTg (**Cf Chapitre 2 III-Implications fonctionnelles du RMTg**) et soulignent la connectivité importante qu'établit le RMTg avec des structures modulatrices de la récompense comme la VTA mais aussi avec des structures modulant les comportements homéostatiques comme le LH.

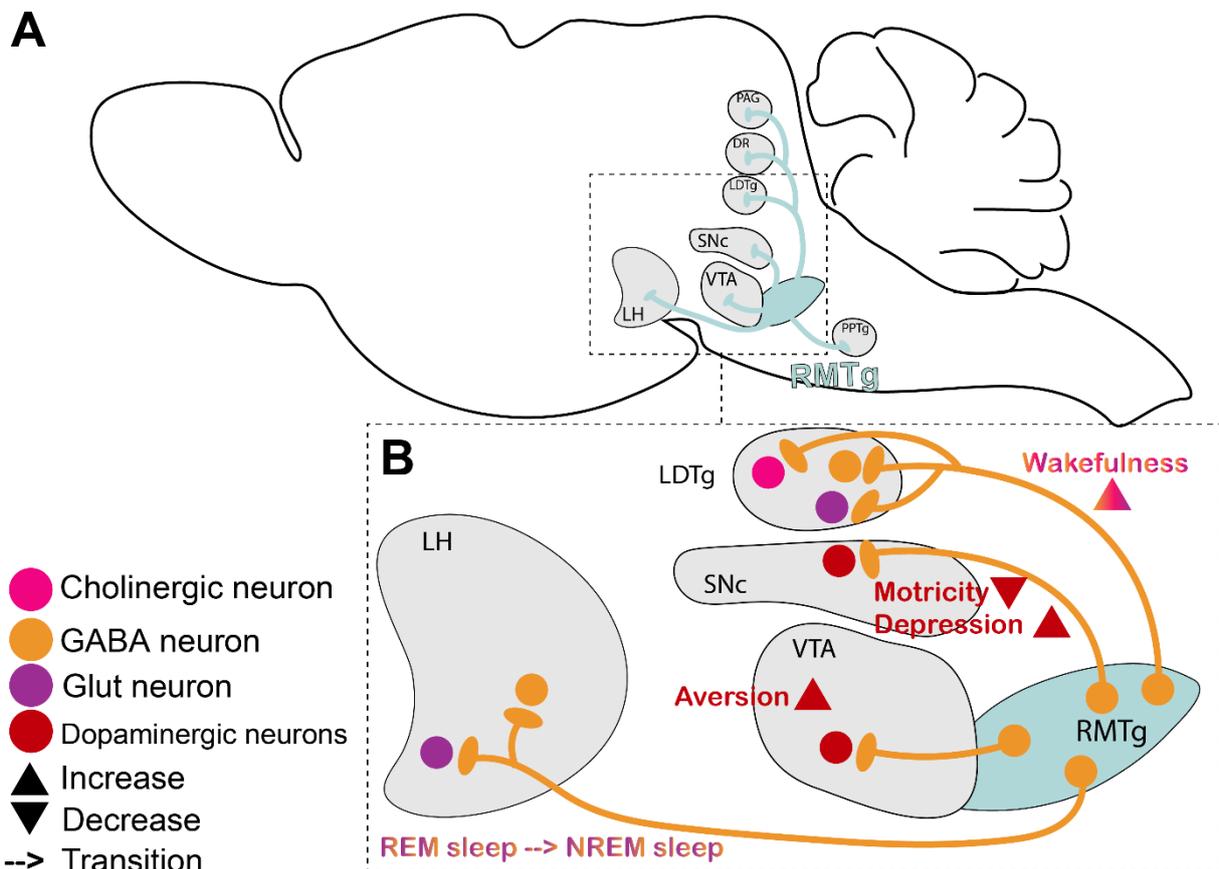


Figure 10 : Efférences du RMTg et leurs fonctions

A Le RMTg projette à l'aire tegmentale ventrale (VTA), l'hypothalamus latéral (LH), la substance noire compacte (SNc), le noyau tegmental latérodorsal (LDTg), le noyau pédonculopontin (PPTg), le raphé dorsal (DR) et la substance grise périaqueducale (PAG). **B** Les projections du RMTg vers les neurones dopaminergiques de la VTA ont un rôle dans l'attribution d'une valence aversive à un stimulus (Hao li *et al.*,2019a&b ; Weitz *et al.*,2021 ; Parilla-Carrero *et al.*,2021) tandis que les projections vers la SNc régulent la motricité et la dépression (Sun *et al.*,2020). Les projections du RMTg aux neurones glutamatergiques et GABAergiques du LH participent à la transition de la phase de sommeil REM (Rapid-Eye-Movement) à NREM (Non-Rapid-Eye-Movements). Les projections sur les neurones GABAergiques, cholinergiques et glutamatergiques du LDTg participent à l'éveil (Zhao *et al.*,2022). Adaptée de Bourdy & Barrot, 2012.

III : Implications fonctionnelles du RMTg

III-A : Réponse du RMTg aux drogues d'abus

III-A-1 : La réponse du RMTg à la cocaïne

La densité des projections du RMTg à la VTA pointe du doigt l'intérêt d'étudier cette structure dans la réponse aux drogues d'abus. Une étude de la réponse à la cocaïne a été menée dans la première étude sur le RMTg (Perrotti *et al.*,2005) puis cette caractérisation a été étoffée par les travaux de Lecca *et al.* Dans cette dernière étude, les auteurs ont montré par enregistrements *in vivo* des neurones du RMTg de rats anesthésiés que l'administration de cocaïne (1mg/kg en i.v) conduit pendant quelques minutes à une inhibition des neurones du RMTg sans modification de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de la VTA (Lecca *et al.*,2011 & 2012). Cet effet est probablement lié au fait que bien que la cocaïne soit capable d'inhiber les afférences GABAergiques des neurones dopaminergiques de la VTA, ce mode d'action reste minoritaire par rapport à son action principale consistant à bloquer les transporteurs de la dopamine sur les terminaisons dopaminergiques (Steffensen *et al.*,2008). Une analyse plus précise de l'activité des neurones du RMTg suite à l'administration de cocaïne chez l'animal vigile a été menée par imagerie calcique (Li

et al.,2019). Les résultats montrent que la cocaïne inhibe les neurones du RMTg pendant les 15 premières minutes, c'est la « phase initiale », puis conduit à une activation de ces neurones après 15 minutes, c'est la « phase de rebond » (**Fig.11**). Une analyse par corrélation montre que les neurones activés pendant la phase initiale sont les mêmes que ceux activés par l'indice prédictif de l'obtention d'une récompense dans un protocole opérant. Les neurones activés pendant la phase de rebond sont les mêmes que ceux activés par l'indice prédictif du déclenchement d'un choc électrique. Ceci suggère que la réponse à la cocaïne est initialement récompensante mais devient aversive après 15 minutes (Li *et al.*,2019). Cet effet coïncide avec une étude dans laquelle un conditionnement de préférence de place montre que la cocaïne est récompensante 5 à 15 minutes après l'injection puis devient aversive au-delà de 15 minutes (Ettenberg *et al.*,1999). Cela pourrait expliquer pourquoi la cocaïne conduit à une expression de c-Fos et Δ FosB dans le RMTg (Geisler & Zahm, 2008 ; Jhou *et al.*,2009a/b ; Lecca *et al.*, 2011&2012), contrairement à d'autres drogues telles que la morphine où l'injection en sous cutanée à dose croissante (10 mg/kg à 120 mg/kg) pendant dix jours ne conduit pas à l'induction de Δ FosB (Perrotti *et al.*,2005) supposant que l'induction de ces protéines Fos serait liée à l'effet aversif de la substance (**Fig.11**). Cet aspect aversif semble être principalement médié par la voie RMTg-VTA. En effet, chez le rat, une activation de cette voie par des outils optogénétiques pendant la phase d'acquisition d'un conditionnement de place à la cocaïne inhibe complètement l'effet récompensant de la substance (**Fig. 10B** ; Weitz *et al.*,2021). De plus, des expériences d'électrophysiologie *in vivo* montrent une hyperactivité de cette voie chez des rats ayant une aversion à la cocaïne (Parilla-Carero *et al.*,2021).

III-A-2 : La réponse du RMTg aux opiacés

Des études d'électrophysiologie *in vivo* sur rats anesthésiés et des mesures en patch-clamp montrent que l'administration de morphine (4 mg/kg en i.v en *in vivo* et bain de 3 μ M en *in vitro*) provoque une inhibition des neurones du RMTg, ce qui induit une augmentation de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques (Lecca *et al.*,2011 & 2012, Jalabert *et al.*,2011). Cet effet est bloqué lors d'une co-administration de Naloxone (0.1 mg/kg en i.v), un antagoniste opiacé, suggérant la présence de récepteurs opioïde μ dans le RMTg. C'est principalement en inhibant les neurones du RMTg que la morphine (1mg/kg, i.v) conduit à une libération plus

importante de dopamine puisqu'une injection de muscimol dans le RMTg, déconnectant le RMTg de la VTA, bloque l'effet excitateur de la morphine sur les neurones dopaminergiques de la VTA (Jalabert *et al.*,2011). Il semblerait que le RMTg soit également impliqué dans les effets de tolérance aux opiacés. En effet, la capacité de la morphine à désinhiber les neurones dopaminergiques de la VTA en agissant sur le RMTg est abolie chez des rats exposés chroniquement à la morphine (Kaufling & Aston-Jones, 2015) (**Fig.11**).

III-A-3 : Réponse du RMTg aux cannabinoïdes

Le récepteur Cannabinoïde 1 (CB1) est l'un des deux récepteurs de l'ECS (**Cf : Chapitre 3 I-A-2 Identification des récepteurs cannabinoïdes**). Ce récepteur est présent largement sur les terminaisons présynaptiques et la liaison d'un agoniste avec CB1 conduit à une diminution de la libération de neurotransmetteurs (Vaughan & Christie, 2005). Une administration de WIN55212-2 (WIN) (i.v, 0.5 mg/kg), un agoniste du récepteur CB1, conduit à une diminution de la fréquence de décharge des neurones du RMTg stimulés électriquement (1Hz) et conduit par conséquent à une activation des neurones dopaminergiques de la VTA (Lecca *et al.*,2011 & 2012). Des données d'immunofluorescences (Melis *et al.*,2014) dirigées contre le récepteur CB1 ont confirmé la présence de ce récepteur sur les terminaisons du RMTg au sein de la VTA. De plus, des enregistrements en électrophysiologie *ex-vivo* sur tranches de VTA ont montré que la signalisation rétrograde du 2-AG (2-arachydonoyglycerol), un cannabinoïde endogène agoniste de CB1, conduisait à une augmentation de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de la VTA, via une inhibition locale des terminaisons du RMTg (**Fig.11** ; Melis *et al.*,2014). Cette même étude a montré que cette signalisation cannabinoïde est plus importante dans une souche de rats présentant une préférence innée à l'alcool, suggérant un rôle de l'ECS dans le RMTg dans les processus de traitement de la récompense (Melis *et al.*,2014).

III-A-4 : La réponse du RMTg à l'éthanol

Contrairement à la morphine ou aux agonistes CB1, la désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA par l'action de l'éthanol sur le RMTg n'a pas encore été mise en évidence (**Fig.11**). Il est même suggéré que l'éthanol n'agirait pas sur le RMTg puisqu'une micro-injection dans cette structure ne conduit pas à une augmentation de l'activité locomotrice des rats, interprétée selon les auteurs de cette étude comme l'absence d'une désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA

(Esposito-Zapero *et al.*,2023). Cependant, une lésion excitotoxique du RMTg conduit à une augmentation de la consommation d'éthanol dans un protocole d'accès intermittent où les rats ont accès à la solution d'éthanol 20% pendant 24h trois jours par semaine. Dans cette même étude, il est montré qu'une lésion excitotoxique du RMTg n'affecte pas la motivation des rats à obtenir de l'éthanol dans une tâche de comportement opérant, suggérant que le RMTg modulerait la consommation d'éthanol en jouant sur une diminution de l'aversion plutôt que sur une augmentation de la motivation (**Fig.11**, Sheth *et al.*,2016).

Cet effet aversif de l'éthanol est discuté par Glover *et al.* dans une tâche d'aversion gustative où la consommation d'une solution de saccharine est associée à une injection i.p. d'éthanol, conduisant à une aversion pour la saccharine. Une analyse histologique montre alors que les rats ayant subi ce test d'aversion conditionnée montrent une expression de c-Fos plus importante dans le RMTg et la LHb, renforçant l'hypothèse du rôle du RMTg dans l'intégration des propriétés aversives de l'éthanol (Glover *et al.*,2016). Récemment, il a été montré qu'il s'agirait de la projection du LC vers le RMTg qui intégrerait cet aspect aversif de l'éthanol puisqu'une activation spécifique de cette voie par des outils pharmacogénétiques conduit à une réduction du comportement de « binge-drinking » et de la consommation globale d'éthanol. De plus, l'activation spécifique de cette voie provoque une sensation de « mal être » chez la souris, se traduisant par un nombre de vocalisations et de secouages de la tête plus important (**Fig.11**, Dornellas *et al.*,2021). En plus de moduler l'aspect aversif de la substance, le RMTg semble mis en cause lors du sevrage à l'éthanol. En effet, on note une induction importante de c-Fos chez des rats placés pendant 14 jours dans un protocole d'exposition à des vapeurs d'éthanol puis mis en sevrage (Nentwig *et al.*,2021 ; Glover *et al.*,2019). L'inhibition du RMTg par injection locale de muscimol pendant cette abstinence forcée diminue le phénotype d'anxiété chez le rat (Glover *et al.*,2019). Ainsi, le RMTg serait impliqué dans les comportements de sevrage des substances addictives.

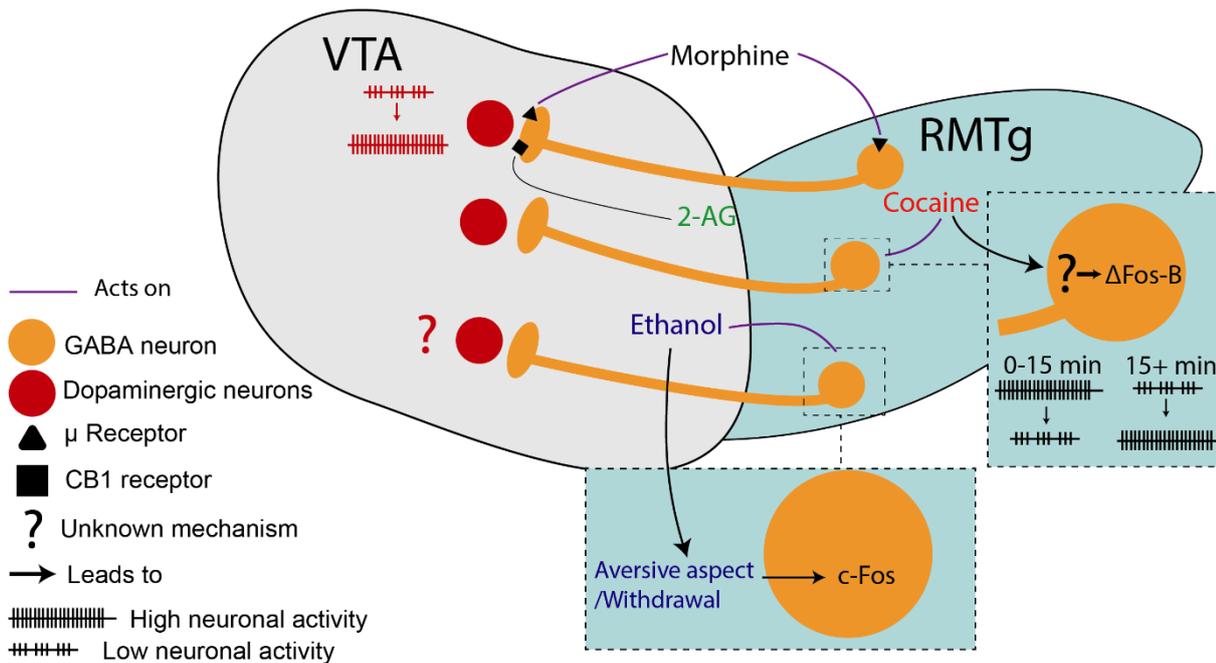


Figure 11 : Rôle du RMTg dans la réponse aux drogues

La morphine agit sur les récepteurs opioïdes μ localisés sur le soma et les terminaisons des neurones du noyau tegmental rostromédian (RMTg) projetant à l'aire tegmentale ventrale (VTA). Elle augmente ainsi l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA par un mécanisme de désinhibition. Les cannabinoïdes endogènes comme le 2-arachydonoyglycerol (2-AG) désinhibent également les neurones de la VTA en agissant sur les récepteurs CB1 présents sur les terminaisons de la voie RMTg-VTA. La cocaïne a deux modes d'action sur les neurones du RMTg ; elle diminue l'activité de ces neurones entre 0-15 minutes après l'administration et augmente l'activité des neurones du RMTg au-delà de 15 minutes. L'administration de cocaïne conduit également à une augmentation de l'expression de Δ Fos-B dans les neurones du RMTg bien que le mécanisme biomoléculaire sous-jacent reste encore inconnu. L'action de l'éthanol sur la voie RMTg-VTA n'a pas encore été caractérisée mais les propriétés aversives de l'éthanol ainsi que le sevrage à la substance après une administration chronique conduisent à une expression de c-Fos dans les neurones du RMTg. Adaptée de Bourdy & Barrot, 2012.

III-B : Rôle du RMTg dans la motricité

Une des premières études fonctionnelles sur le RMTg chez le rat a montré qu'une lésion excitotoxique de cette structure induit une diminution du freezing face à une odeur de prédateur et augmente le nombre d'entrées dans les branches ouvertes d'un labyrinthe en croix surélevé (Jhou *et al.*,2009b). Ces observations peuvent être interprétées comme une diminution du comportement anxieux/d'évitement face à une situation aversive mais il pourrait également s'agir d'une hyperactivité locomotrice. Par la suite, une étude du même groupe a montré qu'une inhibition du RMTg par des outils optogénétiques conduisait à une augmentation de l'activité locomotrice des rats (Jhou *et al.*,2013). Les mêmes effets ont été observés en réponse à une administration de muscimol (2µM/µL) directement dans le RMTg. De manière opposée, l'administration dans le RMTg (0.3 mg/ml) d'un antagoniste des récepteurs GABA-A, la bicuculine, conduit à une diminution de l'activité motrice (Lavezzi *et al.*,2015). Le rôle du RMTg dans la motricité a également été étudié dans le cadre sur son action inhibitrice sur la SNc (Bourdy *et al.*,2014). Dans cette étude, il est montré par un double traçage BDA/CTB la présence d'un circuit RMTg-SNc-DS. Un enregistrement en électrophysiologie *in vivo* montre que la stimulation des neurones du RMTg conduit à une inhibition de la fréquence des neurones dopaminergiques de la SNc et qu'à l'inverse, une micro-injection de muscimol dans le RMTg conduit à une augmentation de la fréquence de décharge de ces mêmes neurones. De plus, une lésion excitotoxique bilatérale du RMTg conduit à une augmentation de l'activité locomotrice et améliore la coordination motrice des rats, phénomène observé dans le test du rotarod. Au contraire, la lésion du DS conduit à des performances réduites dans le test du rotarod, indiquant que l'amélioration des performances motrices suite à la lésion du RMTg proviendrait d'une augmentation de la transmission dopaminergique de la SNc au DS. Le rôle du RMTg dans le contrôle moteur a ensuite été étudié dans un modèle de maladie de Parkinson dans lequel une lésion de la SNc par injection de 6-OHDA conduit initialement à une diminution des performances motrices, une perte de poids et une diminution de la préférence au saccharose. Cependant, chez des rats avec une double lésion SNc/RMTg, les symptômes moteurs et non moteurs associés à la maladie de Parkinson sont compensés (Faivre *et al.*,2020). En raison de sa connectivité importante avec la VTA, il est alors envisagé que cette modulation de la

motricité puisse être une manière pour le RMTg de réguler le comportement d'approche/évitement face à un stimulus récompensant/aversif.

III-C : Rôle du RMTg dans le phénotype dépressif et le stress

Les travaux récents sur le RMTg soulignent son rôle dans la physiopathologie de troubles psychiatriques autres que l'abus de substances. En effet, une lésion excitotoxique du RMTg prévient le développement d'un phénotype de dépression dans un protocole de résignation apprise (Elmer *et al.*,2019). Cet effet pourrait être médié par la voie RMTg-SNc. En effet, la photostimulation de cette voie conduit à une augmentation du temps d'immobilité de la souris dans le test de la nage forcée sans pour autant affecter la performance motrice dans le « pole climbing test » où le temps que met une souris pour descendre une barre verticale est chronométré. Au contraire, une inhibition optogénétique de cette voie conduit à un temps d'immobilité plus faible dans le test de la nage forcée, et ceci même chez des souris ayant préalablement subi un stress de contention (**Fig. 10B**, Sun *et al.*,2020), soulignant un potentiel double rôle pour la voie RMTg-SNc, à la fois dans la régulation de la motricité et dans les comportements anxiodépressifs. La voie RMTg-VTA est également suspectée comme étant impliquée dans la physiopathologie de la schizophrénie. En effet, dans un modèle de schizophrénie chez le rat, on observe une diminution de la densité des épines dendritiques sur les neurones dopaminergiques de la VTA qui reçoivent des afférences du RMTg (Seo *et al.*,2021). L'ensemble de ces études suggère un rôle important du RMTg dans le développement de troubles psychiatriques.

III-D : Rôle du RMTg dans la nociception

Le RMTg étant inhibé par les agonistes des récepteurs μ et recevant des afférences de la PAG, il constitue une cible intéressante dans l'étude de la nociception. Les premières études sur le RMTg ont montré qu'un stimulus nociceptif tel que le pincement de la patte induit une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du RMTg et une inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA (Lecca *et al.*,2011&2012), suggérant que le RMTg intégrerait les signaux nociceptifs. L'administration de morphine directement dans le RMTg de souris présentant une inflammation d'une patte, produit un effet antinociceptif traduit par une latence de retrait de la patte plus importante dans le test de Hargreaves. Cet effet est d'ailleurs

reproduit avec une inhibition des neurones du RMTg par des outils pharmacogénétiques, tandis que l'activation produit au contraire un retrait de la patte plus précoce (Taylor *et al.*, 2019). De plus, cette étude est la première à s'être intéressée aux conséquences d'une modulation du RMTg sur la libération de dopamine dans les structures effectrices du circuit de la récompense. En effet, la mesure de la libération de dopamine par voltamétrie a permis de montrer que la stimulation des neurones du RMTg conduisait à une diminution de la libération de dopamine dans le NAc.

III-E : Rôle du RMTg dans l'erreur de prédiction et l'aversion

Les neurones dopaminergiques de la VTA ont un rôle dans l'erreur de prédiction en permettant l'encodage d'une différence entre une récompense prédite et une récompense obtenue. Quand l'individu est présenté avec une récompense meilleure que celle prédite, la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de la VTA augmente transitoirement. On parle dans ce cas d'une « erreur de prédiction positive », qui conduit à un renforcement des séquences d'actions nécessaires à l'obtention de la récompense. À l'inverse, lorsque la récompense obtenue est moins plaisante que celle qui était attendue par rapport aux expériences passées, la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques diminue transitoirement. On parle dans ce cas d'une erreur de prédiction négative, qui conduit à un désintérêt pour la récompense et à une suppression des séquences d'actions conduisant à la récompense dans l'avenir. Ce principe s'applique également aux indices environnementaux prédisant une récompense et permet l'attribution d'une valeur récompensante ou punitive à un stimulus ou aux indices environnementaux associés (Bromberg-Martin, 2010, Schultz *et al.*, 1997) et le RMTg joue un rôle crucial dans ce mécanisme. En effet, l'inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA par le RMTg serait importante dans l'erreur de prédiction négative. La LHb est une des structures clefs impliquées dans la transmission des signaux relatifs à l'erreur de prédiction aux neurones dopaminergiques. Elle est activée par les stimuli prédisant l'absence de survenue d'une récompense et est inhibée par les stimuli prédisant la survenue d'une récompense (Matsumoto & Hikosaka, 2007). De manière intéressante, l'inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA par la LHb dans le cas de l'erreur de prédiction négative passe essentiellement par une activation des neurones du

RMTg, comme cela a été notamment montré chez le primate non humain. En effet, une étude réalisée chez le Macaque Rhésus montre que les neurones de la LHB projettent vers une structure mésencéphalique qui à son tour inhibe les neurones dopaminergiques de la VTA : le RMTg (Hong *et al.*,2011). Dans cette étude, des enregistrements d'électrophysiologie *in vivo* montrent que les neurones du RMTg sont inhibés par des indices prédisant l'obtention d'une récompense et sont activés quand une récompense prédite n'est pas obtenue, correspondant à l'encodage d'une erreur de prédiction négative. L'importance de la voie LHB-RMTg dans ces processus a été étudiée de manière plus approfondie chez le rat. Une lésion spécifique de cette voie a été réalisée par l'utilisation d'une combinaison de deux vecteurs viraux (Laurent *et al.*,2017). Pour cela, un AAV rétrograde exprimant la Cre-recombinase a été injecté dans le RMTg et un AAV exprimant la Caspase-3 floxée a été injecté dans la LHB, permettant l'ablation des neurones de la LHB projetant au RMTg par apoptose. Les rats ont ensuite été soumis à un protocole de conditionnement opérant. Dans ce protocole, des rats sont placés dans une boîte opérante avec deux leviers. Les animaux sont conditionnés afin d'associer la présence d'un son « A » suivi de l'appui sur levier « 1 » avec la non-délivrance d'une récompense. Chez des rats contrôles, la présence du son « A » va conduire à un appui sur le levier « 2 » afin d'éviter la « punition » d'une absence de récompense. Or, des rats lésés pour la voie LHB-RMTg ne font pas de discrimination entre le levier 1 et le levier 2 montrant ainsi une altération de l'encodage de l'erreur de prédiction négative.

De plus, les afférences du RMTg provenant du PL et du PBN semblent également avoir un rôle dans l'intégration des stimuli aversifs. Des données obtenues par une approche d'électrophysiologie *in vivo* montrent que les neurones du RMTg sont activés en réponse à la présentation d'un indice prédisant l'arrivée d'un choc électrique et également par le choc électrique en lui-même. Dans cette procédure, une inhibition de la voie PL-RMTg par des outils optogénétiques bloque l'activation du RMTg pendant la présentation de l'indice (Li *et al.*,2019b), montrant le rôle de cette voie dans l'intégration des indices qui annoncent l'arrivée d'un choc électrique. Dans cette même étude, il est montré que cette voie est inhibée par un indice prédisant l'obtention d'une récompense, expliquant ainsi comment une déconnexion de la voie PL-RMTg réalisée avec une injection de baclofène/muscimol (1mM/0.1mM dans 0.3 μ L) dans le PL et une administration d'un antagoniste AMPA (1mM dans 0.3 μ L) dans le RMTg conduisent à une augmentation de la réactivité des rats face à un indice prédisant

l'obtention de cocaïne (Cruz *et al.*,2020). La voie PBN-RMTg elle semble impliquée dans l'encodage de la présentation d'un stimulus aversif. En effet, chez des rats contrôles, la présentation d'un choc électrique, prédit ou non, conduit à une augmentation brusque de la fréquence de décharge des neurones du RMTg au moment précis de la présentation du choc. Cette augmentation de l'activité des neurones du RMTg lors d'un choc électrique est partiellement abolie par une inhibition de la voie PBN-RMTg au moment du choc (Li *et al.*,2019).

III-F : Rôle du RMTg dans la régulation du cycle veille sommeil

Le RMTg recevant des afférences du LC, du DR et projetant sur le LH et la VTA, structures largement impliquées dans la régulation du cycle veille-sommeil (Monti, 2011 ; Van Egroo *et al.*,2022 ; Bonnavion *et al.*,2016, Eban-Rothschild *et al.*,2016), il est possible que le RMTg ait un rôle régulateur du cycle veille-sommeil. La première étude sur le RMTg dans cette fonction montre qu'une activation pharmacogénétique des neurones de la structure augmente le temps passé dans la phase de sommeil NREM (Phase de sommeil lent, Non rapid Eye Movements), une phase du sommeil importante dans la consolidation mnésique et dont le passage est perturbé chez des patients souffrants d'un trouble d'abus de substances (Roehrs, 2015). Cet effet est reproduit avec une inhibition optogénétique des neurones dopaminergiques de la VTA et de la SNc, pointant un rôle éventuel de la voie RMTg-VTA ou RMTg-SNc dans la modulation du cycle veille-sommeil. Cette étude envisage que l'abus de substance pourrait conduire à une dérégulation des cycles veille-sommeil par une altération de la fonction des voies RMTg-VTA ou RMTg-SNc (Yang *et al.*,2018). Une autre étude a mis en évidence, par une approche de traçage antérograde, que les neurones GABAergiques du RMTg projettent sur les neurones cholinergiques, GABAergiques et glutamatergiques du LTDg ainsi que sur les neurones glutamatergiques et GABAergiques du LH. La stimulation optogénétique de la voie RMTg-LDTg favorise l'éveil (**Fig.10B**) tandis que la stimulation des efférences du RMTg sur les neurones glutamatergiques du LH favorise le passage de la phase de sommeil REM à NREM (**Fig. 10B**, Zhao *et al.*,2022). Cette étude est la première à s'intéresser à la fonction des projections du RMTg sur le LH. D'un point de vue neuroanatomique, elle montre que les neurones du RMTg ciblent notamment les neurones GABAergiques et glutamatergiques du LH, récemment étudiés dans la prise alimentaire (Nieh *et*

al.,2015 ; Jennings *et al.*,2013) et suggère une implication des neurones orexinergiques, neurones également impliqués dans la prise alimentaire (Bonnavion *et al.*,2016).

IV : Rôle potentiel du RMTg dans la régulation de la prise alimentaire

IV-A : Indices suggérant un rôle du RMTg dans la prise alimentaire

Jusqu'à présent, nous avons vu que le RMTg est une région inhibitrice du circuit de la récompense, impliquée notamment dans la consommation de nourriture palatable, et qu'il projette vers des neurones du LH qui régulent la prise alimentaire. Cependant, très peu d'études se sont intéressées au rôle du RMTg dans ce comportement. Initialement, il a été montré que la restriction alimentaire (rats rendus à 85% de leur poids initial) induisait une expression de c-Fos dans les neurones du RMTg projetant à la VTA (Jhou *et al.*,2009b). Cet effet peut être interprété comme une activation des neurones du RMTg dans l'intégration de stimuli aversifs comme décrit précédemment mais il est également possible que l'expression de c-Fos soit le fruit d'une implication de la structure dans la régulation de la prise alimentaire. Cependant, le résultat de cette étude a été remis en question par une publication récente qui a montré que ce n'est pas la restriction alimentaire qui conduit à une induction de c-Fos dans le RMTg, mais plutôt la non-obtention de nourriture initialement prédite, soulignant que ce serait l'erreur de prédiction négative qui induirait l'expression de c-Fos dans le RMTg (Sánchez-Catalán *et al.*,2022). L'imprécision du protocole utilisé dans l'étude de Jhou *et al.*, notamment sur la durée de la restriction alimentaire, peut être à l'origine de cette discordance de résultat. Dans l'étude de Sánchez-Catalán *et al.*, la restriction alimentaire est maintenue pendant 7-8 jours, durée relativement courte qui pourrait ne pas avoir suffi pour avoir un effet visible sur l'expression de c-Fos dans le RMTg. De plus, deux études déjà discutées sur le RMTg ont montré qu'une lésion excitotoxique de la structure où une activation spécifique de la voie LC-RMTg n'affecte pas la consommation d'eau sucrée (Faivre *et al.*,2020, Dornellas *et al.*,2021). Cependant, dans ces études, l'accès à la solution s'est fait pendant un temps court (<2h) et les auteurs n'ont pas évalué l'effet chronique de la lésion ou de la stimulation sur la prise de nourriture.

La première étude à s'être focalisée sur la modulation de la prise alimentaire par le RMTg montre qu'une stimulation à basse fréquence du RMTg par une approche de

stimulation cérébrale profonde (DBS) conduit à une réduction de la prise alimentaire standard sans affecter la consommation de saccharose dans un test de préférence (Melse *et al.*,2016). Les résultats de cette étude doivent être cependant considérés avec prudence. En effet, les auteurs suggèrent que le protocole de stimulation utilisé n'était peut-être pas adéquat dans leur expérience et le site de placement des électrodes semble trop haut suggérant une potentielle stimulation des régions adjacentes au RMTg. Une étude sur la voie LH-RMTg montre par une approche de traçage antérograde la présence d'une projection monosynaptique entre les neurones GABA du LH et les neurones GABA du RMTg (Godfrey *et al.*,2022). Dans le cadre d'une déprivation alimentaire pendant quelques heures, l'inhibition du RMTg par ces afférences GABAergiques est toujours présente mais considérablement réduite. Les auteurs envisagent que la réduction de l'inhibition de la voie LH-RMTg pourrait être un mécanisme d'adaptation face à une restriction alimentaire mais le maintien de cette inhibition aurait pour rôle de favoriser le comportement de recherche de nourriture par désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA.

IV-B : Résultats préliminaires : Une lésion excitotoxique du RMTg affecte la consommation de nourriture palatable

Des données préliminaires obtenues au sein de notre laboratoire ont montré qu'une lésion excitotoxique du RMTg chez le rat conduisait à une réduction de l'anxiété et à une augmentation de l'activité locomotrice comme cela avait été décrit précédemment suite à des études de lésion/inhibition de la structure (Elmer *et al.*,2019, Lavezzi *et al.*,2015). Lors de l'exposition des rats à un régime obésogène de type fCHFHS (free choice high fat high sugar, La Fleur *et al.*,2010 ; Bourdy *et al.*,2021) les animaux ayant subi une lésion du RMTg présentaient une consommation de gras plus importante ainsi qu'une consommation réduite de saccharose en comparaison avec les animaux contrôles. Cette expérience indique un rôle potentiel du RMTg dans la régulation de la consommation de nourriture palatable. Cependant, la non-spécificité de la lésion excitotoxique et l'hyperactivité locomotrice observée rendait difficile l'interprétation des résultats en lien avec la prise alimentaire. De plus, ces données ne permettaient pas d'identifier les voies à l'origine du phénotype observé (voie RMTg-VTA ou voie RMTg-LH). De ce fait, une étude plus précise de la contribution relative de chacune de ces voies dans la prise alimentaire hédonique est nécessaire.

Chapitre 3 : Le système endocannabinoïde

I : Éléments du système endocannabinoïde

I-A : Découverte du système endocannabinoïde

I-A-1 : Identification du composé psychoactif principal du cannabis : Le THC

La nomenclature « système endocannabinoïde » provient de la capacité de liaison des récepteurs de ce système avec le phytocannabinoïde Δ^9 - tétrahydrocannabinol (THC), molécule issue de la plante *Cannabis Sativa*. Les premières utilisations du cannabis remontent au moins à -11 000 av. J.-C avec son utilisation dans la confection de tissu. La réelle indication de la première utilisation du cannabis pour ses propriétés psychoactives remonte à -750 av. J.-C avec la découverte d'une tombe d'un probable shaman portant sur lui près de 800g de cannabis issu d'une variété probablement cultivée pour sa richesse en THC (Crocq, 2020). La structure du THC a été identifiée pour la première fois par chromatographie en 1964 sur des échantillons de hachich saisis par la police (Gaoni & Mechoulam, 1964). Par la suite, les effets psychoactifs et l'aspect addictif du THC ont été largement caractérisés chez le rat, le chien et le singe (Justinova *et al.*, 2005) par des protocoles d'auto-administration chronique par inhalation, consommation ou injection. Ces propriétés sont dues à l'action du THC sur l'ECS, un système moléculaire impliqué dans divers mécanismes physiologiques tels que le sommeil (Kesner & Lovinger, 2020) la mémoire (Kruk-Slomka, *et al.*, 2017), la régulation de l'humeur (Micale *et al.*, 2012), la prise alimentaire (Cristino *et al.*, 2014) et dans la récompense (Spanagel *et al.*, 2020). Ce système moléculaire est phylogénétiquement très conservé, présent à la fois dans les plantes de la famille *Arabidopsis* (Shrestha *et al.*, 2003), chez les invertébrés, notamment chez la *Ciona* (Elphick *et al.*, 2003) et chez les vertébrés (Elphick & Ergetova, 2005).

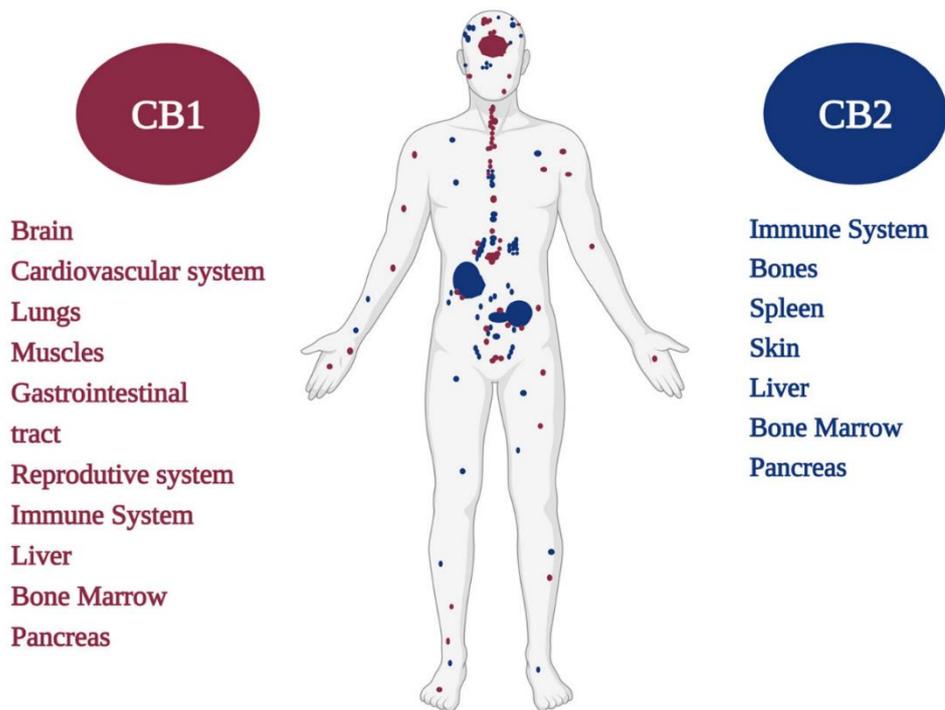


Figure 12 : Localisation et distribution des récepteurs CB1 et CB2 dans le corps humain. Le récepteur CB1 (Points rouges) et CB2 (Points bleus) sont tous les deux présents dans le système nerveux central et la périphérie. La densité des récepteurs est représentée par la taille des points et montre ainsi que le récepteur CB1 est très largement présent dans le système nerveux central tandis que le récepteur CB2 est plus exprimé dans la périphérie. Extrait de Rezende *et al.*, 2023.

I-A-2 : Identification des récepteurs du système endocannabinoïde

C'est pendant la période comprise entre 1988 et 1995 que les principaux éléments de l'ECS ont été caractérisés. En effet, le premier récepteur endogène, le « Cannabinoid Receptor 1 » (CB1) est identifié lors d'une étude de liaison d'un cannabinoïde de synthèse analogue au THC et présentant une forte affinité au récepteur, le CP-55,940 (K_i : 0,5-9 nM ; Devane *et al.*, 1988) sur des préparations de membranes de cerveaux de rats (Devane *et al.*, 1988). Le gène *Cnr1* codant pour ce récepteur sera identifié par clonage deux ans plus tard (Matsuda *et al.*, 1990). Le second récepteur endocannabinoïde « Cannabinoid Receptor 2 » (CB2) sera identifié en 1993, également par clonage (Munro *et al.*, 1993). CB1 et CB2 sont les deux principaux récepteurs de l'ECS. Tous deux sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines Gi/o (Glass & Northup 1999). La liaison d'un agoniste à ces récepteurs conduit à une inhibition l'activité de l'adénylate cyclase,

l'inhibition de l'influx calcique et la stimulation des canaux potassiques rectifiant entrants (Ibsen *et al.*,2017). Les récepteurs CB1 et CB2 présentent 48% d'homologie entre eux (Howlet *et al.*,2002) et sont exprimés au sein du système nerveux central et dans la périphérie (**Fig.12**). Ces deux récepteurs présentent une forte affinité pour le THC (CB1 : 5.05–80.3 nM. CB2 : 2010, 3.13-75.3 nM, Pertwee *et al.*,2010, **Fig.15**) Le récepteur CB1 est le récepteur couplé aux protéines G le plus exprimé dans le cerveau chez l'Homme (Marsicano & Lutz, 1999).

Il est principalement retrouvé sur les terminaisons synaptiques des neurones (Eraso-Pichot *et al.*,2022). Une série d'études en autoradiographies et immunohistochimies réalisées chez le singe, le chien, le rat et le cobaye montre une très forte expression de ce récepteur dans des structures comme la SNr, le globus pallidus, le CPU, l'HPC, le thalamus, l'HPC l'hypothalamus, le PFC, le cervelet, l'amygdale, la PAG , le bulbe olfactif ainsi que la VTA et plus récemment le RMTg (**Fig.13**, Elphick & Egertova, 2000, Herkenham *et al.*,1990 & 1992 ; Glass *et al.*,1997 ; Lecca *et al.*,2011 ; Melis *et al.*,2014). Cela suggère son implication dans les processus liés à la mémoire, la nociception ainsi que la récompense et les comportements motivés. Le récepteur CB1 est également présent dans la périphérie, notamment dans le tissu adipeux blanc où son activation permet la métabolisation du glucose et la synthèse des lipides (Matias *et al.*,2016). Il est également présent dans le tractus gastro-intestinal, où son activation contribue à augmenter l'appétence pour des aliments riches en gras et en sucres (Argueta & DiPatrizio, 2017) ainsi que dans le foie, où l'administration d'un agoniste CB1, le HU210 (Ki : 0.06-0.73 nM, Pertwee *et al.*,2010, **Fig.15**) en i.p (20ng/g) favorise la lipogenèse hépatique et participerait au développement de la NAFLD (Osei-Hyiaman *et al.*,2005).

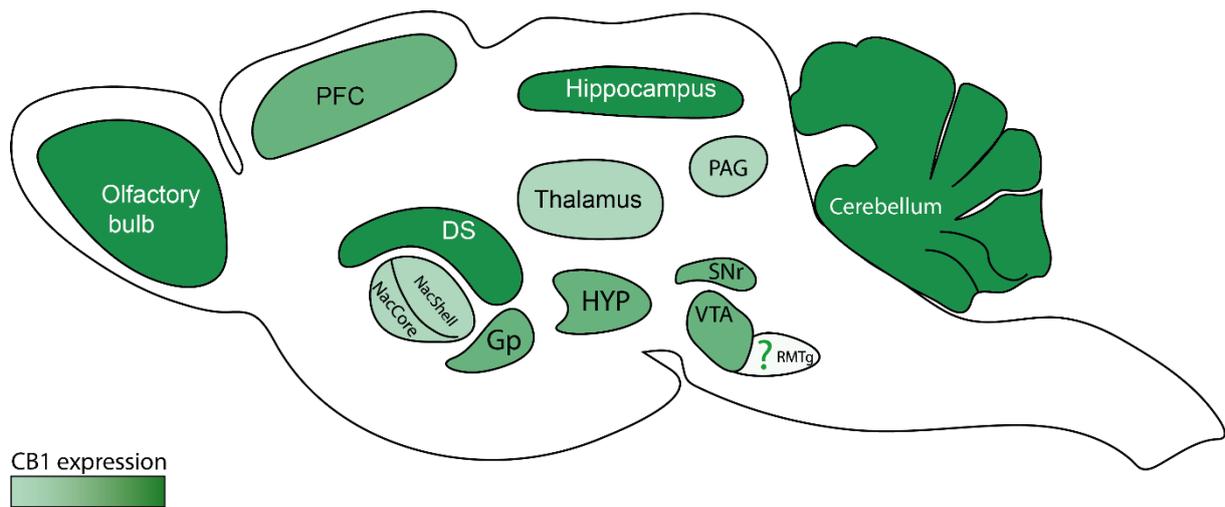


Figure 13 : Localisation et densité de l'expression du récepteur CB1 sur une coupe sagittale de cerveau de rongeur. Plus la zone est foncée, plus la densité de CB1 est importante. Le « ? » signifie que le récepteur CB1 a été identifié dans la structure mais que sa densité d'expression n'est pas connue. PFC : Cortex Préfrontal ; DS : Dorsal Striatum ; NAcShell/Core : Nucleus Accumbens Shell/Core ; Gp : Globus Pallidus ; HYP : Hypothalamus ; SNr : Substance noire réticulée ; VTA : Aire Tegmentale ventrale ; RMTg : Noyau Tegmental Rostromédian ; PAG : Substance grise périaqueducule. Adapté de Flores *et al.*,2013 ; Befort *et al.*,2015 ; Herkenham *et al.*,1990/1992).

Le récepteur CB2 a été initialement décrit comme ayant une expression exclusive dans les organes de la périphérie comme les amygdales, le pancréas, la rate et les cellules immunitaires telles que les monocytes, les lymphocytes T4, T8 et B (Galiègue *et al.*,1995), suggérant son rôle dans la défense immunitaire et la régulation du métabolisme énergétique. Il est constaté dans un modèle *in vitro* de parodontie induite par l'administration de lipopolysaccharide que l'activation de CB2 diminue la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Picciolo *et al.*,2020). En outre, l'activation de CB2 limite la résistance à l'insuline causée par une exposition à un régime obésogène de type « high fat high fructose » (Youssef *et al.*,2019). Néanmoins, une IHC sur cerveau entier de rat montre la présence du récepteur CB2 dans le cerveau (**Fig.14**), et plus particulièrement dans le bulbe olfactif, le PFC, l'HPC, le DS et le NAc (Gong *et al.*,2006). Le récepteur CB2 est également présent sur les neurones dopaminergiques de la VTA où une administration de l'agoniste JWH133 (Ki : 3.4 nM, **Fig.15**) inhibe l'activité de ces neurones et diminue le comportement d'auto-administration de cocaïne chez la souris (Zhang *et al.*,2014 & 2017).

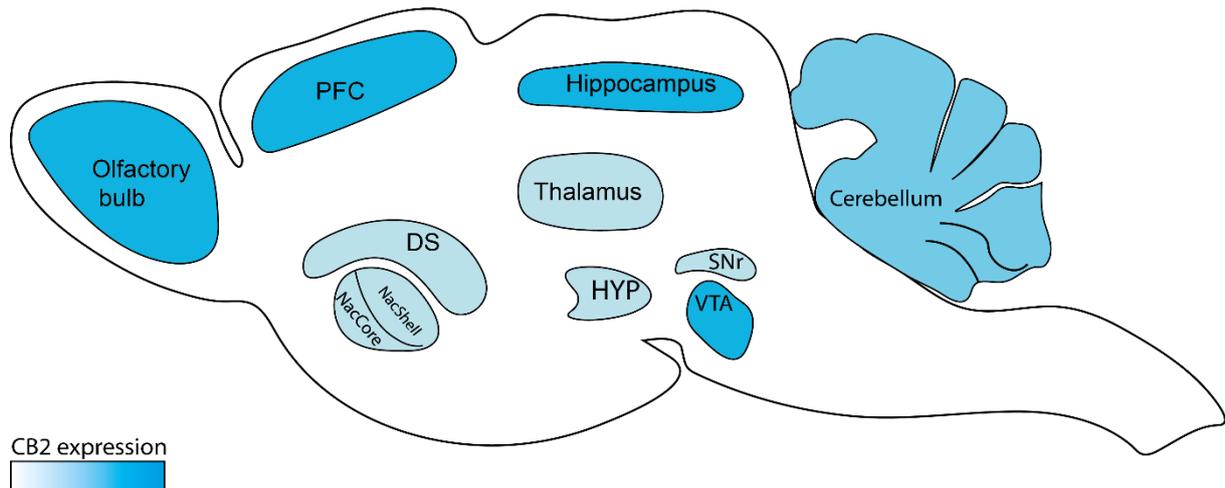


Figure 14 : Localisation et densité de l'expression du récepteur CB2 sur une coupe sagittale de rongeur. Plus la couleur de la structure est foncée et plus la densité de CB2 est importante. PFC : Cortex, Préfrontal ; NacShell/Core : Nucleus Accumbens Shell/Core ; HYP : Hypothalamus ; SNr : Substance noire réticulée ; VTA : Aire tegmentale ventrale. Adapté de Gong *et al.*,2006 ; Jordan & Xi, 2019 ; Ashton *et al.*,2006).

D'autres récepteurs appartiennent également à l'ECS de par leur capacité de liaison avec des ligands cannabinoïdes. C'est le cas des récepteurs GPR18 et GPR55 (Pertwee *et al.*,2010). GPR18 est exprimé principalement dans le tissu lymphatique et serait une cible thérapeutique potentielle en cancérologie et dans l'obésité. Son activation limite le stress oxydatif dans le myocarde observé dans le diabète (Rajamaran *et al.*,2016). Le récepteur GPR55 a été identifié pour la première fois en 2007 comme un potentiel nouveau récepteur de l'ECS (Ryberg *et al.*,2007). Il présente une homologie de séquence de respectivement 13 et 14% avec les récepteurs CB1 et CB2. Le récepteur GPR55 est parfois qualifié de récepteur « CB3 » (Lauckner *et al.*,2018, Morales & Rieggio, 2017). Ce récepteur est exprimé dans le cerveau, notamment dans le striatum et peut s'hétérodimeriser avec le récepteur CB2 comme montré dans une culture de cellules cancéreuses (Balenga *et al.*,2014). Il est envisagé que cette hétérodimerisation peut conduire à une signalisation cellulaire propre au complexe CB2-GPR55. Dans la périphérie, ce récepteur est présent le long du tractus gastro-intestinal, dans le tissu pancréatique et dans le tissu adipeux blanc. Il est mis en jeu dans les processus inflammatoires (Yang *et al.*,2016) et métaboliques comme la sécrétion d'insuline et la lipogenèse (Tuduri *et al.*,2017 ; Meadows *et al.*,2016). Les

récepteurs TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid type-1), connus dans la régulation de la thermogenèse, peuvent également lier les cannabinoïdes (Morales & Rieggio, 2017). En conclusion, les récepteurs de l'ECS sont des récepteurs densément exprimés au sein des structures du circuit de la récompense et dans les organes du tractus gastro-intestinal, leur conférant un potentiel rôle dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique.

I-A-3 : L'anandamide et le 2-arachydonoyglycerol

L'anandamide (AEA), également nommée *N*-Arachidonyléthanolamide est le premier ligand endogène de l'ECS. Il a été identifié par spectrométrie de masse par le même groupe de chercheurs qui était à l'origine de l'identification du récepteur CB1 (Devane *et al.*, 1992). Cette molécule a été nommée « Anandamide », provenant du Sanskrit « Ananda » (आनन्द) qui signifie « bonheur/félicité » en raison de sa capacité à se lier au récepteur CB1 (**Fig. 15**, K_i : 61-543 nM), tout comme le THC, connu pour ses effets psychoactifs. L'AEA est synthétisée à partir d'un lipide membranaire, la phosphatidyléthanolamine, qui par action de la *N*-Acyl-Transférase devient le *N*-Arachydonoyl phosphatidylethanolamine (NAPE). Le NAPE est clivé en AEA grâce à l'action de l'enzyme NAPE-Phospholipase D. L'AEA est dégradée en acide arachidonique + éthanolamine par l'enzyme Fatty-Acid-Amid-Hydroxylase (FAAH) (Lu *et al.*, 2021). Le second principal ligand de l'ECS est le 2-arachydonoyglycerol (2-AG), identifié en 1995 lorsqu'une étude de liaison ligand-récepteur réalisée sur cerveaux de rats a montré une forte affinité du 2-AG pour le récepteur CB1 (**Fig. 15** K_i : 89 nM ; Sugiura *et al.*, 1995). Le 2-AG est synthétisé à partir de la lipase du diacylglycérol par l'enzyme diacylglycerol-lipase alpha (DAGL α). La molécule est dégradée en acide arachidonique et glycérol grâce à la monoacylglycerol lipase (MGL) (Lu *et al.*, 2021). Les deux endocannabinoïdes agissent présynaptiquement sur les récepteurs CB1/CB2. L'AEA a une affinité plus importante pour CB1 et agit comme un agoniste partiel sur ce récepteur, tandis que le 2-AG agit comme un agoniste complet avec une affinité semblable sur les récepteurs CB1 et CB2. Par ailleurs, l'AEA a également une certaine affinité pour le récepteur TRPV1 (K_i : 1.7 μ M ; Pertwee *et al.*, 2010), ce qui n'est pas le cas de 2-AG (Pertwee *et al.*, 2010). La mesure des niveaux d'endocannabinoïdes dans le cerveau révèle que le 2-AG (~12 nmol/g) est 1000 fois plus abondant que l'AEA (~19 pmol/g). Le 2-AG est réparti de manière homogène dans l'ensemble du cerveau tandis que l'AEA est plus

abondant dans les structures mésolimbiques (Buczynski & Parsons, 2010). Ces endocannabinoïdes circulent dans le plasma et sont retrouvés dans les autres organes, notamment dans le tractus gastro-intestinal (Arguetta & DiPatrizio, 2017).

I-A-4 : Autres ligands endogènes de l'ECS

En dehors de l'AEA et du 2-AG, des molécules lipidiques semblables aux endocannabinoïdes appelés « endocannabinoid-like compounds » peuvent agir sur l'ECS en modulant l'expression d'enzymes de dégradation (Ghafouri *et al.*,2004). Parmi ces molécules, on trouve par exemple le *N*-Acétyl ethanolamines (NAE) issu du lipide NAPE et le 2-Monoacylglycerol (2-MAG) synthétisé à partir du triacylglycérol. La prise alimentaire peut directement affecter la biosynthèse de ces molécules. En effet, le taux de NAE et MAG circulant sont augmentés chez des individus consommant un régime méditerranéen, composé à 35% de lipides (Castonguay-Paradis *et al.*,2020).

I-B : Les cannabinoïdes exogènes

I-B-1 : Le THC et le CBD

Le THC est la molécule psychoactive du cannabis, il agit comme agoniste partiel sur les récepteurs cannabinoïdes avec une affinité similaire pour CB1 et CB2 (**Fig.15**). La prise de THC conduit à un effet euphorisant et sa consommation répétée peut conduire à une dépendance en agissant sur les récepteurs CB1 exprimés dans les régions du circuit de la récompense (Leung *et al.*,2020). En plus du potentiel addictif, la consommation de cannabis favorise la prise alimentaire. Cet effet est connu depuis au moins le III^e siècle avant J.-C où la prise de cannabis est recommandée dans les traités médicaux hindous afin de soulager les nausées et encourager l'appétit (Chopra & Chopra, 1940). Chez l'Homme l'usage de cannabis conduit à un comportement de « snacking » et une prise alimentaire globalement plus importante (Foltin & Fischman, 1986, Foltin *et al.*,1988), un phénomène appelé « munchies ». Cet effet semble majoritairement lié à l'effet du THC sur le récepteur CB1 et concerne principalement la consommation d'aliments palatables. En effet, l'administration de THC pur chez le rat conduit à une augmentation de la consommation de gâteau au chocolat (Koch & Matthews, 2001) et l'administration d'un antagoniste du récepteur CB1 (AM 6527, K_i : 0.89 nM, Sink *et al.*,2009 ; SR141716A, K_i : 1.6-12.3 nM, Pertwee *et al.*,2010, **Fig.15**)

conduit à une diminution de la consommation de nourriture palatable sans affecter la consommation de nourriture standard (Carai *et al.*,2006 ; Thornton-Jones *et al.*,2006). De façon intéressante, l'utilisation régulière de cannabis (plus que 3 jours/semaine) est associée avec un IMC plus faible (Le Foll *et al.*,2013). Cela pourrait être lié à une diminution de l'expression de CB1, comme observé en imagerie dans le PFC de consommateurs réguliers de cannabis (Hirvonen *et al.*,2012). Le CBD est un phytocannabinoïde qui a la particularité d'avoir une certaine affinité avec les récepteurs GPR55 et TRPV1 ($K_i = 445 \text{ nM}$; $K_i = 1\mu\text{M}$, Peng *et al.*,2022) mais une affinité très faible à CB1 et CB2 (**Fig.15** $K_i = 3.3\text{-}4.9 \text{ mM}$, $K_i = 4.3\mu\text{M}$). Le CBD a montré un intérêt thérapeutique dans le traitement de la schizophrénie où son administration chez des patients améliore les symptômes psychotiques (Leweke *et al.*,2012 & 2021, McGuire *et al.*,2018). Le CBD a également un intérêt thérapeutique dans le cadre du traitement contre l'épilepsie où son utilisation en combinaison avec des antiépileptiques classiques permet une diminution du nombre de crises (Devinsky *et al.*,2017 & 2018). Actuellement, le CBD est étudié dans le traitement de la douleurs chroniques où la combinaison CBD + THC s'est montrée plus efficace dans le traitement de la douleur que l'utilisation unique de THC chez des patients atteints de douleur chronique (Johnson *et al.*,2010). Contrairement au THC, le rôle du CBD dans la prise alimentaire reste peu étudié. Une des premières études sur le système endocannabinoïde montre que l'administration chronique de CBD (50 mg/kg en i.p) chez le rat conduit à une baisse de la prise alimentaire uniquement pendant les trois premiers jours d'administration (Sofia *et al.*,1976). De plus, pendant l'heure qui suit la consommation de CBD (40mg/kg), les rats consomment moins de nourriture que des animaux contrôles (Farrimond *et al.*,2012). Cet effet anorexique du CBD passerait par une action sur le récepteur CB2. En effet, la perte de poids associée à une administration chronique de CBD (5mg/kg en i.p) est bloquée par la co-administration d'un antagoniste CB2 (5mg/kg en i.p AM630, $K_i : 31.2 \text{ nM}$, Pertwee *et al.*,2010, **Fig.15**) (Ignantowa-Jankowska *et al.*,2011). En définitive, les ligands cannabinoïdes sont des molécules avec un rôle majeur dans la régulation de la prise alimentaire. Leurs actions sur l'ECS affectent les comportements motivés vers les substances d'abus et les aliments palatables, ce qui suggère que ces composés jouent un rôle dans la perturbation de la régulation de la prise alimentaire.

I-B-2 : Les cannabinoïdes de synthèse

Les cannabinoïdes de synthèse sont des molécules initialement synthétisées pour mimer l'effet du THC dans le cadre du traitement des douleurs cancéreuses (Lafaye et al. 2017). Les deux cannabinoïdes de synthèse les plus connus sont le WIN5512-2 (**Fig. 15** CB1 Ki : 1.89-123 nM ; CB2 Ki : 0.28-16.2 nM) et le JWH-018 (**Fig. 15**, CB1 Ki : 9 nM ; CB2 Ki : 5.6 ± 2.4) qui agissent comme des agonistes de CB1 et CB2. Ils sont classiquement utilisés dans les études précliniques sur l'ECS (Alves et al.,2020), mais aussi dans quelques études sur l'humain notamment dans le traitement du glaucome (Porcella et al.,2001) et la psychose (Every-Palmer, 2011). Depuis 2008, on constate une émergence des cannabinoïdes de synthèse comme substance d'abus sous le terme « Spice » ou « Marijuana de synthèse ». L'émergence de ces molécules comme substances d'abus et l'augmentation de décès liée à leurs utilisations ont conduit à leur progressive criminalisation dans le début des années 2010 (Alves et al.,2020).

Molécule	KI CB1 (nM)	KI CB2 (nM)	Action	Références
2-AG	58.3-472	145-1400	Agoniste CB1/CB2	Pertwee et al.,2010
AEA	61–543	279–1940	Agoniste partiel de CB1 et agoniste complet de CB2	Pertwee et al.,2010
AM 6527	0.89	92	Agoniste CB1	Sink et al.,2009
AM630	5152	31.2	Antagoniste CB2	Pertwee et al.,2010
AM6545	1.7	523	Antagoniste de CB1	Cluny et al.,2010
CBD	3.3-4.9E10 ⁶	4.3E10 ³	Antagoniste CB1/CB2	Peng et al.,2022
CP-55,940	0.5-5.0	0.69-2.8	Agoniste CB1/CB2	Pertwee et al.,2010
HU-210	0.06-0.73	0.17-.052	Agoniste CB1/CB2	Pertwee et al., 2010

JWH015	383	13.8	Agoniste CB2	Pertwee <i>et al.</i> ,2010
JWH-018	9	5.6 ± 2.4	Agoniste CB1/CB2	(Atwood <i>et al.</i> ,2010 ; Rajasekaran <i>et al.</i> ,2013)
JWH133	677	3.4	Agoniste CB2	Pertwee <i>et al.</i> ,2010
Rimonabant (SR141716A)	1.8-12.3	514-13200	Antagoniste CB1	Pertwee <i>et al.</i> ,2010
THC	5.05–80.3	3.13–75.3	Agoniste CB1/CB2	Pertwee <i>et al.</i> ,2010
WIN5512-2	1.89-123	0.28-16.2	Agoniste CB1/CB2	Pertwee <i>et al.</i> ,2010

Figure 15 : Valeurs de KI de certains ligands des récepteurs CB1/CB2. Adapté de Pertwee *et al.*,2010 .

II : Fonctions générales du système endocannabinoïde

II-A Rôle du système endocannabinoïde dans l'anxiété et la dépression

Les effets du THC sur l'humeur et l'effet prodépressif de l'administration d'antagoniste CB1 montrent l'implication de l'ECS dans l'anxiété et la dépression (Lowe *et al.*,2021 ; Bright & Akirav, 2021). Chez l'Homme, le polymorphisme nucléotidique (SNP) A>G 1359 du gène *Cnr1* est associé avec un risque plus important de développer une dépression résistante aux traitements. Une analyse en imagerie fonctionnelle montre que les porteurs de ce variant ont une activité moindre de l'amygdale, et du CPU (Domschke *et al.*,2008). La présence d'un SNP pour le gène de l'enzyme FAAH 385C>A , conduisant à un catabolisme moins important de l'AEA, a un effet protecteur contre l'anxiété et le stress (Mayo *et al.*,2018). De manière similaire, l'augmentation du tonus endocannabinoïde par une injection d'AEA dans le PFC de rats avec un traitement via un inhibiteur de l'enzyme FAAH ou MGL ont un effet anxiolytique et antidépressif (Rubino *et al.*,2009, Kathuria et al. 2003, Bortolato *et al.*,2007). En outre, l'injection chronique ou aiguë d'un antagoniste de CB1 en i.p ou directement dans le PFC augmente le temps d'immobilité des rats dans le test de nage forcée, phénotype comportemental associé à la dépression (McLaughlin *et al.*,2013 ;

Beyer *et al.*,2010 ; Adamczyk *et al.*,2008). De récentes études montrent que le récepteur CB2 joue également un rôle dans la symptomatologie de l'anxiété et de la dépression. En effet, une injection i.p (20 mg/kg) d'un agoniste spécifique du récepteur CB2, le JWH015, conduit à une augmentation du temps passé dans la section ouverte d'un zéro-maze (Ishiguro *et al.*,2018), tandis que l'administration aiguë (50 mg/kg i.p) ou chronique (25 à 100 mg/kg i.p) de β -Caryophyllene, un agoniste du récepteur CB2, diminue le temps d'immobilité de rats dans le test de nage forcée (Bahi *et al.*,2014 ; Hwang *et al.*,2020). De plus, lors d'une co-administration, le JWH133 (0.25 mg/kg, i.p) , un antagoniste du récepteur CB2, augmente l'effet antidépresseur de molécules comme l'escitalopram, un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine chez la souris (Poleszak *et al.*,2019). Cela implique une interaction entre le récepteur CB2 et le système sérotoninergique.

II-B : Rôle du système endocannabinoïde dans la mémoire

Les études réalisées chez l'Homme montrent que les consommateurs réguliers de cannabis présentent une altération des performances cognitives comme une réduction de quotient intellectuel ou un temps de réaction plus faible. Ces effets sont plus importants chez les consommateurs ayant commencé à l'adolescence mais disparaissent après une abstinence prolongée (Fried *et al.* 2005 ; Willford *et al.*,2021 ; Sorkhou *et al.*,2022). L'effet du cannabis sur la mémoire est lié à la forte densité de récepteurs CB1 dans l'HPC (**Cf : Chapitre 3 I-A-2 Identification des récepteurs cannabinoïdes**). Une administration de l'agoniste WIN55,212-2 dans l'HPC (5ng/par HPC) conduit à une performance moindre dans le test de la piscine de Morris ainsi qu'à une altération de la potentialisation à long terme sur les collatérales de Schaeffer (Abush & Akirav, 2006). Ces altérations des capacités mnésiques sont causées par une modification de l'architecture dendritique des neurones de l'HPC comme cela a été montré après une exposition chronique au THC chez des rats adolescents, avec une diminution de la densité et de la taille des épines dendritiques des neurones de l'HPC et du PFC (Rubino *et al.*,2009 ; Miller *et al.*,2019). Cet effet est très dépendant de l'âge auquel a lieu l'exposition. En effet, chez de jeunes souris (3 mois), le THC induit une déstabilisation des épines dendritiques au sein de l'HPC tandis que chez des souris âgées (10 mois), une administration chronique de THC (3mg/kg par pompe osmotique) permet une stabilisation de ces épines dendritiques (Komorowska-Müller

et al.,2023). De manière intéressante, les cannabinoïdes endogènes sont capables de moduler positivement la potentialisation à long terme des neurones hippocampique (Stella *et al.*,1997 ; Lemtiri-Chlieh & Levine, 2023). De plus, cette plasticité ainsi que les performances dans le test de la piscine de Morris sont altérées chez des souris DAGL α KO (Schurman *et al.*,2013), suggérant un rôle de l'ECS dans la modulation fine des processus mnésiques.

II-C : Rôle du système endocannabinoïde dans le sommeil

Les propriétés hypnotiques du cannabis sont documentées depuis le XIXe siècle (Clendining, 1843) mais la neurobiologie derrière ces effets reste encore peu connue. Une étude dans une clinique a montré que des patients atteints de troubles du sommeil réduisent leur prise de somnifères après le début d'un traitement avec du cannabis médical (Piper *et al.*, 2017). Les études réalisées jusqu'à présent sur les modèles animaux montrent que les niveaux d'endocannabinoïdes fluctuent selon la phase du cycle (diurne vs nocturne) dans les régions du cerveau responsable de la régulation du cycle veille-sommeil. C'est le cas de l'hypothalamus, dans lequel les niveaux d'AEA augmentent pendant la phase diurne, ce qui suggère un rôle des cannabinoïdes endogènes dans la régulation des cycles veille-sommeil (Murillo-Rodriguez *et al.*,2006). De plus, une injection de 2-AG dans le LH favorise l'entrée en sommeil REM en agissant potentiellement sur les neurones MCH de la structure (Yamashita & Yamanaka, 2017 ; Perez-Morales *et al.*,2013). De manière intéressante, les études concernant l'augmentation d'AEA dans la régulation du sommeil ont des résultats mitigés. Chez des rats, une administration d'AEA dans le PPTg (1.25 mg/5 μ L) favorise l'endormissement (Murillo-Rodriguez *et al.*,2001) tandis qu'une administration d'un inhibiteur de l'enzyme FAAH, URB597 (10-30 μ g/ μ L) dans la même région conduit à un état d'éveil des rats (Murillo-Rodriguez *et al.*,2011), suggérant que les endocannabinoïdes peuvent provoquer l'endormissement ou l'éveil selon les structures du cerveau dans lesquelles ils agissent.

II-D : Rôle du système endocannabinoïde dans la récompense

II-D-1 : Modulation de l'activité des neurones du circuit de la récompense

Le récepteur CB1 est fortement exprimé dans les structures du circuit de la récompense (**Fig.13**) où il est fortement impliqué dans les processus motivationnels. En effet, les agonistes des récepteurs CB1 comme le THC ont des effets récompensants que l'on peut observer chez l'Homme et dans des modèles animaux utilisant des protocoles d'auto-administration par inhalations, injections ou consommation alimentaire de THC (Justinova *et al.*,2005 ; Smoker *et al.*,2019 ; Stringfield & Torregrossa, 2020). Ces effets sont expliqués par une augmentation de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de la VTA suivie d'une libération de dopamine dans les structures striatales (Malone & Taylor, 1999 ; Cheer *et al.*,2000 & 2004 ; French *et al.*,1997). Ces effets sont bloqués par une co-administration de Rimonabant (i.v 300 µg/kg) du récepteur CB1 (Cheer *et al.*,2004). Cette augmentation de la libération de dopamine est due à une désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA. En effet, les neurones dopaminergiques de la VTA sont sous le contrôle inhibiteur d'interneurones GABAergiques présents au sein de la structure (Nieh *et al.*,2016 ; Lupica & Riegel, 2005). Plus récemment, il a été montré par immunofluorescences et analyses électrophysiologiques que les terminaisons GABAergiques du RMTg expriment le récepteur CB1 et sont capables de désinhiber les neurones dopaminergiques de la VTA (Lecca *et al.*,2011, 2012 ; Melis *et al.*,2014). Ce mécanisme de désinhibition lié à l'ECS est appelé « Depolarization induced suppression of inhibition » (DSI). Il consiste à l'inhibition des neurones présynaptiques GABAergiques par la libération d'endocannabinoïdes par le neurone post-synaptique. Ce mécanisme est observé dans différentes structures cérébrales comme le cervelet, l'HPC ou la VTA (Narushima *et al.*, 2006 ; Hampson *et al.*,2003 ; Kreitzer & Regehr, 2001 ; Melis *et al.*,2009). Il repose sur la présence de récepteurs CB1 sur les terminaisons présynaptiques des neurones GABAergiques et la synthèse de 2-AG dans les neurones postsynaptiques suite à une stimulation à haute fréquence. En effet, les inhibiteurs enzymatiques de la MGL augmentent le tonus endocannabinoïde et favorisent la mise en place de DSI (Hashimodotani *et al.*,2007), ce qui n'est pas le cas pour les inhibiteurs enzymatiques de la FAAH (Kim & Alger, 2004) ce mécanisme est bloqué par l'administration d'un antagoniste du récepteur CB1 (AM251, application de 1µM en bain, Kreitzer & Regehr, 2001). Un mécanisme similaire à la DSI est retrouvé dans les structures effectrices du circuit de la récompense. Par exemple, sur les projections glutamatergiques du PFC vers le NAc. En effet, l'activation de cette voie conduit à la synthèse et la libération de 2-AG par le

neurone post-synaptique qui agit ensuite sur les neurones présynaptiques excitateurs et supprime la libération de glutamate (Robbe *et al.*,2001). Ce mécanisme s'appelle la « depolarisation induced suppression of excitation » (DSE) et module les comportements de recherche d'une récompense dans le NAc (Bilbao *et al.*,2020). Ainsi, l'ECS est un système modulateur important des neurones du circuit de la récompense et constitue ainsi une cible de choix dans l'étude de la régulation de la prise alimentaire.

II-D-2 : Rôle du système endocannabinoïde dans la régulation de la prise alimentaire

L'ECS est exprimé dans les structures dites non homéostatiques (voie mésocorticolimbique) et homéostatiques (hypothalamus) de la prise alimentaire (Lau *et al.*,2017). De ce fait, il peut réguler la prise alimentaire en jouant sur l'un et l'autre des systèmes. Dans la voie mésocorticolimbique, L'ECS semble principalement avoir pour rôle de moduler l'aspect appétant ou le « liking » associé à un aliment, encourageant sa consommation. En effet, une infusion bilatérale de 2-AG dans le NAc (0.5µL, 1µg/µL) conduit dans l'heure qui suit à une consommation plus importante de nourriture standard chez le rat (Kirkham *et al.*,2002), tandis qu'une infusion d'AEA (0.5 µL, 0.05 µg/L) conduit à une accentuation de la réaction orofaciale associée au plaisir suite à la consommation de saccharose par modulation de l'activité du « hedonic hotspot » (**Fig. 16**) (Mahler *et al.*,2007). Par ailleurs, la prise alimentaire peut moduler l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA par leur interaction avec les signaux hormonaux provenant de la périphérie. L'insuline, libérée dans le plasma suite à la prise alimentaire, agit sur son récepteur IGF1R (Insulin Like Growth Factor 1 Receptor) présent à la surface des neurones dopaminergiques de la VTA (Liu *et al.*,2016). La liaison ligand-récepteur provoque la synthèse et la libération de 2-AG qui agit pré-synaptiquement sur les afférences glutamatergiques de la VTA (**Fig. 16**), diminuant l'activité du circuit de la récompense et la motivation pour la nourriture palatable (Liu *et al.*,2016). Cependant, une exposition pendant 1h à un régime palatable de type « sweetened high fat » (60% de gras, 20% de saccharose) abolit partiellement cette inhibition des neurones présynaptiques glutamatergiques, suggérant que la densité calorique et la palatabilité d'un aliment sont capables d'encourager la consommation répétée d'aliments palatables en altérant la signalisation de l'ECS (Labouèbe *et al.*,2013). Les molécules endogènes de l'ECS étant des ligands

lipidiques synthétisés à partir d'acides gras polyinsaturés oméga-6, il a été suggéré que la consommation d'un régime riche en gras pouvait affecter le tonus de l'ECS. En effet, des souris exposées chroniquement (4 semaines) à un régime déficient en oméga-3 présentent un taux de 2-AG plus important dans le cerveau (Watanabe *et al.*,2003). Au-delà du circuit de la récompense, l'ECS est également capable de moduler la prise alimentaire à travers les régions impliquées dans la régulation de la prise alimentaire homéostatique en forte interaction avec le circuit de la récompense. Notamment, il a été montré que des rats en restriction alimentaire, n'ayant accès qu'à 5g de nourriture standard pendant 24h avaient un taux de 2-AG plus important dans l'hypothalamus que des rats nourris *ad libitum* (Kirkham *et al.*,2002). De manière similaire, une injection d'AEA (50 ng dans 0.5 μ L) dans l'hypothalamus ventro-médian conduit à une hyperphagie sur de la nourriture standard chez des rats en état de satiété (Jamshidi & Taylor, 2001). Au sein du LH, les neurones MCH et Orx, dont l'activation favorise la prise alimentaire, sont capables de synthétiser et de libérer des endocannabinoïdes par leurs projections sur le NAc (Terril *et al.*,2020) et la VTA (Tunisi *et al.*,2020), respectivement (**Fig.16** Cristino *et al.*,2013 ; Jo *et al.*,2005). Une étude réalisée chez la souris montre que la leptine, en agissant sur les neurones MCH, bloque la libération d'endocannabinoïdes et permet ainsi de diminuer la prise alimentaire en limitant la désinhibition des neurones MCH. De manière similaire, l'étude de Cristino *et al.* a montré par microscopie électronique que l'enzyme DAGL α est surexprimée dans les neurones Orx de souris déficientes en leptine ou obèses et atteste de la présence du récepteur CB1 sur les afférences GABAergiques et glutamatergiques des neurones Orx. De plus, le nombre d'afférences GABAergiques exprimant le récepteur CB1 est plus élevée chez les souris déficientes en leptine ou les souris contrôle exposées à un régime riche en gras (Croquettes de 49% de gras). Une analyse en patch clamp montre que l'administration d'un agoniste CB1(WIN 552122, 1 μ M dans un bain) conduit à une inhibition des neurones Orx en agissant sur ces afférences GABAergiques (Huang *et al.*,2007) (**Fig.16**) et que cette désinhibition est plus importante chez les souris déficientes en leptine. L'ensemble de ces études montre que l'ECS favorise la prise alimentaire en agissant sur la voie mésocorticolimbique en accentuant la palatabilité et la motivation pour les aliments palatables. En revanche, dans l'hypothalamus, ce système module principalement la prise alimentaire en fonction de l'état des réserves énergétiques de l'organisme. Ces études suggèrent un rôle de l'ECS hypothalamique dans la détection de l'état des

réserves énergétiques de l'organisme, et potentiellement dans la motivation à obtenir de la nourriture.

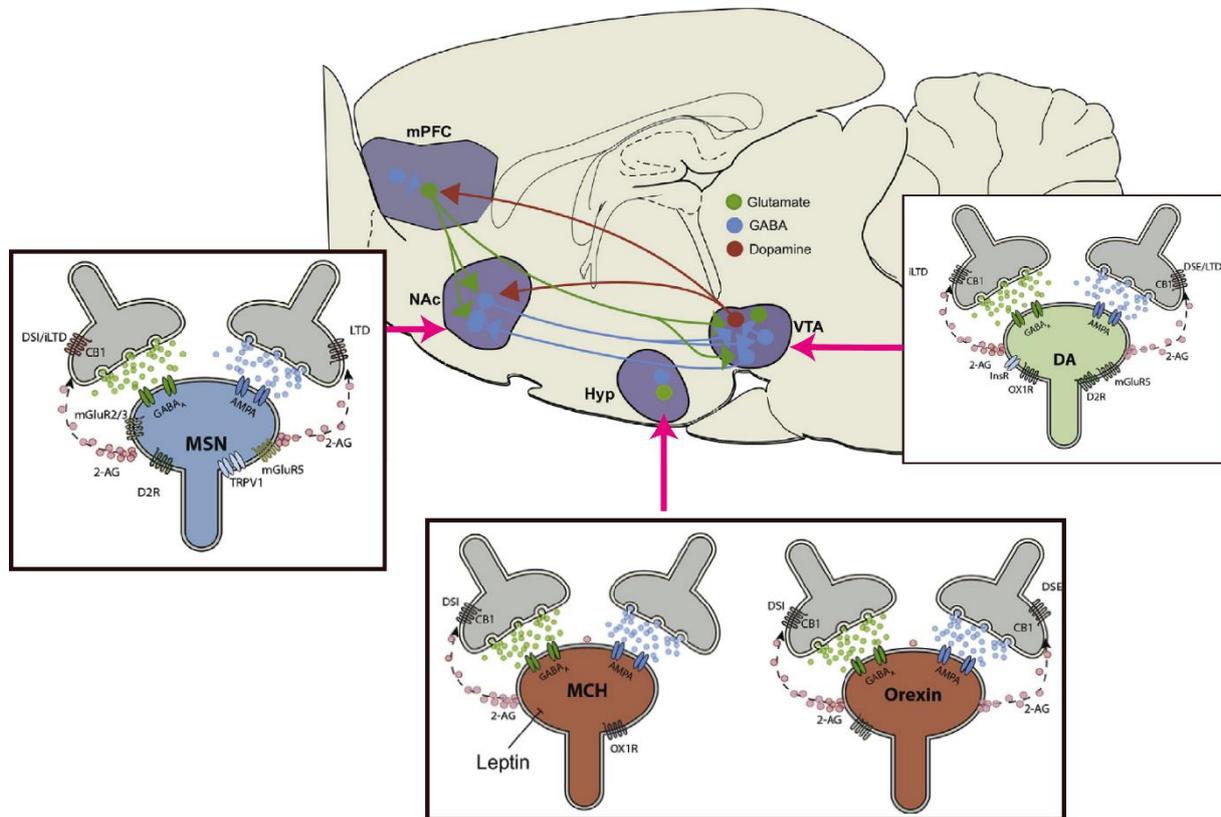


Figure 16 : Signalisation du système endocannabinoïde dans le LH et la VTA

La signalisation du système endocannabinoïde est présente dans les structures de la prise alimentaire homéostatique telles que l'hypothalamus (Hyp), plus précisément sur les neurones de mélanococoncentration (MCH) et orexinergiques (Orx) de l'hypothalamus latéral (Neurones Rouges). La signalisation endocannabinoïde est également présente au sein de neurones de structures impliquées dans la régulation de la prise alimentaire hédonique, telles que les neurones dopaminergiques (DA) de la VTA (Neurones verts) et les neurones épineux moyens (MSN) du NAc (Neurones bleus). Dans chacun de ces neurones, la libération de glutamate (points bleu clair) par les afférences synaptiques glutamatergiques conduit à une dépolarisation des neurones post-synaptiques et à une libération d'endocannabinoïdes comme le 2-AG (points rose clair) qui agit de manière rétrograde en inhibant les neurones GABAergiques (Depolarisation induced suppression of inhibition, DSI) ou glutamatergique (Depolarisation Induced suppression of excitation). La liaison de l'insuline à son récepteur sur les neurones DA inhibe la libération de 2-AG et la leptine induit également la libération de 2-AG en agissant sur les neurones MCH. Adaptée de Lau *et al.*, 2017.

II-D-3 : Modulations du système endocannabinoïde observées dans l'obésité

II-D-3-1 : Observations chez les patients obèses

La régulation de la prise alimentaire par l'ECS, par la modulation des neurones du circuit de la récompense et hypothalamique, interroge sur son rôle éventuel dans les pathologies liées à l'alimentation comme l'obésité. Jusqu'à présent, aucune étude réalisée chez l'Homme ne montre une dérégulation de l'ECS dans le système nerveux central de patients obèses mais des modifications de ce système ont été observées en périphérie. En effet, des dosages plasmatiques montrent une concentration plus importante d'AEA et de 2-AG dans le plasma et dans le tissu adipeux blanc chez les patients obèses ainsi qu'une corrélation positive entre le taux de 2-AG circulant et la masse de graisse abdominale (Engeli *et al.*,2005, Blüher *et al.*,2006). Par ailleurs, CB1 est plus exprimé dans le tissu hépatique de femmes obèses présentant une NAFLD (Auguet *et al.*,2014), soulignant l'effet d'une dérégulation de l'ECS dans les troubles métaboliques associés à l'obésité. En outre, la présence de SNP du gène *Cnr1* est associée avec une résistance ou une vulnérabilité à développer une obésité. Par exemple, le SNP de *Cnr1* 1359 G>A est associé à un IMC plus faible que la moyenne chez une population du sud de l'Italie (Gazzerro *et al.*,2007), tandis que la présence du SNP 64+9621T>C est corrélée avec une prévalence plus élevée de l'obésité dans la population française et suisse (Benzinou *et al.*,2008). L'ensemble de ces résultats montre l'importance de l'ECS dans l'obésité et il peut être envisagé que ces altérations, présentes dans la périphérie, s'étendent dans le système nerveux central et participent au développement d'une perte de contrôle sur la prise alimentaire.

II-D-3-2 : Observations dans des modèles précliniques

Les modifications centrales et périphériques de l'ECS associées à l'obésité ont été principalement étudiées dans des modèles animaux exposés plusieurs semaines à un régime obésogène. Lors d'une des premières études sur la régulation centrale de

l'ECS en lien avec l'obésité, il a été mis en évidence qu'une exposition de 10 semaines à un régime obésogène (mélange de croquettes et de lait concentré) induisait une diminution de l'expression de CB1 dans le NAc chez le rat (**Fig. 17**) (Harrold *et al.*,2002). Des résultats similaires ont été obtenus après une exposition de six semaines à des croquettes composées à 45% de gras (Blanco-Gandia *et al.*,2017a). Il a été proposé que cette diminution soit liée à une régulation à la baisse du récepteur CB1 suite à une augmentation de la présence de ligands endocannabinoïdes dans le NAc, notamment 2-AG. En effet, il a été démontré chez le rat qu'une infusion de 2-AG dans le NAc favorise la prise alimentaire dans les heures qui suivent (Soria-Gomez *et al.*,2007). En revanche, des croquettes enrichies en gras semblent moins récompensantes pour des souris KO pour DAGL α lors d'un test de préférence de place conditionnée (Wei *et al.*,2016). Ces altérations de l'ECS dans les structures du circuit de la récompense peuvent se manifester de manière transgénérationnelle comme observé chez des rats mâles nés d'une mère exposée à un régime riche en gras (croquette de 60% de gras) pendant sa gestation. Les descendants présentent une diminution de l'expression de CB1 dans le DS (**Fig. 17**) ainsi qu'une méthylation du promoteur du gène *Cnr1* accompagné d'une diminution de l'expression de CB1 dans le PFC (**Fig. 17**). Inversement, dans l' HPC, le promoteur de *Cnr1* est moins méthylé et l'expression du récepteur CB1 est plus importante (**Fig. 17** Gawlinski *et al.*,2021). Les résultats de cette étude font écho à l'effet transgénérationnel des substances addictives. En effet, les descendants de rats exposés chroniquement au THC présentent une surexpression de *Cnr1* dans le striatum ventral (Szutorisz *et al.*,2016). Ces altérations sont envisagées comme de potentielles sources de développement de troubles psychiatriques tels que la dépression ou les troubles d'abus de substance par une modulation épigénétique de l'expression de l'ECS. Les modifications de l'ECS touchent également des régions cérébrales associées à la prise alimentaire homéostatique comme le NTS où l'on retrouve une plus forte expression de *Cnr1* chez des rats après six semaines d'exposition à un régime composé de graisse végétale (**Fig. 17**, Bello *et al.*,2012). Le NTS étant à l'origine des afférences du nerf vague innervant le tractus gastro-intestinal, il est possible que cette augmentation de *Cnr1* au sein de ce noyau suite à un régime obésogène soit une manière d'assurer une motilité et une digestion adéquate (Vianna *et al.*,2012). Une analyse exhaustive de l'expression de l'ECS dans le cerveau de rats a été réalisée après une exposition de 6 semaines à un régime obésogène de type fCHFHS (accès *ad libitum* à une

solution d'eau contenant 10% de saccharose et d'un bloc de gras en plus de l'eau et la nourriture standard). Ce régime n'affecte pas la concentration d'AEA dans le NAc mais aboutit à une réduction de FAAH et une augmentation de NAPE ainsi qu'une moindre concentration de 2-AG accompagnée d'une diminution de l'expression de DAGL α et MGL (**Fig. 17**). Dans ce régime, des modifications de l'expression de l'ECS sont également constatées dans la VTA avec une baisse de l'expression de CB1, une augmentation de l'expression de CB2 et une diminution de l'expression des enzymes de synthèses et de dégradations des endocannabinoïdes. Ce protocole affecte également l'expression de l'ECS dans les structures de la prise alimentaire homéostatique, comme observé avec la réduction de l'expression de GPR55 dans l'ARC (**Fig.17**). Ces modifications pourraient faire partie d'un mécanisme d'adaptation de l'ECS afin de réguler la prise alimentaire. Cette étude a également montré que les modifications de l'ECS sont différentes selon le profil de prise alimentaire. Par exemple, une analyse de cluster en K-moyens montre que des rats ayant un profil de fort consommateur de saccharose présentent une expression plus importante de CB2 et GPR55 dans le NAc tandis que le contraire est observé chez de forts consommateurs de gras (Bourdy *et al.*,2021). Cette différence peut être liée à une différence de la palatabilité entre les aliments, le gras et le sucre ayant des capacités différentes à engager les structures du circuit de la récompense (Espitia-Bautista *et al.*,2021) . L'augmentation de CB2 dans le NAc de rats forts consommateurs de saccharose peut être le reflet d'un phénomène de neuro-inflammation comme observé par Paktar *et al.* dans leur étude sur l'hyperphagie boulimique au saccharose (Patkar *et al.*,2021). L'ECS dans la périphérie semble également avoir un rôle important dans la physiopathologie de l'obésité comme montré dans l'étude d'Argueta & Di Patrizio dans laquelle des souris exposées 60 jours à un régime obésogène composé à 40% de saccharose et 40% de gras présentent un taux de 2-AG et d'AEA plus élevé dans le plasma et dans le jéjunum ainsi qu'une moindre expression de MGL et FAAH. Dans cette étude, il est montré qu'une administration en i.p d'un antagoniste CB1 strictement périphérique, le AM6545 (10mg/kg), permet une réduction sélective de la consommation de nourriture palatable (Argueta & Di Patrizio, 2017). En raison de la communication entre le système nerveux entérique et le système nerveux central par le nerf vague, il est envisagé que ces altérations puissent prendre leurs origines dans la périphérie avant de s'étendre dans le système nerveux central. Néanmoins, le rôle de l'ECS périphérique dans la physiopathologie de l'obésité montre parfois des

Introduction

résultats contradictoires. C'est le cas des études relatives au rôle de CB1 dans la stéatose hépatique. La coloration du tissu hépatique en hématoxyline-éosine chez des souris KO pour CB1 exposées 12 semaines à des croquettes enrichies en gras (40%) ou en saccharose (17%) ne montre pas de signes de stéatose (Wang *et al.*,2021). En outre, une étude similaire utilisant une coloration Red-Oil du tissu hépatique chez des souris KO pour CB1 dans le foie et exposées à un régime obésogène composé de croquettes riches en gras identiques à celles de l'étude de Wang et avec une durée similaire (14 semaines) montre une moindre accumulation de lipides dans le tissu hépatique comparé à des animaux contrôles (Osei-Hyaman *et al.*,2008). La différence entre ces deux études réside potentiellement dans le type de coloration utilisé pour attester la présence/absence de stéatose hépatique . En effet, la coloration hématoxyline-éosine permet de mettre en évidence des signes de stéatose comme des infiltrats inflammatoires mais ne permet pas de mettre en évidence l'accumulation de lipides.

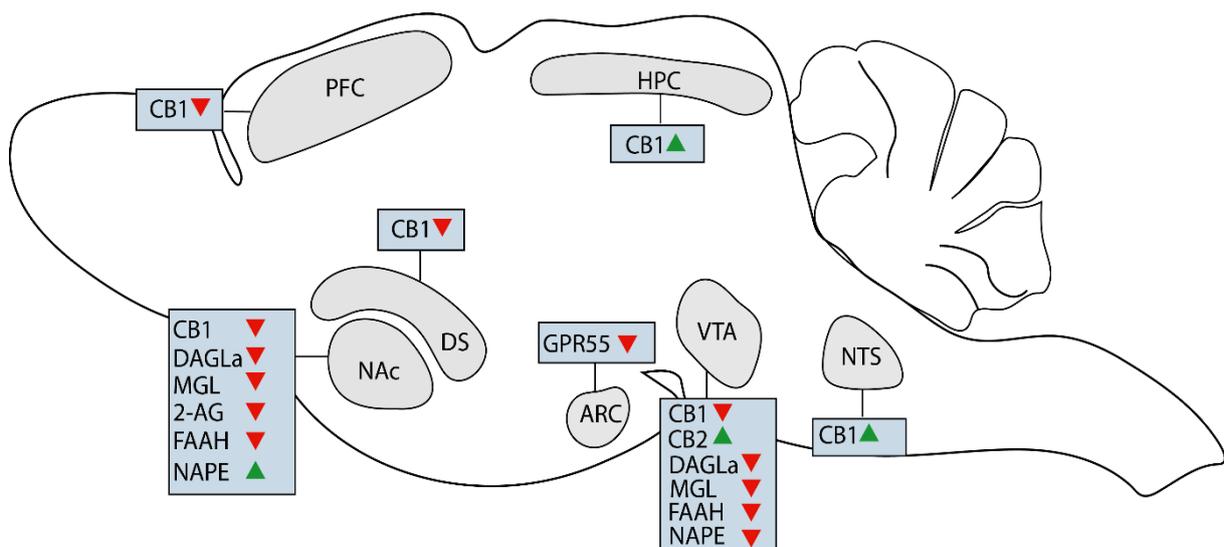


Figure 17 : Neuroadaptations centrales du système endocannabinoïde observées dans des modèles précliniques d'obésité

Un accès *ad libitum* à un régime obésogène riche en gras ou riche en gras/sucre conduit à des changements de l'expression des éléments du système endocannabinoïdes dans des structures cérébrales appartenant aux composantes hédoniques et homéostatiques de la régulation de la prise alimentaire. Les adaptations du système pour chacune des structures (grises) sont indiquées dans les cadres bleus. Les triangles rouges indiquent une diminution de l'expression tandis que les triangles verts montrent une augmentation de l'expression. ARC : Noyau Arqué ; DS : Striatum Dorsal ; HPC : HPC ; NTS : Noyau du tractus solitaire ; NAc : Nucleus Accumbens ; PFC : Cortex préfrontal ; VTA : Aire tegmentale ventrale ; CB1 : Cannabinoid Receptor 1 ; CB2 : Cannabinoid Receptor 2 ; 2-AG : 2-arachydonoyglycerol ; DAGLa : Diacylglycerol lipase alpha ; MGL : Monoacylglycerol lipase ; FAAH : Fatty acid amid hydrolase ; NAPE : N-acylphosphatidylethanolamine.

II-D-4 : Modulations du système endocannabinoïde observées dans l'hyperphagie boulimique

II-D-4-1 : Observations chez les patients atteints d'hyperphagie boulimique

Au-delà de son rôle dans la régulation de la prise alimentaire (**Cf Chapitre 3, II-D-2 : Rôle du système endocannabinoïde dans la régulation de la prise alimentaire**) et de ses altérations dans l'obésité (**Cf Chapitre 3, II-D-3 : Modulations du système endocannabinoïde observées dans l'obésité**), de récents travaux ont mis en lumière l'implication de l'ECS dans les TCAs, et notamment l'HB (Bourdy & Befort, 2023). Une analyse du niveau d'endocannabinoïdes endogènes dans le plasma chez des patientes atteintes de différents types de TCA montre que les patientes atteintes d'HB présentent une concentration d'AEA plus élevée que des contrôles sains (Monteleone *et al.*, 2005). Une étude réalisée par le même groupe (Monteleone *et al.*, 2010) va dans le même sens en montrant la présence du SNP FAAH 385 C > A, qui conduit à une activité réduite de l'enzyme FAAH (Chiang *et al.*, 2004) chez des patients obèses et atteints d'HB. Pour le moment, il n'existe aucune étude sur les éventuelles altérations de l'ECS dans le cerveau de patients atteints d'HB. Cependant, une étude en imagerie fonctionnelle chez des patients atteints de boulimie ou d'anorexie nerveuse montre une corrélation négative entre la disponibilité de CB1 dans les structures mésolimbique et l'IMC (Ceccarini *et al.*, 2016). De ce fait, des modifications de l'expression de l'ECS sont envisageables dans l'HB chez l'Homme.

II-D-4-2 : Observations dans les modèles précliniques

Comme dans l'obésité, de récentes études réalisées sur les modèles animaux ont pu mettre en évidence le rôle de l'ECS, périphérique et central, dans l'HB. Une étude (Berland *et al.*, 2022) réalisée sur un modèle d'HB avec des souris exposées 1h quotidiennement à un mélange composé de 20% de lipides et de 10% de saccharose pendant 10 à 14 jours a mis en évidence l'importance de la signalisation périphérique de l'ECS dans l'HB. Dans cette étude, il est montré que l'injection en i.p (10 mg/kg) d'un antagoniste périphérique du récepteur CB1 (**Fig. 15** AM6545, Ki : 1.7 nM) conduit à une diminution de la consommation de la mixture palatable pendant l'heure d'accès

tandis que l'administration de JZL184 (8 mg/kg) , inhibiteur de la MGL, provoque l'augmentation de la consommation de la mixture. Une ablation du nerf vague (X), riche en récepteurs CB1 (Vianna *et al.*, 2012) diminue considérablement la consommation de nourriture palatable et diminue l'activité de structures régulatrices de la prise alimentaire homéostatique et hédonique comme le NTS et la VTA. Cette étude montre que l'ECS joue un rôle important dans le développement de l'HB en modulant l'activité des structures de la prise alimentaire par le biais de l'axe intestin-cerveau. La synthèse globale d'effets de l'HB sur l'expression de l'ECS au cœur du système nerveux central reste difficile à établir en raison du faible nombre d'études sur le sujet. De plus, la forte hétérogénéité des protocoles utilisés incluant la nature, la fréquence d'accès et la teneur en gras/sucres des aliments palatables peuvent rendre difficile l'interprétation des modulations observées. Dans un protocole comprenant un accès de 3jours/semaines avec une restriction alimentaire et un stress de frustration où les rats peuvent voir l'aliment palatable (mélange de Nutella, croquette, 56% de sucre et 31% de gras) sans pouvoir y accéder conduit à une augmentation de l'expression de CB1, NAPE, DAGLa ainsi qu'à un niveau d'AEA plus élevé (**Fig. 18**, Pucci *et al.*,2022). Cependant, la plupart des études se concentrent sur les modulations de l'ECS dans les structures associées au circuit de la récompense. Par exemple, l'étude de Blanco-Gandia de 2017, utilisant des souris avec un accès 2h trois jours par semaine pendant six semaines à des croquettes riches en gras (40%), conduit à une diminution de l'expression de CB1 dans le NAc (**Fig. 18**, Blanco-Gandia *et al.*,2017b). De plus une étude utilisant un protocole similaire chez des rattes avec un accès intermittent à un bloc de margarine trois jours par semaine (70% de lipide) pendant quatre semaines provoque une diminution de la densité de récepteurs CB1 dans le PFC et le cortex cingulaire en plus d'une diminution du taux d'AEA dans le DS, l'amygdale et L'HPC et d'une augmentation de 2-AG dans l'HPC (**Fig. 18**, Satta *et al.*,2018). Dans cette même étude, un accès quotidien de 2h à la margarine conduit à une augmentation d'AEA dans le NAc et le PFC (**Fig. 18**), un effet qui n'est pas observé avec un accès de 3 jours par semaine, soulignant l'importance de la fréquence d'accès dans ces protocoles. Un résultat similaire a été observé chez des rattes exposées 3 jours/semaine à un régime riche en gras et en sucre (90% de graisse végétale et 10% de saccharose) en combinaison avec une restriction alimentaire le jour précédent. Au terme des six semaines, une analyse en autoradiographie montre une diminution de la densité de CB1 dans le cortex cingulaire et le NAc chez ces rattes (**Fig. 18**, Bello

et al.,2012). Ainsi, ces trois études (Bello *et al.*,2012 ; Blanco-Gandia *et al.*,2017b ; Satta *et al.*,2018) montrent qu'un accès intermittent à un régime riche en gras conduit à une baisse de l'expression de l'ECS, notamment dans le NAc.

Ces résultats peuvent être interprétés comme étant la conséquence d'une augmentation du tonus endocannabinoïde initial provoquant une diminution de l'expression de CB1. À terme, la diminution de la synthèse d'endocannabinoïdes au niveau central pourrait constituer un mécanisme de compensation afin de limiter la prise alimentaire excessive. Il est intéressant de constater que ces adaptations sont sensiblement différentes dans un protocole d'HB au saccharose. Dans cette étude réalisée dans notre laboratoire (De Sa Nogueira *et al.*,2021), des rats exposés 12h/jour pendant 4 semaines à une solution de saccharose 10% (w/v) présentent une augmentation de l'expression de CB1 dans le NAc ainsi qu'une diminution de l'expression de DAGL α . Pour autant, les niveaux d'AEA et de 2-AG analysés par spectrométrie de masse ne sont pas affectés dans le NAc mais les taux d'AEA et de 2-AG sont respectivement augmentés dans le PFC et diminués dans l'HPC (**Fig. 18**). Comme un accès continu de 1-2 semaines à une solution riche en saccharose (23%, w/v) ou fructose (23% w/v) conduit à une augmentation de l'expression de CB1 dans l'HPC chez des rats (Lindqvist *et al.*,2008), il est envisagé que la consommation de saccharose et de gras affectent différemment les structures cérébrales, en particulier celles en lien avec la prise alimentaire et la récompense. Cette potentielle distinction des effets gras vs sucre sur ces structures a été étudiée en comparant l'induction de c-Fos ou Δ FosB suite à un régime riche en gras (croquettes mélangées avec 50% de gras) ou en saccharose (croquettes mélangées avec 50% de saccharose). Le régime riche en gras conduit à une expression de Δ FosB et de c-Fos plus importante dans le PFC et le NAc (Espitia-Bautista & Escobar, 2021). Il est donc possible que ces différences se manifestent également sur l'expression de l'ECS.

II-D-5 : Pistes thérapeutiques visant le système endocannabinoïde dans l'obésité et l'HB.

Pour le moment, il n'existe pas de thérapies médicamenteuses disponibles visant l'ECS afin de lutter contre l'obésité ou l'HB. L'antagoniste CB1 Rimonabant s'est montré efficace dans l'inhibition de la prise alimentaire hédonique chez les rats (Di Marzo & Matias, 2005) et une série d'essais cliniques sur l'Humain a montré sa

capacité à accentuer la perte de poids chez des patients obèse en réduisant l'appétit pour la nourriture palatable (Despres *et al.*,2005). Le succès des essais cliniques sur le Rimonabant a conduit à son autorisation de mise sur le marché en 2006 et sa commercialisation sous le nom Acomplia© dans l'Union Européenne. Cependant, il a été rapporté que la prise d'Acomplia© peut conduire à des effets secondaires psychiatriques lourds avec une augmentation des symptômes dépressifs, de l'anxiété et un risque plus élevé de suicide (Christenssen *et al.*,2007). La gravité de ces effets secondaires observés à la suite de la prise de la molécule a conduit au refus de la commercialiser aux États-Unis par la « Food and Drug Administration » (FDA Advisory Committee of June 13 2007) et au retrait de la molécule sur le marché pharmaceutique européen en 2008. Aujourd'hui la molécule est seulement utilisée dans les études précliniques mais sa réintroduction en clinique a été discutée en raison de ses propriétés anti-inflammatoires pouvant améliorer le pronostic vital de patients obèses. En effet, chez ces patients, le degré d'inflammation présent après l'infection au Covid-19 est positivement corrélé à la masse de tissu adipeux blanc. Cette inflammation peut conduire à une grave détresse respiratoire et à une défaillance multiviscérale (Briand-Mésange, 2020). De plus, un essai clinique a mis en évidence l'efficacité thérapeutique du Rimonabant chez des patients obèses atteints d'HB (Pataky *et al.*,2013), soulignant le potentiel thérapeutique de la modulation de l'ECS dans ces pathologies. Actuellement, les antagonistes CB1 de 2^e et 3^e génération, incapables de passer la barrière hématoencéphalique et agissant strictement dans la périphérie telle que la molécule AM6545 montrent un certain intérêt thérapeutique dans l'obésité et l'HB en réduisant la consommation de nourriture.

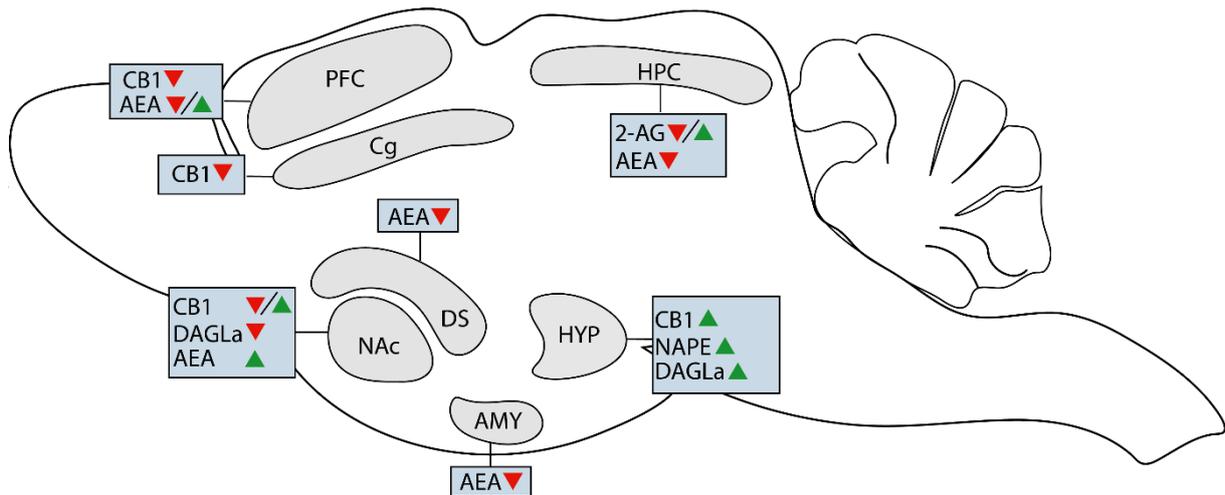


Figure 18 : Neuroadaptations centrales du système endocannabinoïde observées dans les modèles précliniques d'hyperphagie boulimique

Un accès intermittent à un régime obésogène riche en gras ou riche en gras/sucre conduit à des changements de l'expression des éléments du système endocannabinoïde dans certaines structures cérébrales. Les adaptations du système pour chacune des structures (grises) sont indiquées dans les cadres bleus. Les triangles rouges indiquent une diminution de l'expression tandis qu'un triangle vert montre une augmentation de l'expression. Une barre transversale sépare deux adaptations différentes observées au sein d'une même structure pour un élément du système. AMY : Noyau Arqué ; DS : Striatum Dorsal ; Cg : Cortex cingulaire, HPC : HPC ; HYP : Hypothalamus ; NAc : Nucleus Accumbens ; PFC : Cortex préfrontal ; CB1 : Cannabinoid Receptor 1 ; CB2 : Cannabinoid Receptor 2 ; AEA : Anandamide ; 2-AG : 2-arachydonoyglycerol ; DAGLa : Diacylglycerol lipase alpha ; MGL : Monoacylglycerol lipase ; FAAH : Fatty acid amid hydrolase ; NAPE : N-acylphosphatidylethanolamine. Adaptée de Bourdy & Befort, 2023.

OBJECTIFS & HYPOTHÈSES



Objectifs & hypothèses

Dans ce contexte scientifique, mon travail de recherche s'est intéressé au rôle du RMTg dans la régulation de la prise alimentaire. Au regard de l'état des connaissances dans la littérature actuelle, nous nous sommes focalisés sur le rôle des voies RMTg-VTA et RMTg-LH, ainsi que sur les adaptations de l'ECS dans cette structure et dans des régions du circuit de la récompense dans des modèles d'obésité et d'HB. Une étude préliminaire réalisée dans notre laboratoire a montré qu'une lésion totale du RMTg affecte la prise alimentaire. De plus, des études précédentes publiées par notre équipe (Bourdy *et al.*, 2021 ; De Sa Nogueira *et al.*, 2021) ont montré que des modèles de pathologies de la prise alimentaire telles que l'obésité et l'HB conduisent à un changement de l'expression des gènes de l'ECS au sein de structures du circuit de la récompense, circuit modulé par le RMTg. Ce travail s'est divisé en deux grandes parties :

1-Déterminer le rôle des voies RMTg-VTA et RMTg-LH dans le rôle de la prise alimentaire.

Jusqu'à présent, très peu d'études sur le RMTg se sont intéressées au rôle que pouvait avoir cette structure dans la prise alimentaire (Sanchez-Catalan *et al.*, 2021 ; Godfrey *et al.*, 2022 ; Melse *et al.*, 2016). Pourtant, des études neuroanatomiques (Kaufling *et al.*, 2009 & 2010 ; Jhou *et al.*, 2009) montrent qu'elle projette densément à la VTA et au LH, deux structures ayant un rôle majeur dans la régulation de la prise alimentaire hédonique et homéostatique. L'émergence des techniques innovantes comme l'optogénétique et la pharmacogénétique a permis de s'intéresser au rôle spécifique de ces projections (Li *et al.*, 2019 ; Zhao *et al.*, 2022) mais la contribution de chacune de ces voies reste encore à déterminer dans la régulation de la prise alimentaire.

Hypothèse :

Nous faisons donc l'hypothèse que chacune de ces voies pourrait jouer un rôle spécifique dans la consommation de nourriture palatable, dans le sevrage et dans la rechute.

Objectifs :

Objectifs & hypothèses

Dans cette partie, grâce à des outils viraux innovants, nous avons réussi à établir des lésions spécifiques des voies RMTg-VTA et RMTg-LH et nous avons étudié leur contribution relative dans la prise alimentaire en exposant les rats à un régime obésogène pendant six semaines. Dans ce régime (fcHFHS), les animaux ont un accès au choix à un morceau de gras et une solution de saccharose 10% en plus de leur nourriture standard et de l'eau. Nous avons mesuré la consommation de chacun de ces items pendant six semaines d'accès continu ainsi qu'après une période de sevrage de quatre semaines pendant laquelle le gras et le sucre ont été retirés. Lors de cette période de quatre semaines, nous avons mesuré l'activité locomotrice des rats afin d'étudier l'effet des lésions sur les manifestations comportementales de sevrage. Un réaccès à la nourriture palatable après le sevrage nous a permis d'évaluer l'effet de la lésion de la voie RMTg-VTA ou RMTg-LH sur le comportement de « rechute » face à la nourriture palatable.

2-Étudier les adaptations de l'ECS dans l'obésité et l'HB au sein du RMTg et du circuit de la récompense

Les études précédentes réalisées sur le RMTg ont montré que cette structure exprime l'ECS (Lecca *et al.*, 2011 & 2012 ; Melis *et al.*, 2014) mais le rôle de ce système dans le RMTg reste peu connu. D'autre part, des études récentes réalisées au sein de notre laboratoire ont montré que l'expression de l'ECS est affectée dans le circuit de la récompense dans un contexte d'obésité (Bourdy *et al.*, 2021) et d'HB au saccharose (De Sa Nogueira *et al.*, 2021). Toutefois, certains des résultats obtenus dans l'étude sur l'HB contredisent les données issues d'études précédentes (Satta *et al.*, 2018 ; Bello *et al.*, 2012 ; Blanco-Gandia *et al.*, 2017).

Hypothèse :

Nous faisons donc l'hypothèse que l'ECS est régulé, probablement de façon différentielle, dans un modèle d'obésité et un modèle d'HB (saccharose et gras), au sein du système de la récompense et dans le RMTg.

Objectifs :

Objectifs & hypothèses

Dans cette partie, nous avons souhaité compléter la caractérisation des changements d'expression des gènes de l'ECS dans l'obésité et l'HB au sein du circuit de la récompense et nous avons souhaité découvrir si, dans ces pathologies, une modification de l'expression de ce système a aussi lieu dans le RMTg. Pour cela, comme dans la première partie, nous avons exposé des rats à un accès continu de six semaines au régime fCHFHS. En parallèle, un autre groupe de rats a été exposé au même régime, cette fois avec un accès intermittent dans le but de modéliser l'HB. À la fin de ce protocole, les niveaux d'expression des gènes de l'ECS ont été mesurés par RT-qPCR dans le RMTg et des régions appartenant au circuit de la récompense. Les résultats ont été comparés avec ceux d'un groupe contrôle, uniquement exposé à l'eau et la nourriture standard.

MATÉRIELS & MÉTHODES



I- Les animaux

I-A : Souche de rat

Toutes nos expériences sont réalisées chez des rats mâles de la souche Wistar (Janvier Labs, Le Genest-Saint Isle, France, **Fig.19**). Cette souche de rat albinos non consanguine est décrite comme docile, facile à manipuler et avec une longévité optimale pour les études comportementales longues. Les rats sont arrivés, selon les cohortes, avec un poids de 150-300g et sont habitués à la salle et à l'expérimentateur pendant une à trois semaines. Les animaux sont pesés une fois par semaine au minimum et manipulés par l'expérimentateur pendant la période de stabulation.



Figure 19 : Photo d'un rat mâle de la souche wistar. Cette souche de rat a été utilisée dans l'ensemble de nos expériences Source : Janvier-Lab.

I-B : Conditions d'hébergement

Les rats sont arrivés et placés au laboratoire dans des cages individuelles transparentes (36,5 X 22 X 18 cm). À l'exception de l'expérience de restriction alimentaire, les animaux ont un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. L'hébergement individuel a été décidé afin de pouvoir réaliser des mesures de consommation individuelles. Seuls les rats du protocole de traçage sont groupés par trois ou par quatre dans des cages transparentes de grande dimension (54,5 X 33,1 X 20 cm). Les conditions d'hébergement en salle de stabulation et de tests comportementaux sont constantes ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ d'humidité) et la lumière dans l'ensemble des pièces est cyclée (période de 12h d'obscurité / 12h de lumière,

l'allumage ayant lieu à 7h et l'extinction à 19h). En raison de la sensibilité des rats Wistar à la lumière, la luminosité de la pièce d'hébergement est réglée pour être inférieure à 25 Lux (Castelhano-Carlos et Baumans, 2009).

I-C : Réglementation relative à l'expérimentation animale

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la réglementation française et européenne concernant le bien-être animal (Directive Européenne 2010/60/EU- Loi française du code rural R 214-87 131) et ont été validées par un comité d'éthique (Comité Régional D'Éthique en Matière D'Expérimentation Animale de Strasbourg, CREMEAS). Un total de 215 rats a été utilisé lors de cette thèse. L'utilisation des animaux dans les différents protocoles expérimentaux est regroupée sous les numéros APAFIS #9475 et #21394.

II : Chirurgie stéréotaxique

II-A : Procédure de chirurgie stéréotaxique

Nous avons réalisé l'ensemble des chirurgies chez des rats ayant atteint un poids moyen de 350 ± 30 g correspondant à des animaux jeunes adultes d'environ 8-9 semaines. Les coordonnées stéréotaxiques pour nos structures d'intérêts sont décrites chez le rat jeune adulte dans l'atlas Paxinos et Watson (Paxinos et Watson, 2013). Dans le cas où un rat n'a pas atteint un poids jugé suffisant (<300 g) à l'âge de 8 semaines, il est exclu des expériences nécessitant une chirurgie stéréotaxique. Pour l'ensemble des procédures de chirurgie stéréotaxique, les rats sont placés dans une cage d'induction hermétiquement fermée dans laquelle une solution d'isoflurane (4% ISO-VET, Laboratoires Osalia, France) diffuse pour anesthésier l'animal. Nous avons vérifié l'endormissement des animaux avec le pincement des pattes afin de constater l'absence de réflexes suite à une stimulation nociceptive. Le scalp des rats est rasé rapidement avant que l'animal ne soit placé dans l'appareil stéréotaxique (Stoelting©). La tête du rat est immobilisée dans un masque diffusant un mélange d'oxygène (débit de 1,5L/min) et 1% d'isoflurane afin de maintenir l'anesthésie. Les yeux des rats sont protégés avec l'application d'un gel ophtalmique (Lubrital©) afin de prévenir l'assèchement de la cornée. Nous procédons ensuite à l'incision du scalp

verticalement sur deux centimètres. Le sommet du crâne est délicatement gratté avec l'aide d'un grattoir, afin de pouvoir correctement distinguer les points bregma et lambda qui serviront comme repères pour les coordonnées stéréotaxiques. Le crâne est mis à plat et des trous sont percés dans l'os du crâne aux coordonnées d'injections avec l'aide d'une fraiseuse compacte. Pendant toute la chirurgie, l'animal est enroulé dans une couverture de survie posée sur un coussin chauffant afin de maintenir sa température corporelle et sa respiration ainsi que sa température sont monitorées. L'ensemble des procédures chirurgicales sont réalisées par le Dr Romain Bourdy, habilité à la chirurgie sur rongeur.

II-B : Vecteurs viraux

Les expériences ont nécessité l'emploi de trois vecteurs viraux afin de pouvoir affiner la caractérisation des projections du RMTg vers la VTA et le LH et pouvoir établir une lésion projection-spécifique de l'une et de l'autre des voies. Les deux virus rétrogrades de types AAVs utilisés dans le cadre de l'étude neuroanatomique sont les suivants

- AAVrg-EF1a-mCherry-IRES-Cre (Addgène #55632 ; 7×10^{12} vg/mL) (Fenno *et al.*, 2014).
- AAVRg-pENN.AAV.hSyn.HI.eGFP-Cre (Addgène #105540, 7×10^{12} vg/mL, Duan *et al.*, 2021)

Dans les expériences de neuroanatomie avec le traçage rétrograde, l'AAV exprimant la protéine fluorescente mCherry est injecté unilatéralement dans la VTA à droite tandis que l'AAV exprimant la protéine fluorescente eGFP (Enhanced green fluorescent protein) est injecté unilatéralement dans le LH droit. Le sérotype rétrograde des deux virus leur permet d'être internalisés dans la terminaison synaptique et remonter le long des axones des neurones grâce au transport axonal rétrograde (Tervo *et al.*, 2016). L'utilisation de ces deux virus nous permet de distinguer s'il s'agit de deux populations de neurones distinctes au sein du RMTg à l'origine de ces projections (**Fig.20**).

Matériels & méthodes

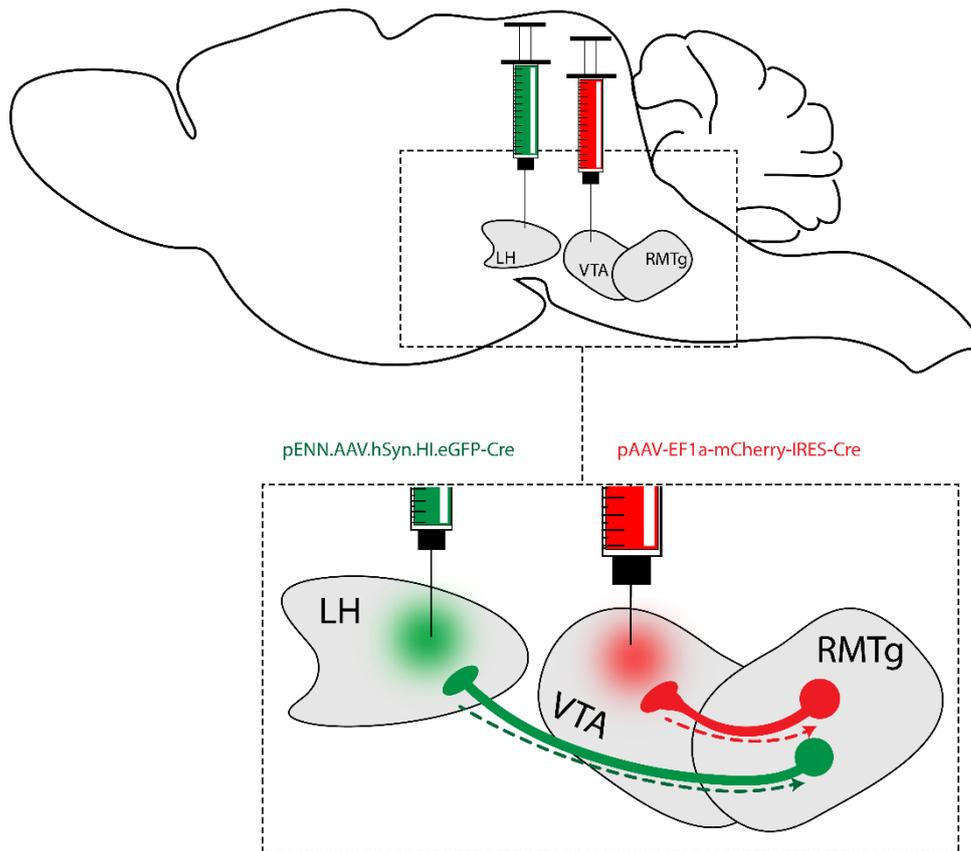


Figure 20 : Caractérisation de la voie RMTg-VTA et RMTg-LH. Le vecteur viral AAVRg-pAAV-EF1a-mCherry-IRES-Cre est injecté unilatéralement dans la VTA droite tandis que le virus AAVRg-pENN.AAV.hSyn.HI.eGFP-Cre est injecté unilatéralement dans le LH à droite. Les particules virales remontent le long des axones (flèches en pointillé) des neurones de la VTA et du LH et sont exprimées dans les noyaux des neurones du RMTg.

Une lésion projection-spécifique de la voie RMTg-VTA ou RMTg-LH est réalisée avec une combinaison entre le virus rétrograde exprimant la protéine eGFP-Cre injecté bilatéralement dans la VTA ou le LH et avec le virus AAV2-flex-taCasp3-TEVp (Casp3; Gene Therapy Center Vector Core, University of North Carolina at Chapel Hill, 7×10^{12} vg/mL, Yang *et al.*, 2013). La présence des deux vecteurs viraux au sein d'un neurone permet l'expression de la protéine Caspase 3 pro apoptotique et ainsi permettre spécifiquement une lésion de l'une et de l'autre voie (**Fig.21**).

Matériels & méthodes

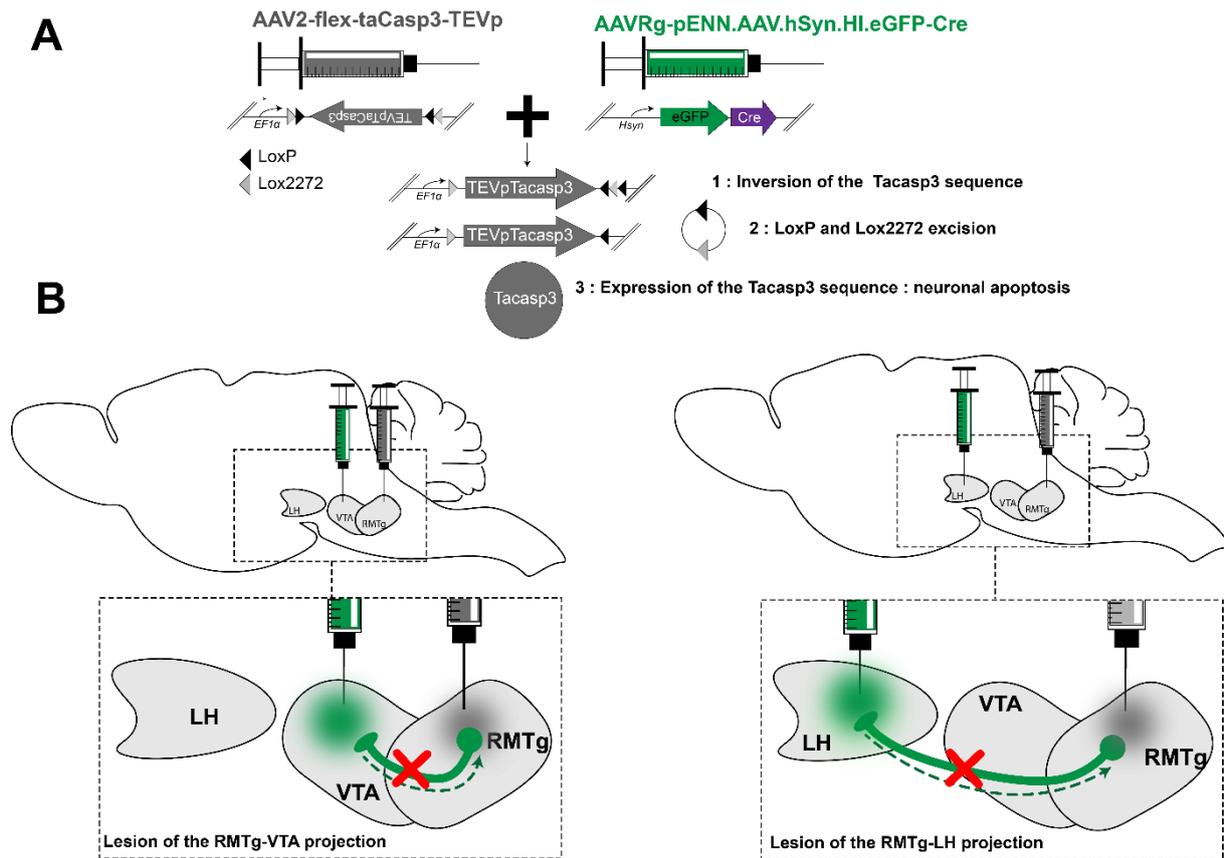


Figure 21 : Schématisation de la lésion de la voie RMTg-VTA ou RMTg-LH.

A Constructions des deux virus utilisés pour la lésion. Le virus Flex-TaCasp3 est doublement floxé et le virus rétrograde exprime la protéine eGFP fusionnée à la Cre. **B** Pour la lésion de la voie RMTg-VTA/LH, le virus rétrograde eGFP-Cre est injecté bilatéralement dans la VTA ou le LH et le virus exprimant la caspase 3 floxée est injecté bilatéralement dans le RMTg. La combinaison des deux virus permet une lésion spécifique des neurones de la voie RMTg-VTA et RMTg-LH.

II-C : Procédure d'injection des vecteurs viraux

Les injections des vecteurs viraux pour établir la lésion de la voie RMTg-VTA ou RMTg-LH sont réalisées aux coordonnées stéréotaxiques suivantes: RMTg : -6.8 mm AP ; \pm 1.5 mm medio-lateral (ML) ; -7.8 mm dorso-ventral (DV) avec un angle latéral de 6°; VTA : -5.00 mm (AP) ; \pm 1.4 mm ML ; -7.2 mm DV avec un angle latéral de 6°; LH : -3.14 mm AP ; \pm 1.4 mm ML ; -7.2 mm DV relatifs au point bregma. Toutes les injections sont réalisées avec une seringue Hamilton de 5 μ L avec une aiguille de 33 gauges contenant 0.3 μ L de virus. L'injection est réalisée manuellement avec un débit d'environ 0.1 μ L/min. La seringue est laissée dans la structure pendant 5 minutes

Matériels & méthodes

après la fin de l'injection pour permettre la bonne diffusion du virus dans la structure. La seringue est très lentement retirée et est rincée à l'eau ultra pure, alcool 70% et à nouveau avec de l'eau ultra pure. Les animaux des groupes contrôles reçoivent une injection de PBS 1X filtré (137 mM NaCl ; KCl 2.7 mM ; Na₂HPO₄ 10 mM ; KH₂PO₄: 1.8 mM) à la place du virus exprimant la Caspase 3 dans le RMTg. À la fin de la chirurgie, l'incision est fermée avec des agrafes chirurgicales stériles et les rats reçoivent en sous cutané 0.2 mL de lidocaïne (Lidocaïne, 2mg/kg, Lurocaïne©) et d'un antidouleur (Metacam® 1 mg/kg). Les animaux sont placés dans leur salle d'hébergement pendant trois semaines pour permettre une expression virale optimale (Tervo *et al.*,2016) . Le poids des animaux, leur aspect général (tonicité, toilettage...) sont surveillés quotidiennement la première semaine post-chirurgie.

II-D : Procédure d'injection du traceur antérograde BDA

Afin de poursuivre la caractérisation anatomique du RMTg le traceur antérograde BDA (Amine dextrane biotinylé, MW 10,000; 5% Carlsbad, California) est injecté dans le RMTg selon la même procédure de chirurgie stéréotaxique que décrite précédemment. Un volume de 0.3 µL du traceur (5% dans une solution de 0.25M d'acétate de potassium) est injecté unilatéralement dans le RMTg aux coordonnées suivantes : -6.8 mm AP ; + 1.5 mm ML ; -7.8 mm DV. Après la chirurgie, les rats sont placés 10 jours dans la salle d'hébergement afin de récupérer et permettre l'expression du traceur avant d'être mis à mort pour l'étude histologique.

III : Protocoles de prise alimentaire.

III-A : Les aliments utilisés

III-A-1 : La nourriture standard

Dans l'ensemble des expériences de lésions virales, les animaux ont eu accès à de la nourriture standard (Mucedola© 4RF21, 3.952 kcal/g contenant 19.42% de protéines, 2.58% de lipides, 5.54% de fibres, 6.76% de matière inorganique, 54.61% d'extraits non azotés (Mucedola, Italie) utilisée classiquement au laboratoire pour les rongeurs. À la suite d'un changement de fournisseur au cours de l'année 2021, la nourriture standard est changée, notamment pour les expériences de restriction alimentaire et les protocoles d'HB (SAFE A03, 3.339 kcal/g contenant 16.1% de

Matériels & méthodes

protéines, 3.1% de lipides, 3.9% de fibres, 4.6% de matière inorganique et 60.4% d'extraits non azotés, Rosenberg, Allemagne). Au sein du laboratoire, le changement de nourriture standard lors d'une expérience en cours a entraîné une prise de poids passagère plus importante chez certaines souris. Pour éviter cet effet, la nourriture standard n'a été changée qu'à la fin de la cohorte 2 du protocole de lésion virale après la mise à mort des animaux.

III-A-2 : Les aliments palatables

La nourriture palatable utilisée dans l'ensemble des expériences consiste en une solution de saccharose 10% (w/v, 10g de sucres dilués dans 100 mL d'eau du robinet, Sucre Semoule, Erstein©, 4kcal/g) et d'un bloc de blanc de bœuf (Vandermoortele©, 9kcal/g, 56% de gras saturés, 44% de gras insaturés) composé à 100% de lipides. La concentration de 10% de saccharose utilisée correspond au taux moyen de sucre présent dans les boissons de type sodas ainsi qu'à la concentration de saccharose décrite comme la plus appétitive pour les rongeurs (Spector & Smith, 1984). Le blanc de bœuf est préalablement fondu et reconditionné dans des moules en silicone afin d'obtenir des blocs de gras rectangulaires d'environ 30g stockés au congélateur pendant la durée de l'expérience.

Dans les protocoles de lésions virales et la première cohorte du modèle d'HB, nous avons utilisé du blanc de bœuf de marque « Vandermoortele ». Le fournisseur de blanc de bœuf a changé entre la 1ère et la 2ème cohorte et nous avons réalisé la seconde cohorte d'HB avec du blanc bœuf de marque « Pâturage des Flandres ». L'apparence et la contenance lipidique et calorique restent très semblables au blanc de bœuf. Comparée à la première cohorte, la consommation de gras avec le second type de blanc est plus importante mais la cinétique d'évolution (escalade de la consommation pendant les trois premières semaines) est similaire.

III-B : Régime obésogène «free choice high fat high sugar (fCHFHS)

III-B-1 : Principe du régime fCHFHS

La consommation de nourriture palatable riche en gras et en sucres est considérée comme l'un des facteurs ayant favorisé le développement de l'obésité et du surpoids (OMS, 2016). Le régime « free choice high fat high sucrose » fCHFHS a été développé par le groupe de La Fleur comme un modèle de diète obésogène

Matériels & méthodes

conduisant à une hyperphagie prolongée (La Fleur *et al.*,2010). Ce protocole permet une modélisation fidèle de l'accès *ad libitum* à de la nourriture palatable et modélise la consommation choisie de nourriture grasse ou sucrée. Ce régime a l'originalité de combiner quatre items comestibles, dont deux palatables. Pendant toute la durée de l'expérience, soit six semaines, les rats ont un accès *ad libitum* à leur nourriture standard habituelle, un morceau de gras, un biberon d'eau contenant 10% de saccharose (w/v), et un biberon d'eau du robinet (**Fig. 22**). Chaque aliment est disposé sur la mangeoire de l'animal de façon à alterner un aliment palatable avec un non palatable. Un séparateur est placé sur la mangeoire pour éviter un contact entre le biberon d'eau sucrée et les croquettes.

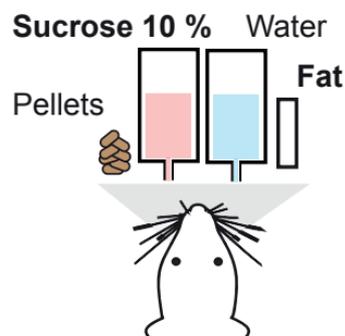


Figure 22 : Illustration du régime obésogène fcHFHS « free choice high fat high sugar ». Les rats ont accès *ad libitum* pendant six semaines au blanc de bœuf (fat) et la solution de saccharose 10% (w/v), l'eau et la nourriture standard. La consommation de chacun des items est monitorée toutes les douze heures pendant six semaines (Illustration issue de Bourdy *et al.*,2021).

III-B-2 : Procédure expérimentale (Fig. 23)

Le régime est réalisé dans la salle d'hébergement des rats. Le début du régime a lieu trois semaines après les chirurgies stéréotaxiques visant à léser spécifiquement la voie RMTg-VTA ou RMTg-LH. La pesée de chacun des items est réalisée deux fois par jour : le matin après l'allumage (7h-8h) et le soir avant l'extinction (18h-19h). Les mesures sont réalisées pendant l'intégralité du régime afin d'évaluer la consommation pendant la phase diurne et la phase nocturne. Une quantité d'aliments est rajoutée dans la mangeoire afin de maintenir une quantité disponible jugée suffisante pour les prochaines heures (au moins 80 g pour les croquettes, 300g pour les biberons, 5g pour le morceau de gras). Le poids des animaux est mesuré une fois par semaine. À la fin des six semaines, les biberons d'eau sucrée et le morceau de gras sont retirés des

Matériels & méthodes

cages pour la période de sevrage de quatre semaines. Pendant cette période, la quantité d'eau et de croquettes consommées ne sont pas monitorées.

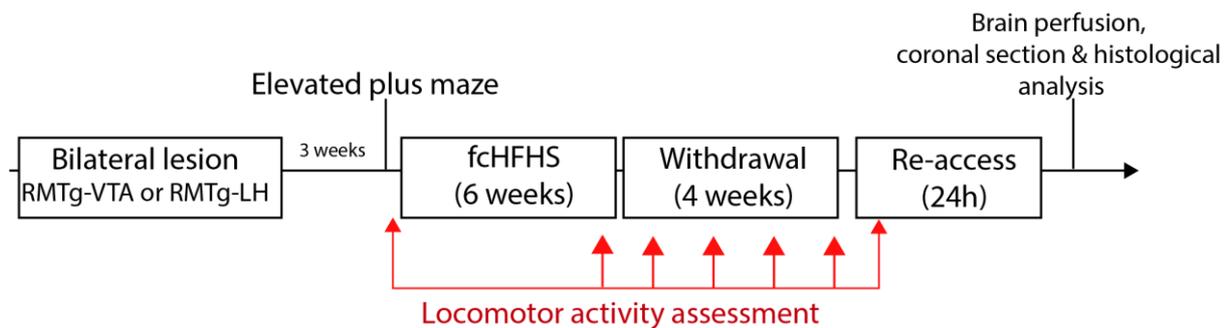


Figure 23 : Frise chronologique de l'évaluation comportementale de la lésion RMTg-VTA et RMTg-LH. Les études comportementales commencent trois semaines après les chirurgies pour établir les lésions projection spécifiques. Le test du labyrinthe en croix surélevé est réalisé avant le début du régime fcHFHS (Free-choice high fat-high sucrose). Après six semaines, le gras et le sucre sont retirés pendant une période de sevrage de 4 semaines avant d'être remis à disposition pendant 24h. Chaque flèche rouge représente une mesure de l'actographie pendant 24h fcHFHS.

III-C : Modèle d'hyperphagie boulimique (HB)

III-C-1 : Principe du modèle

L'HB ou « binge eating disorder » est un trouble alimentaire caractérisé par la consommation en large quantité de nourriture, généralement palatable (Kales *et al.*, 1990) pendant un temps court. Afin de pouvoir caractériser spécifiquement les conséquences de l'HB de celles liées à l'obésité, nous avons développé au sein de notre équipe un modèle d'accès intermittent au gras et au sucre. Ce modèle est basé sur un protocole de HB avec un accès intermittent à du gras (Corwin *et al.*, 1998). Les rats ont accès *ad libitum* à leur nourriture standard ainsi qu'à l'eau. Un groupe expérimental a accès 3 jours par semaine (Lundi, mercredi et vendredi) à du blanc de bœuf et un biberon d'eau contenant 10% de saccharose (w/v).

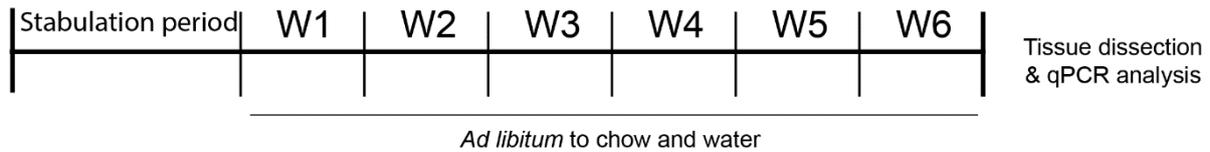
III-C-2 : Procédure expérimentale (Fig. 24).

Matériels & méthodes

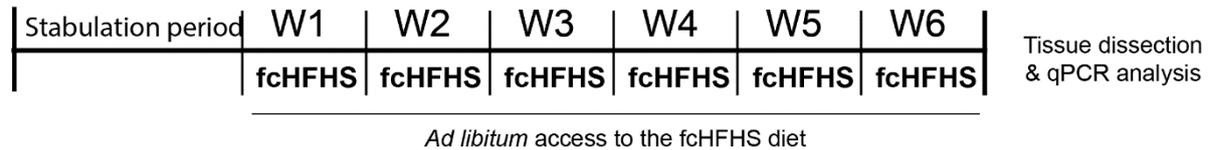
Les animaux sont répartis dans les groupes NA : « No access », CA : « Continuous Access » et IA : « Intermittent Access ». Les animaux du groupe IA ont un accès de 15h à 17h au morceau de gras et à la solution de saccharose 10% (w/v). Cette période correspond au moment où la prise alimentaire des rats est la plus importante pendant la phase d'inactivité (Siegal, 1961). La nourriture standard, l'eau, le biberon d'eau contenant 10% de saccharose (w/v) et le morceau de gras sont pesés à 15h et 17h afin de mesurer la consommation d'aliments pendant les deux heures d'accès. La consommation lors de la première heure d'accès a été mesurée, chez la cohorte 1 et la cohorte 3, le lundi de la 4ème et 5ème semaine. Les jours de non-accès (mardi, jeudi, samedi, dimanche) la nourriture standard et l'eau sont également mesurées à 15h et 17h afin d'avoir la mesure de la consommation totale sur 24h ainsi que la consommation en 2h afin de vérifier que l'hyperphagie n'est présente que lors de l'accès à la nourriture palatable. Le poids des animaux est mesuré une fois par semaine.

Matériels & méthodes

NA group «No-access»



CA Group « Continuous-access »



IA group « Intermittent-access »

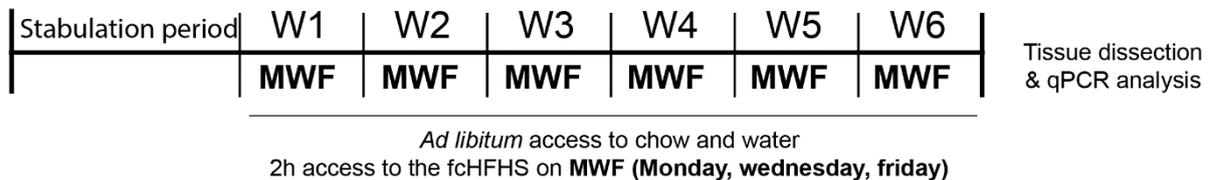


Figure 24 : Frise chronologique du protocole d'HB

Les animaux sont répartis en trois groupes : Un groupe contrôle « No-access » NA, un groupe avec accès continu « Continuous-Access » CA, et un groupe avec un accès intermittent « Intermittent-Access » IA. Pendant six semaines, les rats ont accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture standard, le groupe CA a un accès *ad libitum* a un morceau de gras et une solution d'eau sucrée 10% tandis que le groupe IA a un accès 2h le lundi, mercredi et vendredi (MWF) de 15h à 17h. Après six semaines, les animaux sont mis à mort et les tissus cérébraux, hépatiques, adipeux et sanguins sont prélevés en vue d'une analyse biomoléculaire par qPCR.

III-D : Protocole de restriction alimentaire

III-D-1 : Principe du modèle

Le but de cette expérience est de constater si une restriction alimentaire est suffisante pour induire une activation des neurones du RMTg chez les rats. Les études précédentes (Jhou *et al.*,2009b ; Sánchez-Catalán *et al.*,2021) ont montré des résultats contradictoires sur l'engagement des neurones du RMTg en restriction de nourriture. Dans ce protocole, les animaux ont un accès à de la nourriture restreint pendant une durée de deux semaines afin d'induire une restriction à 90% de leur poids

Matériels & méthodes

initial. Pendant toute la durée de cette restriction, les animaux ont un accès *ad libitum* à l'eau.

III-D-2 : Procédure expérimentale

Les animaux sont dans leur salle d'hébergement, en cage isolée. Le premier jour, les animaux sont pesés afin d'obtenir leur poids initial. L'ensemble de la nourriture de la mangeoire est ensuite retiré des cages à 12h et seul le biberon d'eau est laissé disponible pour l'animal. Les animaux sont laissés en déprivation alimentaire complète jusqu'au lendemain 17h où une croquette de 3-5g est laissée dans la cage. Les animaux sont pesés quotidiennement avant l'accès aux croquettes pendant toute la durée du protocole, la quantité de nourriture est ajustée en fonction de la perte de poids. Au bout de deux semaines, les rats sont mis à mort après avoir perdu environ 10-15% de leur poids initial.

Protocole	Expérience	Nourriture standard	Nourriture palatable	Durée
Free choice high fat high sugar (fCHFHS)	Rôle de la voie RMTg-VTA/LH dans la prise alimentaire hédonique	Eau et croquettes Safe A03 ou 4RF21, accès ad libitum	Blanc de bœuf en bloc de 30g, solution de saccharose 10%, accès ad libitum	Six semaines
Protocole d'HB	Modélisation d'un comportement d'hyperphagie boulimique et comparaison du phénotype avec un accès continu	Eau et croquettes, Safe A03, accès a libitum	Blanc de bœuf en bloc de 30g, solution de saccharose 10%, accès 2h (15h-17h) trois jours par semaine (Lundi, mercredi et vendredi)	Cinq-Six semaines
Restriction alimentaire	Effet de la restriction alimentaire sur l'activation des neurones du RMTg	Eau ad libitum, croquettes Safe A03, accès à 3-5g/jour	Pas de nourriture palatable	Deux semaines

IV : Tests comportementaux

IV-A : Test du labyrinthe en croix surélevé

IV-A-1 : Principe du test

Ce test permet une évaluation du phénotype d'anxiété chez des rongeurs. Les branches fermées du labyrinthe sont « rassurantes » tandis que les branches ouvertes sont « anxiogènes » pour les rongeurs. Ainsi, un animal considéré comme non anxieux va explorer les branches ouvertes et fermées du labyrinthe. Le niveau d'anxiété est évalué environ trois semaines après les chirurgies pour les animaux avec une lésion. Ce test permet une vérification du phénotype comportemental post-lésion du RMTg (Jhou *et al.*,2009b). Il nous permet également de déterminer si ce phénotype provient de l'une de nos voies d'intérêt.

IV-A-2 : Procédure expérimentale

Le dispositif est fait de Plexiglas noir, il est élevé de 73 cm et se compose de quatre bras (50 cm x 10cm), deux bras sont fermés par des murs de 40-cm de hauteur et deux bras sont ouverts et ne comportent qu'une bordure de 1.5-cm de hauteur. Les bras ouverts et fermés se font face (**Fig.25**). La luminosité est ajustée avec quatre lampes halogènes placées dans les coins de la pièce, dos au labyrinthe. L'intensité lumineuse est réglée avec un luxmètre pour être à 10 lux dans les bras ouverts, 4 lux dans les bras fermés et 7 lux au centre. Ces intensités sont choisies conformément aux études réalisées au sein du laboratoire (Mathis *et al.*,2015 ; Loureiro *et al.*,2012). Une caméra est installée au-dessus du labyrinthe et est reliée à un écran derrière un mur où se place l'expérimentateur afin de scorer manuellement les entrées/sorties ainsi que le temps passé dans chacune des branches. Les tests sont réalisés de 10h à 13h au moment où l'activité locomotrice est la plus stable (Honma *et al.*,1987). Les animaux sont placés dans une pièce adjacente 1h avant le début du test et chaque rat est placé dans une cage propre sans sciure, sans eau et sans nourriture 5 minutes avant le début du test puis placé dans la pièce du labyrinthe. Le test a une durée de cinq minutes et démarre par le placement du rat dans le centre du labyrinthe face à un bras fermé ; le bras fermé choisi est alterné entre chaque animal. Lors du test, une entrée dans un bras est comptabilisée quand les quatre pattes de l'animal sont placées dans la branche. Entre chaque rat, le labyrinthe et la cage de transport sont nettoyés à l'alcool 70% et rincés à l'eau ultra-pure.

A



B

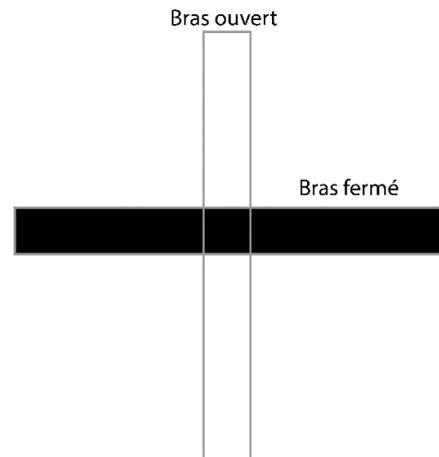


Figure 25 : Labyrinthe en croix surélevé.

Le labyrinthe (Photo **A**, Schéma **B**) est composé de deux branches fermées de deux branches ouvertes, chaque branche fait 50cm de long pour 10cm de diamètre. Le labyrinthe est élevé 73 cm au-dessus du sol. Pour chaque test, le rat est placé au centre du labyrinthe face à une branche fermée. Le temps d'exploration et les entrées dans chacune des branches sont comptabilisés, une entrée est considérée quand le rat a les 4 membres dans la branche.

IV-B : Mesure de l'activité locomotrice des animaux

IV-B-1 : Principe du test

L'activité locomotrice est mesurée à différents niveaux du protocole de lésion viral et permet d'évaluer si les lésions, l'accès continu au régime, le sevrage ou la réexposition à la nourriture palatable induisent des modifications de l'activité motrice. Les racks de la pièce sont équipés de cellules infrarouges placées deux à deux disposées en parallèle de telle façon que pour chaque cage, deux lasers invisibles traversent la cage de l'animal. L'interruption successive de ces deux lasers par le passage de l'animal est comptabilisée par le logiciel comme 1 passage (**Fig.26**). Les rats sont placés dans la salle, une heure avant le début de l'expérience afin de les habituer à la pièce. Les rats sont placés dans de nouvelles cages propres avec peu de sciure afin de faciliter l'enregistrement des mouvements. L'eau et la nourriture (palatable ou standard) ne sont pas retirées des cages pendant toute la durée de

Matériels & méthodes

l'expérience. Le logiciel est ensuite programmé pour se lancer 1h après la mise en place des rats pour un enregistrement de 24h, les trois premières heures serviront de période d'habitation. Les données analysées correspondent au nombre de traversées effectuées par le rat sur des plages de cinq minutes.

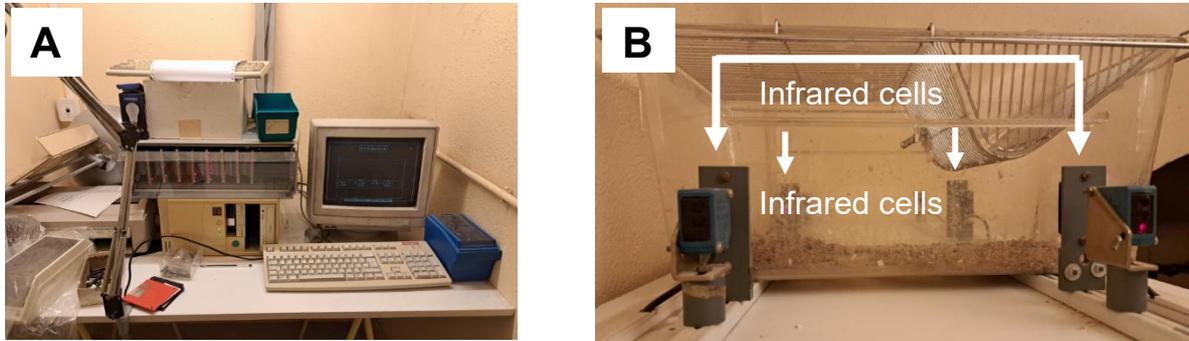


Figure 26 : Système d'actographie utilisé dans la mesure de l'activité locomotrice des animaux.

Le système informatique **A** est relié à un ensemble de cellules infrarouges disposées le long des racks. Chaque rat est placé dans une cage positionnée entre quatre cellules infrarouges **B** de façon à créer deux faisceaux lasers qui traversent la cage de part en part. Un passage est comptabilisé quand un rat va traverser les deux faisceaux.

IV-C : Protocole du « Food Choice Arena »

IV-C-1 : Description de l'arène

Ce test est développé au sein du laboratoire dans le but de pouvoir évaluer le comportement d'approche de l'animal face de la nourriture palatable. Il est réalisé chez des animaux CA et IA de la première cohorte du protocole d'HB. Le principe et la disposition de l'arène sont inspirés à partir de précédentes publications utilisant une arène similaire (Nieh *et al.*, 2016 ; Mohammad *et al.*, 2021).

L'arène consiste en un champ ouvert d'une dimension de 60X60 cm avec des murs d'une hauteur de 15 cm. Elle est élevée de 60 cm au-dessus du sol et repose sur une plaque transparente en Plexiglas couverte d'un film adhésif noir afin d'avoir une couleur de fond uniforme sur l'ensemble de la surface. Deux lampes halogènes sont placées dans deux coins de la pièce et tournées vers les murs. L'intensité lumineuse

des lampes est réglée de façon à ce que la luminosité soit de 4 lux dans l'ensemble de l'arène. Deux boîtes de pétri de 5 cm de diamètre sont fixées dans deux coins opposés de l'arène et serviront à contenir les croquettes ou le morceau de gras. Deux attaches pour biberons sont installées dans les deux autres coins opposés de l'arène et serviront pour le placement du biberon d'eau ou d'eau contenant 10% de saccharose (w/v). Une caméra HD (ASHU Webcam 1080p) est fixée sur la partie horizontale d'une potence de 180 cm située au-dessus de l'arène. La caméra est reliée à un ordinateur portable situé près de la porte (**Fig.27A**)

IV-C-2 : Procédure expérimentale

Avec le logiciel de tracking ANY-maze (Bailoo *et al.*,2010 ; Stoelthing©), nous délimitons des zones de tailles égales que l'on nomme « chow » « fat » « sugar » et « water ». Le nom de chaque zone correspond à l'item qui se trouve au centre de la zone. Nous avons également délimité une sous-zone « head » dans chaque zone de façon à obtenir quatre sous-zones « head chow » , « head fat » « head sugar » et « head water ». Ces sous-zones correspondent à un cercle placé au centre des boîtes de pétri et au niveau des embouts de biberons et serviront pour le suivi des mouvements de la tête de l'animal (**Fig.27B**). Lors de l'habituation et du test, le rat est amené dans la salle 5 minutes avant le début de l'enregistrement.

Chaque rat est habitué à l'arène vide deux fois pendant 30 minutes avant d'être testé deux fois dans l'arène. Les rats du groupe IA ont été habitués un jour où ils n'avaient pas d'accès à de la nourriture palatable. Lors des deux tests, le rat est d'abord placé pendant 30 minutes dans l'arène vide afin de limiter autant que possible l'effet de la nouveauté de l'environnement. Le rat est ensuite remis dans sa cage, l'arène est nettoyée avec une solution d'éthanol 70% suivie d'un rinçage à de l'eau ultra pure. Un morceau de gras ainsi que quelques croquettes sont rajoutés dans les boîtes de pétri situées dans les coins de l'arène tandis que les biberons d'eau et la solution contenant 10% de saccharose (w/v) sont fixés dans les deux autres coins. Chaque item est préalablement pesé avant d'être placé dans l'arène. Le rat est à nouveau placé dans l'arène et l'enregistrement vidéo est démarré pour une période de 1h. Que ce soit lors des habituations ou des tests, le rat est placé au centre de l'arène, la tête face à un mur. Le mur qui fait face au rat est alterné d'animal en animal, l'expérimentateur sort de la pièce après avoir placé le rat et d'avoir démarré l'enregistrement. Le corps et la tête de l'animal sont suivis avec le logiciel ANYmaze. Les entrées du corps, et de la

Matériels & méthodes

tête (zone head) ainsi que le temps passé dans chacune des zones sont comptabilisés. À la fin du test, le rat est sorti de l'arène, les aliments sont pesés et l'arène est nettoyée. Les tests et habituations sont réalisés sur la période 12h-18h, les tests des animaux du groupe IA sont réalisés un jour où les animaux s'attendent à recevoir de la nourriture. palatable.

Head tracking zone

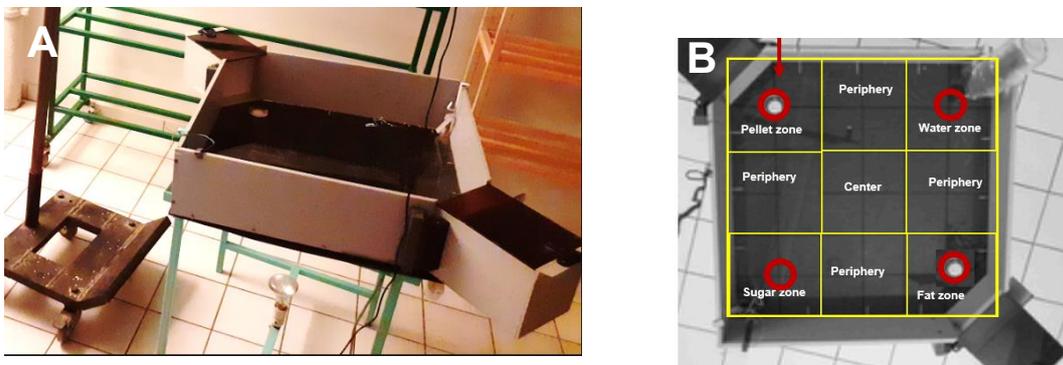


Figure 27 : Arène du protocole de « Food choice Arena ».

Photo de côté **A** et vue du dessus **B**. Les délimitations des zones en jaunes et en rouges sont réalisées avec le logiciel ANYmaze, le corps de l'animal est suivi dans les zones jaunes tandis que la tête est suivie dans les zones rouges.

V : Prélèvements des tissus

V-A : Mise à mort des animaux et fixation des tissus

Les animaux de l'expérience de lésions virales sont mis à mort par d'overdose d'un mélange d'anesthésiques (xylazine, Rompun© 2% 11mg/kg et kétamine, Imalgène© 82.5mg/kg ; i.p.). L'ouverture du thorax a lieu lorsque l'absence de tout réflexe nociceptif (après pincement de la patte) est constatée par l'expérimentateur. Une canule, couplée à un tube péristaltique et connectée à une pompe préalablement réglée sur une vitesse de 10mL/min, est implantée et maintenue par un clamp dans l'aorte de l'animal. Après coupure de l'oreillette droite et clampage de l'aorte descendante, une solution de PBS-1X est injectée à travers la circulation sanguine pendant 3 minutes afin d'exsanguiner le rat puis une solution de Paraformaldehyde (PFA) à 4% est diffusée pendant 15 minutes. En cas de doute sur la qualité de la perfusion avec le PFA, cette étape a pu être prolongée jusqu'à 30 minutes. La rigidité prononcée de la partie supérieure du corps de l'animal indique une bonne perfusion. Les rats sont décapités et le cerveau est extrait de la boîte crânienne puis placé 24-48h dans une solution de PFA 4% à 4°C afin de parfaire la fixation. Le cerveau est ensuite conservé à 4°C pendant 72h dans une solution de D-Saccharose à 30% (w/v) pour permettre la cryoprotection du tissu. Le cerveau est congelé par immersion pendant 60 secondes dans une solution d'isopentane à -50°C, le cerveau est emballé dans un morceau de papier aluminium avant d'être conservé dans à -80°C.

V-B : Mise à mort des animaux et prélèvements de tissus frais

Les analyses biomoléculaires sont réalisées sur les rats du protocole d'HB. Les animaux sont mis à mort après cinq à six semaines, les rats du groupe IA sont mis à mort un jour où ils n'ont habituellement pas accès au gras et au sucre (mardi et jeudi) pour éviter que l'effet observé sur l'expression génique soit dû à une anticipation de la nourriture palatable. La mise à mort est réalisée par une injection de pentobarbital (140 mg/kg, i.p) après administration d'anesthésique (mélange xylazine (11mg/kg) et kétamine (82 mg/kg)). Le cerveau de chaque animal est prélevé, coupé en tranches de

Matériels & méthodes

1-mm dans une matrice pour cerveau de rats et les régions ont été collectées bilatéralement avec l'aide d'un atlas stéréotaxique (Paxinos & Watson). Les régions prélevées sont le PFC (prélèvement de 3mm, de bregma 4.68 à 2.5 mm, deux coupes), le Nac (prélèvement de 1.9 mm de 3 à 0.6 mm du point bregma, 2 slices), la VTA (prélèvement de 1mm, de bregma -5 à -6 mm, une coupe), l'ARC (prélèvement de 1.9 mm de -2.04 à -3.6 mm du point bregma), le striatum dorsal (prélèvement de 3mm de bregma 2 à bregma -0.96), le RMTg (prélèvement de 1mm, bregma -6 à bregma -7mm), le LH (prélèvement de 1.5 mm de -2.65 à 4.00) et l'amygdale (prélèvement de 0.5 mm de -3.15 à -2.65). Les tissus prélevés sont conservés à -80°C.

VI : Analyses histologiques

VI-A : Immunohistochimie et traçage antérograde

VI-A-1 : Coupe de cerveaux au cryostat

Les cerveaux sont coupés à l'aide d'un cryostat (Leica 3050S) en sections coronales de 40µm d'épaisseur. Pour la totalité des expériences, les coupes du RMTg et/ou LH et/ou VTA sont récoltées dans des puits contenant une solution de cryoprotectant (Solution d'éthylène glycol) et stockées à -20°C.

VI-A-2 : Protocole général d'immunohistochimie

Les coupes sont rincées avec une solution de PBS 1X trois fois pendant 10 minutes sous agitateur. Les coupes sont incubées à température ambiante pendant 45 minutes avec une solution de PBS-Triton 0.5% contenant 5% de sérum de cheval (Thermofisher©) afin de bloquer les sites antigéniques aspécifiques. Les coupes sont incubées toute une nuit à température ambiante dans une solution de PBS 1X contenant l'anticorps primaire à la concentration mise au point. Après incubation, les coupes sont rincées avec trois bains de PBS 1X de 10 minutes chacun.

VI-A-3 : Immunohistochimie à révélation au diaminobenzidine (DAB)

Après le rinçage, les coupes sont à nouveau incubées pendant 45 minutes à l'obscurité avec un mélange des réactifs A et B (Vecstatin, ABC-HRP Kit, Peroxidase) puis rincées avec deux bains de PBS de 10 minutes et un bain de tampon Tris-HCL (1M, 121g de Tris dans 1L) deux fois dix minutes également. Pendant les rinçages aux

Matériels & méthodes

Tris, la solution de DAB est préparée avec 5 mL d'eau ultrapure, 2 gouttes de Buffer, 4 gouttes de DAB et 2 gouttes d'H2O2. La solution de DAB est incorporée dans les coupes après le dernier bain de Tris pendant l'agitation, les coupes sont rincées avec trois bains de PBS 1X de 10 minutes afin d'interrompre la réaction.

VI-A-4 : Protocole d'immunofluorescence

Les coupes sont incubées 1h30 à température ambiante, à l'obscurité, dans une solution de PBS contenant l'anticorps secondaire. Les coupes sont ensuite rincées au PBS avant d'être montées entre lames et lamelles dans un milieu de montage MOWIOL (Sigma-Aldrich©) contenant 1 : 2000 de DAPI (Thermofisher©).

VI-A-5 : Mises au point des protocoles d'immunohistochimie.

Les analyses histologiques ont parfois nécessité des procédures de mises au point. Nous avons parfois utilisé plusieurs anticorps contre la même cible et/ou testé différentes concentrations afin d'obtenir un marquage adéquat. Certains anticorps, initialement utilisés en routine en DAB, ont été mis au point pour une utilisation en immunofluorescence (IHF). L'immunomarquage est vérifié par microscopie optique et/ou à épifluorescence.

VI-A-5-1 : Mise au point de l'immunohistochimie anti-NeuN

Le marquage des neurones peut être réalisé avec une IHC anti-NeuN (Neuronal Nuclei), un gène exprimé spécifiquement dans les neurones. Deux anticorps anti-NeuN sont utilisés lors de nos expériences en fonction des stocks disponibles dans le laboratoire : Un anticorps anti-NeuN rabbit (Merck© Millipore ABN78) et un anticorps anti-NeuN mouse (Merck© Millipore MAB377). L'anticorps anti-NeuN Rabbit est testé avec succès en DAB avec une dilution à 1 :2000 et en IHF avec une dilution en 1 :1000. L'anticorps anti-NeuN mouse, utilisé quand l'anticorps Anti-NeuN rabbit été en rupture de stock, a été testé en IHF avec une dilution au 1 :1000 et 1 :500. Dans les deux cas, nous avons constaté une absence de marquages pour cet anticorps.

VI-A-5-2 : Mise au point de l'immunohistochimie anti-FoxP1

Le marquage des neurones du RMTg peut être réalisé par une IHC contre la protéine FoxP1 (Lahti *et al.*,2016 ; Smith *et al.*,2019). L'IHC anti-FoxP1 a été testée en DAB (1 :1000) et en IHF (1 :1000) sur des coupes de cerveaux réalisées pendant

l'année 2018 et conservées à -20 °C dans du cryoprotectant. Cependant, les cerveaux n'ont pas été cryoprotégés avant la congélation, par conséquent, nous n'avons pas obtenu de marquages visibles que ce soit en DAB ou en IHF. Un nouvel essai en IHF sur des coupes de RMTg d'un cerveau de rat Sprague-Dawley cryoprotégé et conservé au -80 a permis d'obtenir un marquage spécifique de la protéine FoxP1 dans le RMTg.

VI-A-5-3 : Mise au point de l'immunohistochimie anti-c-Fos

Parce que l'anticorps contre FoxP1 a été fait chez le lapin, le double marquage FoxP1 et c-Fos des neurones du RMTg après restriction alimentaire a nécessité un anticorps anti-c-Fos issu d'une espèce différente. L'anticorps anti-C-Fos Mouse (Abcam #ab208942) est testé sur des coupes de RMTg d'un rat ayant reçu une injection de cocaïne, l'injection de cocaïne a été vue comme inducteur de c-Fos dans la structure (Geisler *et al.*, 2008). Cet anticorps a été testé avec une dilution à 1 :500 et 1 :1000 et n'a pas permis de voir un marquage punctiforme spécifique comme attendu. Par la suite, nous avons testé un anticorps Anti-C-Fos Guinea Pig (Synaptic System, #226 308) en IHF avec une dilution de 1 :2000, 1 :1000 et 1 :500. Les dilutions au 1 :1000 et 1 :500 ont permis d'obtenir un marquage spécifique de la protéine c-Fos dans le RMTg. Par la suite, la dilution à 1 :500 en IHF est utilisée puisqu'elle permet d'obtenir un marquage plus visible.

VI-A-5-d : Mise au point d'immunohistochimie anti-orexine A

L'IHC contre l'orexine-A est réalisée avec l'aide de l'anticorps Goat Anti-orexine A (Santa Cruz®, Cat. Sc-26491) testé en préalable en DAB avec une dilution au 1 :4000 sur des coupes de LH avant mon arrivée au laboratoire. Un test avec une dilution à 1 :2000 de cet anticorps en IHF sur des coupes de LH a permis d'obtenir un marquage spécifique des neurones Orx.

VI-A-5-4 : Mise au point de l'immunohistochimie anti-tyrosine hydroxylase

Le marquage des neurones dopaminergiques de la VTA est réalisé avec une IHF contre la TH (Merck Millipore MAB318), l'enzyme limitante de la synthèse de la dopamine (Daubner *et al.*, 2011). Avant mon arrivée au laboratoire, cet anticorps a été testé en DAB avec une dilution de 1 :1000. Le test de l'anticorps en IHF est réalisé

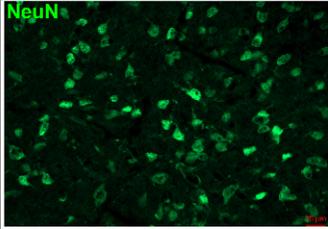
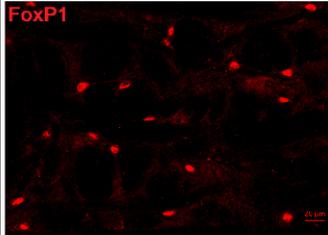
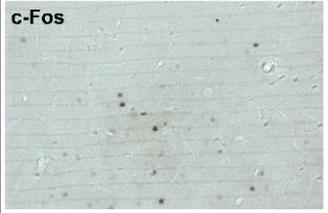
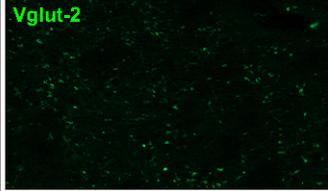
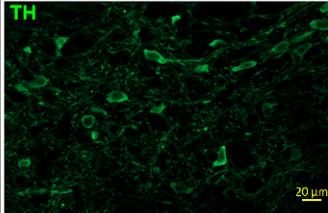
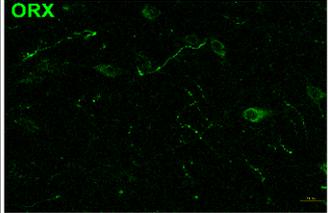
également en 1 :1000 sur des coupes de cerveaux de rats Sprague-Dawley « test », cette dilution a permis d'obtenir un marquage très visible de la TH.

VI-A-5-5 : Mise au point de l'immunofluorescence anti-VGLUT2 et GAD65/67

Nous avons réalisé une IHF contre la protéine VGLUT2 et l'enzyme GAD65 & GAD67 après l'injection d'un traceur antérograde dans le RMTg afin d'identifier la présence d'apposition entre les neurones du RMTg et les neurones Glutamatergiques et/ou GABAergiques du LH. L'IHF contre VGLUT2 (Merck Millipore Ab225) a été testée avec une dilution à 1 :5000 et 1 :2000, cette dernière a permis d'obtenir un marquage spécifique de VGLUT2 mais un co-marquage avec la protéine NeuN ne nous a pas permis de distinguer spécifiquement les neurones exprimant VGLUT2. Cependant, l'IHF contre la protéine GAD65/67 (Abcam Ab183999), bien que testée avec une dilution à 1 :500 et 1 :1000, n'a pas permis de mettre en évidence un marquage spécifique des neurones GABAergiques.

Matériels & méthodes

Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés

Espèce	Cible	Source	Dilution DAB	Dilution IHF	Structure	Résultats (IHF ou DAB)
Lapin	NeuN	Merck Millipore ABN78	1:1000	1:1000	LH	
	GAD65/67	Abcam Ab183999	Non testée	1:1000 1:500	LH	Absence de marquage spécifique
	FoxP1	Abcam Ab1665	1:1000	1:1000	RMTg	
	c-Fos	Synaptic System #226 003	1:8000	Non testée	LH	
Cobaye	Vglut2	Merck Millipore Ab2251	Non testée	1:5000 1:2000	LH	
	c-Fos	Synaptic System # 226 308	Pas de test	1 :2000 1 :1000 1 :500	RMTg	
Souris	c-Fos	Abcam (ab208942)	Pas de test	1:1000	RMTg	Marquage aspécifique
	Tyrosine Hydroxylase	Merck Millipore MAB318	1:1000	1:1000	VTA	
	NeuN	Merck Millipore MAB377	Pas de test	1:1000 1:500	LH	Marquage aspécifique
Chèvre	Orexine-A	Santa Cruz Cat. Sc-26491	1:4000	1:2000	LH	

Matériels & méthodes

VI-A-6 : Amplification et visualisation du traceur antérograde

La localisation correcte du site d'injection de la BDA dans le RMTg est validée avec un marquage avec de la Streptavidine exprimant un fluorophore (Streptavidin, Alexa Fluor 594 Conjugate, ©Invitrogen). La Streptavidine se fixant à la biotine, le site d'injection du traceur est alors visible en microscopie à épifluorescence (Zeiss Apotome.2). Un échantillonnage tous les 120 µm de coupes du RMTg, soit 8-10 coupes, est rincé avec des bains de PBS (3x10 minutes) avant d'être incubé pendant 45 minutes dans une solution de PBS-T 0.5% contenant la Streptavidine diluée à 1 : 400. Un certain nombre de coupes a subi une étape en plus d'amplification de la BDA avec un kit d'amplification (VectaStain, ABC-HRP kit) afin de voir si l'amplification permet d'obtenir un meilleur marquage. Les coupes sont incubées pendant une nuit à température ambiante avec une solution de PBS-T 0.5% contenant un mélange du réactif A et B du Kit Vectastain au 1 :500. Les coupes sont rincées au PBS 3x10 minutes et incubées avec la Streptavidine.

VI-B : Analyses histologiques du tissu hépatique

VI-B-1 : Prélèvements du tissu hépatique et du tissu adipeux blanc

Lors de la mise à mort des animaux du protocole d'HB (**Cf Matériels & Méthodes, V-B. Mise à mort des animaux et prélèvements de tissus frais**), le tissu hépatique ainsi que le tissu adipeux blanc inguinal ont été disséqués, nettoyés et pesés. Un échantillon de tissu adipeux blanc est prélevé et gardé dans un tube eppendorf de 1.5mL avant d'être conservé dans la glace carbonique. Pour le foie, un morceau de lobe a été coupé et conservé dans un tube eppendorf dans l'optique d'une analyse biomoléculaire. Un morceau du foie a également été prélevé et congelé à l'isopentane à -40°C pendant 60 secondes dans l'optique d'une analyse histologique des tissus.

VI-B-2 : Coupes du tissu hépatique

Afin de visualiser les conséquences métaboliques de l'accès intermittent ou continu à la nourriture palatable, nous avons prélevé le tissu hépatique chez les animaux de la 2eme et 3eme cohorte du protocole de bHFHS. Les échantillons sont

Matériels & méthodes

conservés à -80°C avant d'être coupés au cryostat. Des coupes de foies de 10 µm sont réalisées et sont récupérées directement sur lames. Pour chaque animal nous avons réalisé six lames conservées à -20 °C avant les colorations.

VI-B-3 : Coloration des tissus hépatique en Red-Oil

Le colorant Red-Oil-O ou Red-Oil permet un marquage des triglycérides et est utilisé en histologie dans l'optique de déterminer la présence de lipides dans un tissu. La coloration Red-Oil-O est associée avec la coloration en hématoxyline utilisée couramment en études histologiques. Cette coloration basique a une affinité pour les milieux acides et ainsi permet une coloration des noyaux du tissu en bleu/violet. Le colorant Stock pour le Red-Oil-O est préparé à partir de 500 mg de poudre Red-Oil-O (Sigma-Aldrich) solubilisés dans 100mL d'isopropanol 99%. La solution Stock est diluée avec de l'eau ultra pure puis est filtrée avec un papier filtre avant utilisation. La filtration du Red-Oil se fait idéalement avec du papier Whatman de Grade 1 (Whatman ©) mais peut être réalisée avec des filtres à café ou du papier filtre classique suffisamment épais. L'étape de filtration est critique vis-à-vis de la qualité de la coloration et peut s'avérer longue pour de gros volume (>1h). La coloration au Red-Oil-O et à l'Hématoxyline sont réalisées sur une partie des lames de coupes de foies par une succession de bains comme décrit ci-dessous :

Étape	Procédé	Temps
1	Hydrater les lames dans du PBS.	2 min
2	Placer les lames dans le bac avec la solution de Red Oil. Agiter doucement.	3 min
3	Laver les lames dans un bac d'isopropanol 60 %.	30 sec
4	Rincer les lames dans un bac d'eau, laisser l'eau du robinet couler dans le bac pour renouvellement continu.	1 min
5	Placer les lames dans le bac contenant la solution de Harris (hématoxyline). Agiter doucement régulièrement.	3 min

Matériels & méthodes

6	Rincer les lames dans un bac contenant de l'eau du robinet, en laissant toujours un filet d'eau pour un renouvellement continu.	2 min
7	Monter les lames dans une solution aqueuse (Aquatex).	

VI-B-4 : Coloration des tissus hépatique en Hématoxyline/Éosine

L'hématoxyline est un colorant basique qui est très affiné pour les milieux acides et ainsi colore les noyaux du tissu en bleu. Une coloration Hématoxyline/Éosine permet de distinguer l'infiltrat cellulaire dans les tissus hépatiques, signe d'une probable inflammation. Certaines lames de tissus hépatiques sont colorées selon les étapes suivantes.

Étape	Procédé	Temps
1	Filtrer la solution de Harris	
2	Placer les lames quelques secondes dans le bain d'acétone puis laisser sécher au moins 1h dans l'incubateur à 37°C.	1h
3	Plonger les lames dans l'eau pour rinçage.	1min
4	Plonger dans un bain de colorant de Harris.	2min
5	Bain d'eau courante. Laisser un filet d'eau couler jusqu'à ce que l'eau soit claire (env. 1min) puis laisser juste dans le bac jusqu'à la fin du chrono.	3min
6	Bain d'alcool acide.	2sec
7	Bain d'eau courante. Laisser un filet d'eau couler jusqu'à ce que l'eau soit claire (env. 1min) puis laisser juste dans le bac jusqu'à la fin du chrono.	3min
8	Bain de coloration d'éosine.	1min
9	Bain d'eau courante, 3-4 allers-retours.	3sec
10	Bain d'eau courante, 3-4 allers-retours.	1min
11	Bain d'Éthanol 100%.	2min

12	Fixer la lamelle sous la hotte avec 3 gouttes de solution de fixation non aqueuse.	
----	--	--

VI-C : Acquisition et analyse d'images

VI-C-1 : Acquisition des images

L'acquisition des images est réalisée avec un microscope à épifluorescence avec module apotome (Apotome.2 Zeiss) relié à une caméra (Orca Flash 4.0 LT, Hamamatsu) grâce au logiciel ZEN 2 (Zeiss). Ces acquisitions sont réalisées avec l'objectif X2.5 et X10 dans l'optique d'une analyse qualitative d'un marquage. Une analyse quantitative du marquage avec ce microscope a pu être réalisée dans le cadre de l'analyse du marquage de la protéine c-Fos après restriction alimentaire. En effet, le marquage étant suffisamment localisé pour qu'une prise d'image à l'objectif X20 permette de réaliser une quantification sur le RMTg.

Les coupes du RMTg, de la VTA et du LH des animaux ayant reçu des injections de vecteurs viraux sont scannées au NanoZoomer (Hamamatsu) avec un objectif X40 et ces coupes sont analysées à l'aide du logiciel NDPview (Hamamatsu) et QuPath (Bankhead *et al.*, 2017) pour quantification et analyse du marquage fluorescent.

VI-C-2 : Quantification des neurones

Les neurones FoxP1 positifs (rouge) et eGFP positifs (vert) sont quantifiés semi-automatiquement grâce à QuPath sur l'ensemble de l'antéropostériorité de la structure. Le RMTg est délimité bilatéralement sur un ensemble de 10 coupes espacées de 100 μm sur l'axe antéro-postérieur. Le comptage des noyaux exprimant FoxP1 est réalisé grâce au programme de comptage automatique du logiciel QuPath avec les paramètres suivants.

Paramètres	Valeurs	Explications
Background radius	20 μm	Exclusion de tous les éléments ayant un rayon > 20 μm
Sigma	1	Valeur « standard » sans ajustement de l'image par floutage

Matériels & méthodes

Threshold	4 pour eGFP et 6 pour DSRed	Seuls les pixels ayant une intensité $\geq 4-6$ sont considérés pour le comptage
Cell. Exp	0	Cette fonction sert à déterminer la taille du cytoplasme en simulant l'expansion de la cellule par rapport au noyau. La valeur mise à 0 parce que le comptage ne se fait que sur les noyaux
Nucleus Area	30-1000	Seuls les noyaux ayant une taille de 30-1000 μm^2 sont considérés par le comptage

L'ensemble de ces paramètres a été validé par un comptage manuel réalisé en parallèle d'un comptage automatique sur le marquage FoxP1 (DSRED) et eGFP.

VII : Analyse de l'expression du système endocannabinoïde

VII-A : Analyse de l'expression du système endocannabinoïde dans le RMTg et les structures associées

VII-A-1 : Extraction de l'ARN et qPCR

L'extraction des ARNs est réalisée avec 0.8mL d'UptiZol RNA Extraction Reagent (Interchim®), les tissus sont homogénéisés avec l'utilisation de Potter en plastique pendant 2-3 minutes dans la glace. Un volume de 160 μL de chloroforme est rajouté après l'homogénéisation et les tubes sont centrifugés (12 000 g, 10 minutes, 4°C) afin de séparer la phase aqueuse supérieure contenant les ARNs et la phase organique. La phase aqueuse est prélevée et incubée pendant 12h à -20°C après rajout de 400 μL d'isopropanol afin de précipiter l'ARN. Les tubes sont à nouveau centrifugés (12 000 g, 15 minutes, 4°C) afin de précipiter le culot d'ARN. Le surnageant est retiré et le pellet d'ARN est rincé à l'éthanol 75% glacé. L'étape de rinçage est répétée deux fois avant de laisser le pellet d'ARN sécher à l'air libre pendant 1h. Le pellet d'ARN est récupéré dans une solution d'eau ultrapure dont le volume est dépendant de la structure utilisée et l'ARN est dissous dans un bain-marie de 60°C pendant 5 minutes. La quantification de la concentration d'ARN est réalisée avec le NanoVue (GE Healthcare) après incubation des échantillons une nuit à -20°C. La transcription inverse de l'ARN en ADN est réalisée avec 750ng d'ARN avec l'enzyme iScript (iScript

Matériels & méthodes

cDNA Synthesis Kit, Biorad, France). La PCR en temps réel est réalisée en triplicats avec le Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad, France) dans l'appareil CFX96 Touch (Biorad, France). Chaque puit de la plaque PCR (96 puits) contient le mélange suivant :

- 7.5 µL de SYBR Green
- 4 µL d'eau ultrapure
- 0.5 µL de cDNA
- 3µL de primer dilués 1 :100 dans de l'eau ultrapure.

Les paramètres du cycle thermique sont les suivants : 30 s à 95°C, suivi par 40 cycles d'amplifications avec 5 secondes à 95°C et 45 secondes à 60°C. L'expression des gènes est normalisée au gène Rplp0 aussi nommé 36B4, un gène de ménage utilisé couramment dans le cerveau dans le cadre d'étude sur la prise alimentaire (Fan *et al.*,2020). L'expression est comparée entre le groupe contrôle et expérimental en utilisant la méthode de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001) :

$$(1) \Delta Cq_{\text{gène d'intérêt, rat X}} = Cq_{\text{gène d'intérêt, rat X}} - Cq_{\text{gène de référence, rat X}}$$

$$(2) \Delta\Delta Cq_{\text{gène d'intérêt, rat X}} = \Delta Cq_{\text{gène d'intérêt, rat X}} - \Delta Cq_{\text{moyen}_{\text{gène X, groupe contrôle}}}$$

$$(3) ER_{\text{gène d'intérêt, rat X}} = 2^{-\Delta\Delta Cq_{\text{gène d'intérêt, rat X}}}$$

Les laboratoires Roche recommandent de diluer le cDNA jusqu'à 20 fois avec de l'eau ultrapure afin de limiter la présence d'agents inhibiteurs de la PCR, tels que le phénol ou la guanidine thiocyanate, présents dans l'ARN après extraction au Trizol. Nous avons testé l'expression du gène 36B4 sur une gamme de dilutions de cDNA de cerveau (dilutions 1, 1 :2, 1 :5 et 1 :10). Les résultats obtenus ont montré que la dilution jusqu'à 1 :5 permet une expression correcte de 36B4 (Valeur de Cq entre 21 et 23). De ce fait, nous avons dilué le cDNA à 1 :5 avec de l'eau ultrapure. Les quantités totales d'ARN pour le RMTg et la VTA étant très faibles (cohorte 2 HB, < 0.3µg), la transcription inverse a été réalisée avec 80 ng (VTA) ou 100 ng (RMTg). Par contre, pour la qPCR, les échantillons de cDNA n'ont pas été dilués (trop de variabilité).

Tableau de primers utilisés

Gène	Séquence « Forward »	Séquence « reverse »	Référence
Rplp0 (NM_022402)	CTGCCCGAGCCGGTGCCAT C	TTCAATGGTACCTCTGGAG	(De Sa Nogueira et al.,2021 ; Bourdy et al.,2021)
Cnr1 (NM_012784)	TCTGCTTGCATCATCATGG TGT	AGATGATGGGGTTCACGGTC	
Cnr2 (NM_001164143)	AATGGCGGCTTGGATTCAA	TAGAGCACAGCCACGTTCTC	
Nape-Pld (NM_199381)	AGAGATCCGTGGCGATTCA C	ATCGTGACTCTCCGTGCTTC	
MgII (NM_138502)	GTTGAAGAGGCTGGACATG C	TCACGTGCTGCAACAAATCT	
FAAH (NM_001369126)	CCCCAGAGGCTGTGTTCTTT	GTCAGATAGGAGGTCACGCA	
DAGL- α (XM_039079785.1)	AGTGATCTGACCATCGCCC TTTCA	ACTGTTTCAGCAGGGTGGTTATG GA	
GPR55 (XM_006245493.4)	GTCGTCTTCGTGGTCTCCTT	GATGTTAGAGAAACACAGAGAC AACTG	(Hurst et al.,2017)

VIII : Statistiques

VIII-A : Logiciels utilisés

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R-studio 4.0.2 et GraphPad Prism 9.1 (Graphpad Software, La Jolla California USA). L'ensemble des résultats est présenté en moyenne \pm Erreur type de la moyenne (sem). Le seuil de significativité choisi pour l'ensemble des tests statistiques est fixé à 5%.

VIII-B : Vérifications de la normalité et de l'égalité des variances

Nous avons contrôlé la distribution normale des données avec le test de Schapiro-Wilk et la visualisation du diagramme Quantile-Quantile (qqplot). Ce diagramme permet de comparer une distribution théorique normale avec la distribution réelle des données. La visualisation de cette courbe est nécessaire en complément de l'analyse par Schapiro-Wilk dans le cas d'une analyse avec de faibles effectifs où les tests de normalité peuvent être faussés (Vetter, 2017). L'égalité des variances a été vérifiée avec le test de Levene.

VIII-C : Tests statistiques utilisés

VIII-C-1 : Comparaison de deux groupes

La comparaison de moyennes entre deux groupes a été réalisée avec un test de Student avec la correction d'Aspin-Welch en cas d'inégalité des variances. L'analyse de la prise alimentaire sur six semaines, ainsi que le comptage des neurones sur l'antéropostériorité d'une structure ont été réalisées avec une Two-Way ANOVA à effet mixte suivi par un post-hoc de Bonferroni dans le cadre d'un effet de groupe ou de l'interaction du groupe avec le second facteur.

VIII-C-2 : Comparaison de trois groupes

L'analyse de l'expression génique après qPCR a été réalisée gène par gène avec une ANOVA à 1 facteur. Une ANOVA significative a été suivie avec un post-hoc avec comparaison entre les groupes expérimentaux et le contrôle par le test de Fisher de différence des moindres carrés. Ce test post-hoc a l'avantage de présenter une forte puissance statistique mais son utilisation demeure controversée en raison de l'absence de corrections des comparaisons multiples pouvant conduire à une inflation du risque alpha. Or, la démonstration mathématique de ce test montre que dans la situation de $K=3$ comparaisons, l'erreur de 1^{ere} espèce est maintenue à la valeur alpha souhaitée de base, soit 5% dans notre cas (Meier, 2006).

VIII-D : Analyse en clusters et en composantes principales (PCA)

VIII-D-1 : Principe de l'analyse en cluster

L'objectif d'une analyse en clusters, notamment en K moyens, est de diviser un ensemble de données en « K » clusters dans l'optique d'expliquer la variabilité de certaines données. Le nombre idéal de cluster « K » est trouvé à partir de la méthode des coudes ou « Elbow method », elle consiste à représenter graphiquement la somme des carrés intragroupes, qui représente la distance entre les points de données d'un même cluster théorique, en fonction du nombre de clusters K. Le nombre de clusters « idéal » est défini comme le K le plus petit pour avoir une distance minimale entre les points d'un même cluster, graphiquement cela correspond au point d'inflexion de la courbe formant un « coude » (**Fig.28**).

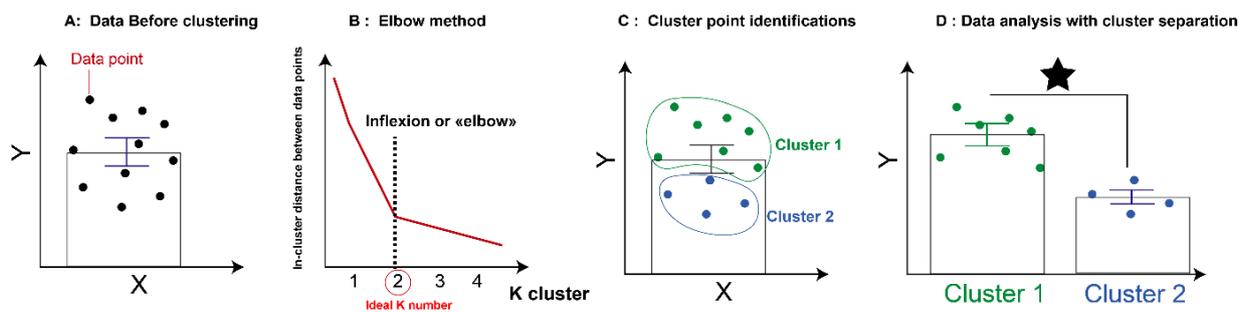


Figure 28 : Illustration du principe de la séparation en cluster de la méthode des coudes.

À Avant la séparation en clusters, les points de données (cercle noir) présentent une certaine dispersion inexpliquée. **B** La méthode des coudes permet de distinguer à partir de quel nombre K la distance entre les points d'un même cluster est la plus faible. Ce nombre est défini comme la valeur de K pour laquelle la courbe commence son inflexion en formant un « coude ». **C** L'analyse de clusters permet de séparer nos points de données initiaux en deux clusters expliquant la variabilité de notre set initial : le cluster 1 (vert) et le cluster 2 (bleu). **D** Après la séparation, l'analyse statistique révèle la présence d'une différence significative (étoile) entre les moyennes des clusters 1 et 2.

VIII-D-2 : La clusterisation en K-moyens (K-mean clustering)

L'analyse des K-moyens permet d'avoir une séparation en clusters qui minimise au plus possible la distance entre les points d'un cluster et son centroïde, défini comme étant le centre du cluster. De ce fait, la séparation des points de données en clusters sera définie en fonction du nombre de centroïdes choisis. L'algorithme des K-moyens lance l'initialisation de plusieurs centres de clusters de façon aléatoire. Chaque point est assigné à son centre de clusters le plus proche à chaque passage de l'algorithme. L'algorithme se répétera jusqu'à ce que la variabilité entre clusters soit la plus faible possible. Dans l'ensemble de nos analyses en K-moyens, l'algorithme est choisi pour se répéter au moins 25 fois afin de trouver la séparation en cluster « idéale » (**Fig.28**).

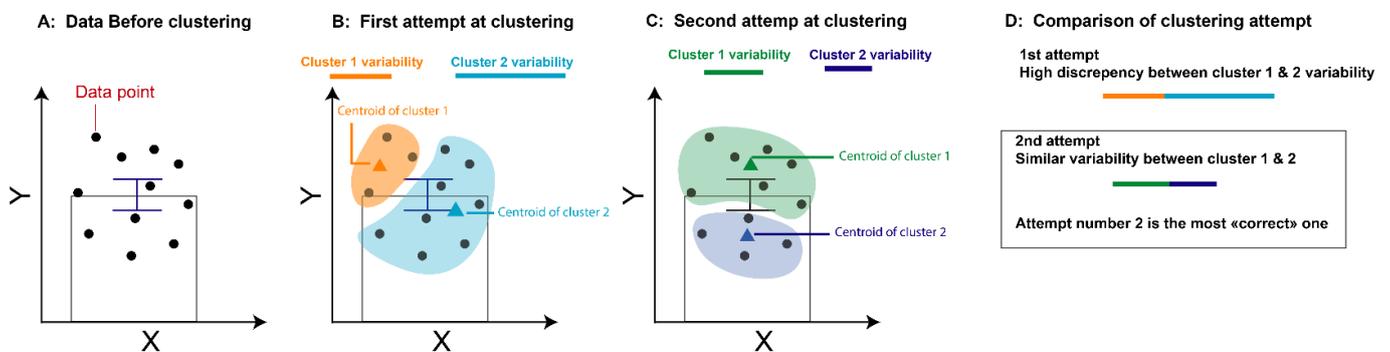


Figure 29 : Illustration du principe de la clusterisation en K-moyens & de l'analyse en composante principale

A Avant la séparation en clusters, les points de données (cercle noir) présentent une certaine dispersion que l'on tente d'expliquer la raison en K=2 cluster. **B** L'algorithme de clusterisation des K-moyens établit aléatoirement deux clusters en se basant sur la distance des points et calcule la variabilité des points dans chacun des clusters. **C** L'algorithme effectue une nouvelle séparation en 2 clusters aléatoires. **D** L'algorithme compare la variabilité des clusters obtenus dans la 1ere et 2eme tentative et établit que la tentative numéro 2 est la plus adéquate en raison de la variabilité semblable entre les deux clusters.

VIII-D-3 : Principe de l'analyse en PCA

L'analyse en composantes principales (PCA) est une méthode qui vise à identifier les variables d'un set de donnée qui expliquent le plus fidèlement possible la séparation en cluster obtenue. En effet, la séparation en clusters d'un set de donnée est le plus souvent basée sur plusieurs variables mais la clusterisation en elle-même ne permet pas d'identifier quel(s) paramètre(s) est/sont les plus impliqué(s) dans cette séparation de données. L'analyse en PCA permet d'identifier ces variables (**Fig.29**).

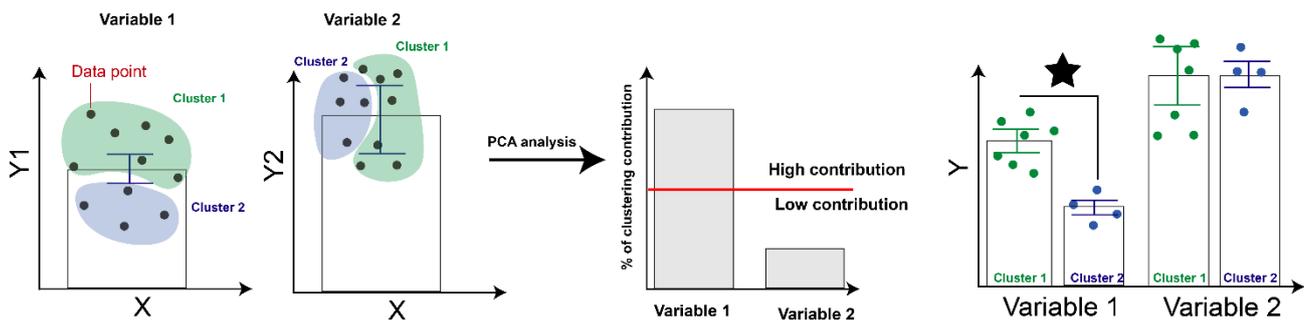


Figure 30 : Illustration du principe d'analyse en composante principale

Les données d'un set sont séparées en deux clusters (Cluster 1 & Cluster 2) comme vu précédemment, cependant la séparation en clusters est établie selon deux variables (Y1 et Y2) et la contribution de chacune des variables n'est pas connue. L'analyse en PCA permet de déterminer quelle variable contribue le plus à la séparation en cluster. Le pourcentage de contribution de chacune des variables est calculé ainsi que la valeur théorique (ligne rouge) d'une contribution égale des variables 1 & 2 à la clusterisation. La contribution de la variable 1 est au-dessus de cette valeur théorique, elle contribue donc fortement à la séparation obtenue tandis que la variable 2 n'y contribue que faiblement. La réanalyse des variables 1 et 2 après la séparation en cluster confirme les résultats de PCA : on observe une différence significative entre le cluster 1 et le cluster 2 pour la variable 1 mais pas de différence pour la variable 2.

VII-D-4 : Paquets de R utilisés pour les analyses des K-moyens

La séparation en clusters, l'analyse des K-moyens et l'analyse en composantes principales ont été réalisées à partir des paquets « factoextra » (<https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/index.html>), « FactoMineR » (<https://cran.r-project.org/web/packages/FactoMineR/index.html>) et la visualisation des données pour ces analyses a été réalisée avec le paquet « ggpubr » (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html>).

RÉSULTATS



Partie 1 : Caractérisation du rôle de la voie RMTg- VTA et RMTg-LH dans la prise alimentaire hédonique

Au vu des projections du RMTg vers le VTA et le LH, nous avons choisi d'étudier le rôle de chacune de ces voies (RMTg-VTA et RMTg-LH) dans la régulation de la prise alimentaire. Pour cela, nous avons procédé à une lésion spécifique de chacune de ces voies avec l'aide d'une combinaison de vecteurs viraux, puis nous avons étudié le comportement de prise alimentaire après la lésion de l'une et de l'autre des voies. Pour cela, les rats ont été exposés à un régime obésogène fCHFHS pendant six semaines et nous avons mesuré la consommation de chacun des aliments toutes les douze heures. De plus, nous avons également étudié l'effet de la lésion sur le comportement moteur des rats lors d'une période de sevrage de quatre semaines où le gras et le sucre du régime ont été retirés. Enfin, nous avons procédé à un réaccès de 24 heures au régime fCHFHS durant lesquelles nous avons mesuré l'activité locomotrice des rats et leur prise alimentaire. Les résultats de cette étude constituent la première publication issue de ce travail de thèse.

I : Manuscrit soumis Article 1 : « The rostromedial tegmental nucleus gates fat overconsumption through ventral tegmental area output »

Florian Schoukroun, Katia Befort*, Romain Bourdy*

Journal : **Neuropsychopharmacology**

Abstract

Excessive consumption of palatable foods that are rich in fats and sugars has contributed to the increasing prevalence of obesity worldwide. Similar to drugs of abuse, such foods activate the brain's reward circuit, involving mesolimbic dopaminergic projections from the ventral tegmental area (VTA) to the nucleus accumbens (NAc) and the prefrontal cortex. Neuroadaptations occurring in this circuit contribute to uncontrolled consumption of such foods, a common feature of most of eating disorders and obesity. The rostromedial tegmental nucleus (RMTg) is an inhibitory structure projecting to the VTA and the lateral hypothalamus (LH), two key brain regions in food intake regulation. Prior research has demonstrated that the RMTg responds to drugs of abuse and influence their impact on mesolimbic activity and reward-related behaviors. However, the precise role of the RMTg in food intake regulation remains largely unexplored. The present study aimed to investigate the role of the RMTg and its projections to the VTA and the LH in regulating food intake in rats. To do so, we examined eating patterns of rats with either bilateral excitotoxic lesions of the RMTg or specific lesions of RMTg-VTA and RMTg-LH pathways. Rats were exposed to a 6-week 'free choice high-fat and high-sugar' diet, followed by a 4-week palatable food withdrawal and a 24h. re-access. Our results indicate that RMTg-VTA pathway lesion increases fat consumption during the diet and palatable food relapse following the 4-week withdrawal. These findings suggest that the RMTg influence palatable food consumption and relapse through its projections to the VTA..

Introduction

Feeding is a survival function that maintains energy balance, which also contains a pleasurable aspect when it concerns high calorie palatable foods, known as hedonic feeding. Although innate attractiveness to such energy-rich food was evolutionary advantageous during periods of scarce food for early hunters -gatherers, it appears inappropriate in our modern societies regarding last decades environmental changes related to low cost, energy-dense food and sugary drinks increased availability (Hill and Peters, 1998; Demeke *et al.*, 2023). Compulsive overeating of such palatable food is a common feature of eating disorders and obesity, representing serious health threats. Palatable food activates brain reward systems, similarly to drugs of abuse, involving adaptations that could explain a switch from controlled to uncontrolled overeating (Kenny, 2011).

Central regulation of food intake involves the homeostatic system maintaining energy balance between caloric intake and energy expenditure, within hypothalamic nuclei. On the other hand, hedonic feeding is mainly driven by the reward system, consisting of mesolimbic dopamine (DA) projections from the ventral tegmental area (VTA) to the nucleus accumbens (NAc) and prefrontal cortex. It is activated by palatable food and processes food-reward related information including hedonic value of food and emotional satiety. The lateral hypothalamus (LH) has a particular place as it is reciprocally connected to the VTA and the NAc (Ferrario *et al.*, 2016) and thus can be considered as a bridge for the regulation of both homeostatic and hedonic feeding. Human and animal studies suggest that eating disorders and obesity are both associated with altered dopamine signaling and function (Balodis *et al.*, 2013; Quansah Amisah *et al.*, 2021). Excessive palatable food intake alters reward processing associated with a hyposensitivity to palatable food consumption and a hypersensitivity to predictive palatable food cues (Volkow *et al.*, 2017). LH neurons encode reward-seeking actions and are involved in compulsive sucrose seeking (Nieh *et al.*, 2015), feeding suppression (Jennings *et al.*, 2013), and palatable foods alter their reward encoding properties (Rossi *et al.*, 2019). This highlights the VTA and LH as complex and crucial neuroanatomical hubs in feeding and reward.

The rostromedial tegmental nucleus (RMTg) is a bilateral cluster of GABA neurons starting from the caudal edge of the VTA and extending in the reticular formation, initially described in rats (Bourdy and Barrot, 2012). Several studies pointed few transcription factors that are expressed quite specifically and at high levels in RMTg neurons (Smith

et al., 2019). Among them, *Foxp1* represents a useful tool used in multiple labs for the delineation of neuroanatomical boundaries of RMTg in rodents (Jhou; 2021; Castillo-Rolon *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022). The RMTg receives inputs from widely distributed afferent brain regions similar to the VTA, including the LH and sends massive projections to midbrain DA neurons and to the LH (Jhou *et al.*, 2009a; Kaufling *et al.*, 2010). The RMTg exerts a direct tonic inhibitory drive onto VTA DA neurons and responds to rewarding and aversive stimuli, associated-predictive cues, and reward omissions (Hong *et al.*, 2011; Jhou *et al.*, 2009b). Both food deprivation and food negative prediction error increase cellular activity in the RMTg (Jhou *et al.*, 2009b; Sanchez-Catalan *et al.*, 2022). A recent study showed that an acute overnight fast decreases the excitability of RMTg GABA neurons and alters synaptic strength at LH GABA to RMTg GABAergic synapses (Godfrey *et al.*, 2022) is an effect that could contribute to VTA DA neurons disinhibition and foraging. Although RMTg is involved in food-related negative prediction error and food deprivation, little is known about its influence on palatable food intake. We therefore hypothesize that the RMTg is part of a feeding regulatory network involving both the VTA and the LH and that chronic suppression of its inhibitory drive could affect hedonic feeding.

In the present study, we investigated the role of the RMTg and its main outputs (VTA and LH) in palatable food consumption in a 6-week free choice obesogenic diet (Bourdy *et al.*, 2021) and during palatable food re-exposure following a 4-week palatable food withdrawal (WD). To this aim, we first used neuroanatomical tract tracing to decipher RMTg-VTA and RMTg-LH connectivity. We then disrupted RMTg function using either excitotoxic lesions or a selective ablation of RMTg neurons projecting to the VTA or LH using AAV-mediated projection-specific lesion to evaluate the consequences on food intake. We evaluated potential changes in basal and palatable food-related locomotor activity and anxiety-like phenotype during the experiments.

Material & Methods

Overview of the experiments

Three experiments were conducted. The first experiment (Exp.1) consisted of a neuroanatomical approach to better characterize RMTg-VTA and RMTg-LH main outputs. (**Fig.1**). In the second and third experiments, we used lesional approaches to

investigate the consequences of RMTg ablation (Exp.2, Excitotoxic lesions, as in Bourdy *et al.*, 2014; **Fig.3**) or the contribution of RMTg-VTA (**Fig.4**) and RMTg-LH pathways (**Fig.S5**) (Exp.3, viral approach) on food intake in an obesogenic diet and after re-access (Re-A) following a 4-week palatable food withdrawal (WD). We assessed the impact of the excitotoxic or the projection-specific lesion on the anxiety-like phenotype and the locomotor activity at diverse time points of our protocol (see **Fig. 2**). In a parallel experiment, we investigated the impact of RMTg excitotoxic lesions on the number of LH orexin neurons (OX) and NAc cellular activity (c-Fos imaging) following the obesogenic diet (**Fig. S2**).

Subjects

A total of 130 male Wistar Rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint Isle, France) weighting 180 ± 20 g at arrival were individually housed in standard cages in a temperature and humidity-controlled environment in light-controlled room (lights on 07:00–19:00). Rats were habituated for three weeks to housing conditions with *ad libitum* access to standard chow (4RF21, 3.952 kcal/g containing 19.42% proteins, 2.58% lipids, 5.54% fibers, 6.76% ash, 54.61% nitrogen-free extract, *Mucedola, Italy*) and water. All procedures involving animal care were conducted in compliance with current laws and policies validated by the CREMEAS (Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale de Strasbourg) and approved by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation APAFIS # 2017040311573635 v2). All efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Surgical procedure

At the time of surgery, rats weighed 350 ± 30 g. They were anesthetized (isoflurane 4%,) and placed in a stereotaxic frame before receiving a 0.2 mL injection of lidocaine-bupivacaine mix (Lurocaïne® - lidocaïne 2 mg/kg, Bupivacaine Mylan®-bupivacaine 2 mg/kg) Holes were drilled in the skull and injections were performed using Hamilton syringes with a 33-gauge needle (0.1 μ L/min, 0.3 μ L) at the corresponding coordinates: RMTg : -6.8 mm antero-posterior (AP) ; \pm 1.5 mm medio-lateral (ML) ; -7.8 mm dorsoventral (DV) with a 6° lateral angle ; VTA : -5.00 mm (AP) ; \pm 1.4 mm ML ; -7.2 mm DV with a 6° lateral angle; LH : -3.14 mm AP ; \pm 1.4 mm ML ; -7.2 mm DV relative to the bregma. BDA 10000 (5% in 0.25 M potassium acetate) and ibotenic acid (1% in

phosphate-buffered saline (PBS) 0.1 M) were respectively unilaterally (right) and bilaterally injected at RMTg coordinates (Exp.1 and 2). For retrograde tracing experiments, retrograde viruses AAVrg-pENN.AAV.hSyn.HI.eGFP-Cre (AAV-retrograde; Addgene#105540) and AAVRg- -Ef1a-mCherry-IRES-Cre (AAV-retrograde Addgene#55632) were respectively unilaterally injected in the right hemisphere in the LH and the VTA of the same animal (Exp.1). For projection-specific lesion experiment, AAVRg- pENN.AAV.hSyn.HI.eGFP-Cre virus was bilaterally injected either in the VTA or in the LH, and AAV2-flex-taCasp3-TEVp (Casp3; Gene Therapy Center Vector Core, University of North Carolina at Chapel Hill) was bilaterally injected in the RMTg during the same surgical procedure (Exp.3). Control rats received injections of filtered 1X PBS in similar conditions. The incision was closed with wound-closure sterile clips and rats received 0.2 ml subcutaneous injection of lidocaine-bupivacaine mix solution (Lurocaïne® - lidocaine 2 mg/kg, Bupivacaine Mylan®-bupivacaine 2 mg/kg) and an analgesic (Metacam® -meloxicam 1 mg/kg). Animals were then allowed to recover for 1 (Exp.1) or 2 weeks (Exp.2) and behavioral testing began 2 to 3 weeks after surgery to allow for excitotoxic lesions and viral expression (Exp.1 and 3).

Behavioral measurements

The Elevated Plus maze (EPM) test was performed 3 weeks following the lesions. The apparatus was made of black Plexiglas, elevated 73 cm above the floor, and consisted of four arms (50 cm × 10 cm), two comprising 40-cm-high walls (closed) and two comprising 1.5-cm-high borders (open). Light intensity was 10 lux in open arms, 7 lux at the center of the maze, and 4 lux in closed arms. The test lasted 5 min. Each rat was placed in the center of the maze facing a closed arm. The number of entries and time spent in each arm were manually scored using a video tracking device mounted above the maze. The procedure occurred between 10 a.m. and 1 p.m. and the maze was cleaned with distilled water and absolute ethanol between each rat.

Locomotor activity was measured in home cages equipped with two infrared light beams, before and after the diet and once a week during the 4-week withdrawal period, for 24 hours. Activity was also measured during the re-access phase (**Fig. 2**). Numbers of longitudinal cage crossings, i.e., each time a rat consecutively interrupted the two light beams, were counted in 5-min bins. A habituation phase was conducted with 1h

to the room, and 3h to the set-up. Results are presented as day or night activity. To mitigate the influence of novel-environment-induced hyperactivity, the habituation period was deducted from the daytime measurements.

Obesogenic diet

Animals were exposed to a free-choice high-fat high-sugar diet for 6 weeks, as previously described (Bourdy *et al.*, 2021). Briefly, in addition to an *ad libitum* access to standard chow (4RF21, Mucedola, Italy) and tap water, rats had access to saturated fat (« blanc de bœuf », Vandermoortele, France) and a bottle of 10% sucrose dissolved in water (Powder Sugar, Erstein France). Animals were weighted once per week and food and liquid intake were recorded every 12 hours at the beginning and at the end of the light period. The total caloric intake was calculated per day for each rat. At the end of the 6-week access, both fat and sucrose were removed for 4 weeks (PFW). Intake during re-access to palatable food was measured at 1, 4 or 24 h for AAV-mediated lesions experiments and 1 and 4 hours for excitotoxic lesions experiments.

Perfusion & Immunohistochemistry

Rats were deeply anesthetized (xylazine, Rompun 2% 11mg/kg and ketamine, Imalgène 82.5mg/kg) and perfused through the heart (4% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer). Brains were extracted, postfixed (4% Paraformaldehyde) for 24 h and cryoprotected in 30% sucrose for 72h. Coronal sections of 40µm were cut (Cryostat Leica 3050 S) through the RMTg, VTA and LH. Free floating sections of the VTA, LH and RMTg were rinsed with PBS (3x, 10 min), incubated 1h at room temperature in PBS containing 0.5% Triton X-100 and 5% of horse serum and rinsed again with PBS. Sections were incubated overnight with either the polyclonal rabbit anti-FoxP1 antibody (1 :1000, #ab16645, Abcam), the rabbit anti-c-Fos polyclonal antibody (1:8000, Millipore Corp USA), or the rabbit anti-NeuN polyclonal antibody (1:1000, #ABN78, Millipore Calbiochem), or the mouse anti-Tyrosine Hydroxylase monoclonal antibody (1:1000; AB318 MilliPore Calbiochem) or the goat anti-Orexine-A (1:2000 , Cat. Sc-26491, Santa Cruz) in PBS-0.5% Triton X-100 at room temperature. The slices were rinsed again the following day and incubated 3 h at room temperature with either the donkey anti-rabbit Alexa 594 plus secondary antibody (1:500, #A32754, invitrogen Thermo Fisher Scientific), or the donkey anti-mouse Alexa

Fluor 488 (1:500, #A-21202, Invitrogen), or the goat anti-rabbit IgG Biotinylated (1:500, BA1000, ZC0908, Vector Laboratories), or the donkey anti-goat Alexa Fluor 350 (1:500, #A-21081 ThermoFischer Scientific) diluted in PBS. For DAB immunohistochemistry, the slices were rinsed (3x, PBS) before a 45 min incubation in the dark with A and B reagents. Slices were rinsed with PBS twice, with a TRIS buffer once (10 min) before the DAB revelation. BDA tracing was revealed after overnight incubation with DAB reagents A and B followed by 45 min incubation with Streptavidin Alexa Fluor 594 (1:400, Invitrogen #S11227). All slices were rinsed (3x, PBS, 10 min), mounted on homemade coated gelatin slides and let dry before being coverslipped in Mowiol medium containing 1:2000 DAPI staining for immunofluorescence or in homemade mounting medium for DAB experiments.

Image analysis

The extent of the viral infection in the VTA/LH or the BDA injections in the RMTg were assessed using an epifluorescent microscope (Zeiss, Apotome.2). For each subject, brain sections were selected at 120 μm sampling along the anteroposterior axis. The extent of infection was determined by two observers using the boundaries defined by Paxinos and Watson (Paxinos and Watson, 2006). Counting of OX positive neurons, c-Fos positive neurons as well as the number of appositions of RMTg terminals onto LH OX neurons was performed manually using Mercator (Mercator-Explora Nova). Mounted slides were scanned (NanoZoomer S60 Digital slide scanner C13210, Hamamatsu, 40X magnification) in fluorescent light. Images were saved in Nanozoomer Digital Pathology Image (ndpi) format and the uncompressed images were viewed and analysed in QuPath bioimage software (Bankhead *et al.*, 2017). RMTg-pathway lesions were assessed by counting eGFP or FoxP1 positive cells. Semi-automatic quantification of FoxP1 and eGFP positive neurons in the RMTg allowed for assessment of neuronal lesions through the entire anteroposteriority of the region from bregma -6.00 (mm) to -6.90.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. All statistical analyses were performed using R-studio 4.0.2 and GraphPad Prism 9.1 (GraphPad Software, La Jolla California USA). We used parametric statistical tests after checking for normal distributions of data using

the Schapiro-Wilk test as well as quantile-quantile plot verification. Equal variance in sample distribution was verified using the Levene's test. Student's t-test was used for two group comparisons; Welch correction was applied in case of heteroscedasticity. For neuronal counting, weight evolution and cumulative total calorie intake, we used the ANOVA linear-mixed model, with the level of significance set at $p < 0.05$ followed by a Bonferroni post-hoc test when the ANOVA was statistically significant.

Results

The RMTg projects to the VTA and the LH through two distinct neuronal populations.

Consistent with previous neuroanatomical studies (Kauffling *et al.*, 2010; Jhou *et al.*, 2009 a,b; Ferreira *et al.*, 2008, Balcita-pedicino *et al.*, 2011), anterograde tracing (**Fig. 1A-B**) revealed many RMTg terminals in the vicinity of DA neurons dendrites and cell bodies in the VTA, confirming the presence of a dense RMTg output to VTA DA neurons (**Fig. 1B-C**). Moreover, this approach revealed RMTg terminals closed to LH orexin neurons and dendrites, suggesting a potential connectivity between the RMTg and this LH neuronal subtype (**Fig. 1D**). To determine the extent of RMTg projections to OX neurons, we proceeded to a manual counting of RMTg appositions onto OX neurons along the anteroposterior axis.

$7.8 \pm 1.2\%$ of total LH OX-positive neurons received apposition from RMTg terminals (**Fig. S1A**), suggesting that this neuronal population is not preferentially targeted. To further characterize the profile of RMTg-VTA or RMTg-LH connectivity, we unilaterally injected two different retrograde viruses; retro AAV eGFP and retro AAV mCherry in the VTA and LH, respectively. Results show a clear distinction between eGFP and mCherry positive neurons all through the anteroposteriority of the RMTg (**Fig. S1C**) establishing that two separate neuronal populations of the RMTg project to the LH and VTA (**Fig. 1I**).

Bilateral excitotoxic lesions of the RMTg influence palatable food intake in an obesogenic diet

The experimental procedure for lesional approaches is described in Figure 2. We firstly assessed the impact of non-specific excitotoxic lesions of the RMTg using bilateral ibotenic acid injections at RMTg coordinates (**Fig. 1A**). NeuN immunohistochemistry revealed a bilateral lesion of the RMTg along the anteroposterior axis (**Fig. 2B,C**). Lesioned rats displayed a global increase in locomotor activity throughout both daytime (RMTg control vs RMTg lesions, $t(15.408)=4.7691$; $p=0.0002312$) and nighttime (**Fig. 2D**, RMTg control vs RMTg lesions, $t(13.706)=3.583$; $p=0.0008012$) periods compared to control animals. We next evaluated the effect of RMTg lesions on anxiety-like phenotype in the EPM test (**Fig. 2E**). Results show that lesioned rats spent less time in the closed arms (RMTg control vs RMTg lesions, $t(18)=3.082$; $p=0.006425$) and more time in the open arms (RMTg control vs RMTg lesions, $t(18)=2.128$; $p=0.04744$) compared to control rats, showing a decrease in anxiety-like phenotype as previously described (Jhou *et al.*, 2009b). Total calorie intake measurement for each item after the six-week diet (**Fig. 2F**) showed a difference in the consummatory profile of lesioned rats compared to their control (RMTg control vs RMTg lesion, 2-way ANOVA, main group effect, $F(2,52)=51.65$, $p<0.0001$). This effect depends on the palatable item, sucrose consumption was notably reduced (RMTg control vs RMTg lesion, $t(52)=4.542$, $p=0.0001$) while fat intake was increased (RMTg control vs RMTg lesion, $t(52)=3.819$, $p=0.0011$). Interestingly, neither total chow intake following the diet (**Fig. 3F**, RMTg control vs RMTg lesions, $t(18)=0.8356$; $p=0.38$) nor weight gain (**Fig. S4A**, RMTg control vs RMTg lesions, main group effect, $F(1,18)=0.05280$; $p=0.8209$) was different between the two groups, showing a specific effect on palatable food preference, without affecting metabolic aspects.

Throughout the WD period, locomotor activity of lesioned rats (**Fig. S3A, Fig. 2G**) exhibited sustained nighttime elevation compared to control rats during the initial two weeks (**Fig. S3A**, RMTg control vs RMTg lesions, $t(18) = 3.038$, $p=0.007069$; $t(18) = 2.958$, $p = 0.008428$), but not in the third week (RMTg control vs RMTg lesions, $t(18) = 1.935$, $p = 0.068895$). This nocturnal hyperactivity was measured again at nighttime during the fourth week of WD (**Fig. 2G**, RMTg control vs RMTg lesions $t(18)= 3.0791$; $p=0.006468$). These results suggest that RMTg lesions globally heighten palatable food withdrawal sensitivity. While palatable food re-access did not affect sucrose (RMTg control vs RMTg lesions, $t(14.551)=1.3958$; $p=0.1837$), fat (RMTg control vs RMTg lesions, $t(18)=0.1451$; $p=0.8862$) and chow intake (RMTg control vs RMTg lesions, $t(14.551)=0.8$; $p=0.3388$) (**Fig. 2H**), we nevertheless observed an hyperactivity

of lesioned rats within the initial fifteen minutes of re-access (**Fig. 2I**, RMTg control vs RMTg lesions, $t(18)=3.209$, $p=0.004864$). In a parallel cohort, we conducted an immunohistochemical analysis on brains from RMTg lesioned and control rats following a 6-week fcHFHS (**Fig. S2**). We observed that RMTg lesioned animals exhibited a greater number of OX neurons in the LH compared to control rats (**Fig. S2A-B**, RMTg control vs RMTg lesions, $t(6)=2.506$, $p=0.0459$). Additionally, we counted the number of c-Fos positive neurons in the NAc in order to see if a bilateral lesion of the RMTg combined to a fcHFHS diet would induce a greater mesolimbic activation (**Fig. S1C-D**). The counting revealed a higher number of positive nuclei in lesioned rats compared to the control group (RMTg control vs RMTg lesions, $t(6)=2.609$, $p=0.0402$). These results suggest that RMTg lesion could impact RMTg downstream structures and influence mesolimbic activity in response to chronic palatable food exposure.

The RMTg influences fat overconsumption through VTA projections

The third experiment consisted in specifically lesioning either the RMTg-VTA or RMTg-LH pathway by using a combination of viral vectors injections (RMTg-VTA: **Fig. 3A**, RMTg-LH: **Fig. S4A**). We evaluated the lesion extent by counting the number of eGFP positive neurons in the RMTg. Both RMTg-VTA and RMTg-LH lesioned groups presented a significant reduction of eGFP positive neurons compared to their respective control groups (**Fig. 4C**; RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesion, main group effect, $F(1,14) = 12.96$, $p=0.0029$; RMTg-LH: **Fig. S5C**; RMTg-LH control vs RMTg-LH lesion, main group effect, $F(1,10) = 10.57$, $p=0.0057$). We completed the quantification of neuronal loss using FoxP1 immunohistochemistry, a recognized method for RMTg neurons identification (Smith *et al.*, 2019). FoxP1 counting revealed a decreased number of neurons in the RMTg-VTA lesioned group (**Fig. S6A**; RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesion, main group effect, $F(1,14) = 60.48$, $p<0.0001$) compared to the control group. However, this was not the case in the RMTg-LH lesioned group (**Fig. S6B**; RMTg-LH control vs RMTg-LH lesion, Main group effect, $F(1,9) = 0.1196$, $p=0.7395$), suggesting that eGFP positive neurons counting more accurately reflects the extent of the lesion in our conditions. Lesions of the RMTg-VTA pathway did not induce locomotor hyperactivity (**Fig. 4D**) during either the daytime

(RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesion, $t(10)= 0.74463$, $p=0.4736$) or nighttime ($t(10) = 0.13647$, $p=0.8942$). Similarly, there were no effects on locomotor activity in the RMTg-LH lesioned group compared to the control group (**Fig. S5D**; *Daytime*: RMTg-LH control vs RMTg-LH lesions, $t(10)=0.9665$, $p=0.3626$; *Nighttime*: RMTg-LH control vs RMTg-LH lesions, $t(10)=0.9104$, $p=0.3875$.) In the EPM test (**Fig. 4E**), RMTg-VTA lesioned rats showed similar results as following RMTg excitotoxic lesions, displaying a reduced time spent in the closed arms ($t(1,14)=2.23722$, $p=0.03256$) and an increased time spent in the open arms (RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesion, $t(1,14)=2.8573$, $p=0.01222$) when compared to the control group. There was no observable effect in the case of the RMTg-LH lesion (**Fig. S5E**; *Time in open arms*: RMTg-LH control vs RMTg-LH lesions, $t(10)=0.9209$, $p=0.3788$; *Time in closed arms*: RMTg-LH control vs RMTg-LH lesions, $t(10) = 1.143$, $p=0.2798$). We subsequently assessed the total calorie intake from each item throughout the duration of the fchFHS diet. Interestingly, results show that RMTg-VTA pathway lesion result in a higher total calorie intake from fat compared to the control group (**Fig. 4F**; RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesion, Two-Way ANOVA, main group effect, $F(41,574)=2.01$, $p=0.0001$). As observed following excitotoxic lesions, neither total calorie intake (**Fig. 4F**) or weight gain (**Fig.S4B**) differed from the control group. No differences in fat consumption or weight gain were observed following lesions of the RMTg-LH pathway (**Fig. S5F, S4C**). Over the course of the 4-week WD period and mirroring the findings following excitotoxic lesions, RMTg-VTA lesioned rats exhibited elevated nighttime locomotor activity in comparison to the control rats (**Fig. S3B, Fig. 4G**; *WD1*: RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesions, $t(6.966)=2.388$, $p=0.0485$; *WD2*: RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesions, $t(8.486)=2.949$, $p=0.0173$), *WD3* : RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesions, $t(10.6) = 2.683$, $p=0.0219$; *WD4* : RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesions, $t(8.532) = 2.3979$, $p=0.0415$). Lesions targeting the RMTg-LH pathway did not appear to significantly impact nighttime locomotor activity during early WD (**Fig. S3C**). However, by the fourth week, nighttime locomotor activity was increased in the RMTg-LH lesioned group compared to the control group (**Fig. S4G**, *WD4*: RMTg-LH control vs RMTg-LH lesions, $t(10) = 3.397$, $p=0.0080$).

Over the 24h of palatable food re-access period, fat intake was significantly higher in the RMTg-VTA lesioned group compared to control rats, mimicking the pattern observed during the diet (**Fig. 4H**, RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesion, $t(14)=2.360$, $p=0.0333$). Nevertheless, RMTg-VTA lesions did not impact sucrose or

chow intake. In the RMTg-LH lesioned group (**Fig. S5H**), chow intake was decreased compared to the control group (RMTg-LH control vs RMTg-LH lesion, $t(10)=2.532$, $p=0.0298$) while no effect could be seen on either fat or sucrose intake. During the 24h re-access period, nighttime locomotor activity was higher in the RMTg-VTA lesioned group (**Fig. 3I**; RMTg-VTA control vs RMTg-VTA lesion, $t(6.395)=2.745$, $p=0.0314$, but not in the RMTg-LH lesioned group (**Fig. S4I**) compared to their respective control groups.

The extent of RMT-VTA lesion drives fat craving during palatable food re-access

Correlation analyses: Linking RMTg-VTA pathway integrity, diet intake and palatable food relapse

To further investigate our data, we conducted correlation analysis across different variables for each group. Regarding the RMTg-VTA lesioned group, we observed an inverse correlation between the quantity of RMTg eGFP-positive neurons and fat intake throughout the re-access period (**Fig. 5A**, *right panel*: Pearson Correlation analysis, $R^2 = 0.6204$, $F(1,5) = 8.172$, $p = 0.0355$). This correlation was absent in the control group (**Fig. 5A**, *left panel*; Pearson correlation analysis, $R^2 = 0.2396$, $F(1,5)=1.576$, $p=0.2649$). These results point to a role of the RMTg-VTA pathway in fat relapse following 4-week palatable food withdrawal.

Interestingly, fat and sucrose consumption during the 24h00 re-access period displayed significant correlations with the average intake of the respective items during the diet in RMTg-VTA lesion group (*fat*: **Fig. 5B**; Pearson correlation analysis, $R^2 = 0.6133$, $F(1,7) = 8.796$, $p=0.0209$, *sucrose*: **Fig. 5C**; Pearson correlation analysis, $R^2 = 0.6640$, $F(1,7)=11.86$, $p=0.0075$). Notably, this effect was absent in the RMTg-VTA control group (*fat*: **Fig. 5B**; *sucrose*: **Fig. 4C**). Regarding the RMTg-LH lesion group, no correlations were identified between the quantity of eGFP-positive neurons in the RMTg (**Fig. S7A**), the consumption of palatable food during the diet and the intake during the re-access period (*fat*: **Fig. S7B**, *sucrose*: **Fig S7C**).

Collectively, our findings suggest that the impact of RMTg on anxiety-like phenotype, heightened fat consumption, palatable food craving and palatable food-related locomotor activation is mainly mediated through the RMTg-VTA pathway.

Discussion

Prior RMTg neuroanatomical investigations have illustrated its projections to both the VTA and LH (Kaufling *et al.*, 2010), with a predominant focus on its projections to DA nuclei including the VTA, the SNc and the retrorubral field in a lesser extent (Jhou *et al.*, 2019, Bourdy *et al.*, 2014, Ferreira *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2019). We further characterized RMTg connectivity with the VTA and LH through a comprehensive approach involving both anterograde tracing using BDA and viral retrograde tracing methods. Anterograde tracing experiment confirmed massive projections from the RMTg onto VTA DA neurons. Importantly, our results show that RMTg terminals make appositions onto LH orexin neurons, known for their involvement in food intake regulation (Liu *et al.*, 2020, review). Nonetheless, the fraction of OX neurons surrounded by RMTg terminals is low, indicating that this particular LH cell subtype might not be the primary target of RMTg projections. Future investigations will be needed to explore specific neuronal LH subtypes (OX, glutamate, GABA) targeted by the RMTg. Our findings complete neuroanatomical evidence supporting the potential role of the RMTg in regulating food intake. By employing AAV-mediated retrograde tracing, we demonstrated that RMTg-VTA and RMTg-LH neurons belong to two distinct neuronal populations, enabling the use of AAVs based genetic tools for the separate investigation of these two pathways. Interestingly, we observed a topical organization of RMTg neurons along the anteroposterior axis, depending on their respective projection sites (**Fig. S1C**). RMTg-VTA pathway neurons were organized similarly along the anteroposterior axis (**Fig. 4C**), while RMTg-LH pathway neurons were more abundant in the posterior part of the RMTg (**Fig. S5C**).

We started by examining the effects of non-specific RMTg lesions, focusing their influence on food intake and associated motor behaviors. As previously described, RMTg lesions resulted in increased basal locomotor activity (Fu *et al.*, 2016; Brown *et al.*, 2017) and had an anxiolytic-like effect as measured in the EPM test (Jhou *et al.*, 2009). Acute pharmacological (Huff et Lalumière, 2015; Lavezzi *et al.*, 2015), and

optogenetic (Jhou *et al.*, 2013) inhibitions, and persistent lesions of the RMTg (Fu *et al.*, 2016) have been shown to increase basal locomotor activity. Moreover, RMTg lesions improve motor skills and learning in the rotarod test (Bourdy *et al.*, 2014). Our results are in line with these findings, indicating that although the RMTg is involved in phasic motor inhibition in response to aversive stimuli (Jhou *et al.*, 2009), it also normally acts as a global break on locomotion. RMTg lesions have been previously reported to markedly reduce passive fear behaviors including freezing and open arm avoidance (Jhou *et al.*, 2009). Our results corroborate these data, showing a reduction in anxiety-like behavior in RMTg lesioned rats. This typical post-lesion behavioral phenotype served us as a reliable indicator of excitotoxic lesion efficiency. Activation of mesencephalic VTA DA neurons and subsequent DA release in the NAc is a crucial component of locomotor activation (Wang *et al.*, 2013; Boekhoudt *et al.*, 2016; Costall *et al.*, 1984, Lavezzi *et al.*, 2015) and prevents from generalized anxiety (Zweifel *et al.*, 2011). Considering the substantial inhibitory projections from the RMTg to VTA DA neurons, changes in basal locomotor activity and anxiety-like phenotype following the lesions might be attributed to a persistent over-activation of mesolimbic DA signaling. Over the course of the 6-week diet, RMTg lesioned rats exhibited altered consumption patterns in palatable food preference, displaying an increase in fat intake coupled with a reduction in sucrose consumption. These shifts in palatable food preference did not disrupt weight gain, suggesting the preservation of intact homeostatic regulation. Results from a separate cohort revealed an increase in the number of cFos positive nuclei within the NAc, alongside with an increased number of orexinergic neurons in the LH of RMTg lesioned rats following the 6-week diet. This suggests that RMTg ablation influences the impact of the fCHFHS diet on the VTA and LH. However, it remains challenging to determine whether these changes are a direct result of the lesion itself or are attributed to the increased fat consumption. The latter option seems more plausible as high fat consumption is known to both increase c-Fos expression in the NAc (De La Cruz *et al.*, 2015) and the number of orexin neurons in the LH (Chang *et al.*, 2008, True *et al.*, 2018). RMTg lesioned rats displayed increased locomotor activity during both palatable food withdrawal and re-access. However, considering the hyperactive phenotype observed following non-specific RMTg lesions, it is difficult to interpret these results in relation to food-related behaviors. Lesions specifically targeting RMTg outputs allowed us to discern the respective contributions of RMTg-VTA and RMTg-LH pathways in the same experimental procedure.

Importantly, counting of eGFP positive neurons in RMTg-VTA and RMTg-LH control groups revealed that under our experimental conditions, the RMTg-VTA pathway encompassed a population of 614 ± 91 neurons, while the RMTg-LH pathway only comprised 173 ± 40 neurons. These findings highlight a substantial disparity in the number of neurons between the two investigated pathways. In contrast to excitotoxic lesions, RMTg-VTA lesion did not induce basal hyperactivity. However, we observed a congruent anxiety-related outcome, showing that RMTg influences anxiety-like behaviors through VTA projections. This effect might result from VTA DA neuron disinhibition (Zweifel *et al.*, 2011), particularly those neurons projecting to the basolateral amygdala that was recently shown to exhibit an inverse correlation with the expression of anxiety phenotype (Morel *et al.*, 2022). During the fCHFHS diet, disrupting the RMTg-VTA pathway produced a notable increase in fat consumption, comparable to patterns observed following excitotoxic lesions, whereas sucrose intake remained unchanged. These results suggest that by suppressing the RMTg to VTA tonic inhibitory drive, normal homeostatic control is overridden to favor hedonic feeding toward fat despite an already overloaded energy state, without affecting weight gain. Additionally, RMTg-VTA lesioned rats also displayed heightened fat consumption during the 24h re-access period, a behavior that was correlated with the extent of the lesion. Repeated consumption of natural rewards leads to adaptations in DA neurons and their downstream targets, facilitating an escalation in intake and potentially fostering compulsive behaviors (Hyman *et al.*, 2006;). Increasing excitatory stimulation of VTA DA neurons potentiates hedonic feeding-associated behaviors (Liu *et al.*, 2016) and suppressing their activity through GABA neurons activation suppresses palatable food intake (Nieh 2016). Moreover, reduction of DA release in the NAc has been linked to decreased reinforcing values of rewards and their associated environmental cues (Carlin *et al.*, 2013). While both fat and sucrose are recognized as activators of the mesolimbic system (De La Cruz *et al.*, 2015; Epitia-Bausista & Escobar, 2021), it is noteworthy that fat exerts a heightened influence on reward, motivation, and neural plasticity within this neural circuit (Epitia-Bausista & Escobar, 2021). This fat-induced mesolimbic plasticity also contributes to palatable food craving and anxiety during withdrawal periods (Sharma *et al.*, 2013). Pharmacological inhibition of the RMTg increases VTA DA neurons firing and bursting (Jalabert *et al.*, 2011) and TH immunoreactivity in the mesolimbic system (Gakare and Ugale, 2023), suggesting a strong tonic inhibitory control over mesolimbic DA signaling (Bourdy and Barrot, 2012).

From a behavioral standpoint, its inhibition leads to heightened alcohol reward sensitivity and increased alcohol consumption (Fu *et al.*, 2016; Gakare and Ugale, 2023), suggesting an alteration in global reward processing. Moreover, a study reported that rats with RMTg lesions exhibited a trend toward elevated progressive ratio breakpoints for food, as well as an inclination to track greater magnitude rewards, that could reflect a slight increased reward value for food (Vento *et al.*, 2017). Altogether, it suggests that dampening the RMTg tonic inhibitory drive over the VTA could potentially shift reward thresholds, increasing the hedonic value of palatable food and thereby contributing to heightened consumption of such food. In this context, fat has a heightened hedonic value compared to sucrose and exerts a more substantial influence on mesolimbic neuronal activity and plasticity (Epitia-Bausista & Escobar, 2021). Thus, we speculate that increased fat consumption in RMTg-VTA lesioned rats could reflect a greater demand of palatability in food choice in these animals. Importantly, heightened fat consumption persisted in RMTg-VTA lesioned rats upon the palatable food re-access period and was correlated with the extent of the RMTg-VTA pathway lesion, pointing to its dominant role in fat relapse compared to chronic consumption. Additionally, correlation analysis revealed that RMTg-VTA lesion facilitated withdrawal-induced relapse on each palatable macronutrient (Sucrose and fat) depending on the amount consumed during the diet, highlighting a broader involvement of this pathway in palatable food relapse sensitivity following withdrawal. Nevertheless, withdrawal from high fat diet following a 6-week access has been reported to enhance motivation and craving for both sucrose and high-fat food reward (Sharma *et al.*, 2013) and we cannot exclude the possibility that the observed effect could be linked to the higher fat consumption detected in RMTg-VTA lesioned rats during the diet.

Locomotor activity measurements support palatable food intake results. Indeed, while not displaying basal hyperactivity, RMTg-VTA lesioned rats exhibited heightened nocturnal activity both during palatable food withdrawal and re-access. Palatable food acts as a natural reward and withdrawal from such a diet can produce heightened emotional state including enhanced stress response and motivated behaviors (Teegarden and Bale, 2007, Sharma *et al.*, 2013]). Evidence supports that locomotor activation, also referred to as seeking behavior, is accompanied by an anticipatory affective component (Lavezzi *et al.*, 2015) which has been linked to a psychological state of “wanting” (Berridge and Robinson, 1998; Berridge, 2012). Mesolimbic DA

signaling highly contributes to both locomotor activation and subjective anticipatory component (Kelly *et al.*, 1975; Kalivas 1983,1990) and neuroadaptations underlying craving behavior, as observed after repeated drug (Robinson and Berridge, 1993) and palatable food exposure (Teegarden and Bale, 2007; Sharma *et al.*, 2013; Blum *et al.*, 2011). In this context, high-fat diets constitute a stronger stimulus than high sucrose diets in the development of wanting behaviors, including food anticipatory activity, and underlying plastic changes in the mesolimbic system (Espitia-Bautista and Escobar, 2021). Moreover, mice over expressing Δ FosB protein in striatal regions display increased locomotor activity following high fat withdrawal (Teegarden *et al.*, 2007). Thus, increased locomotor activity observed in RMTg-VTA lesioned rats during palatable food withdrawal and re-access is consistent with heightened fat consumption and locomotor activity may represent an unintentional outward manifestation of palatable food desire and anticipation / “wanting” due to a heightened mesolimbic activity. Previous studies corroborate our data as RMTg inhibition has been shown to increase amphetamine-conditioned locomotor activity, an anticipation-driven behavior (Lavezzi *et al.*, 2015). Interestingly, recent research showed that the lateral habenula (LHb), a major RMTg afferent (Herkenham & Nauta, 1979, Kaufling *et al.*, 2009; Jhou *et al.*, 2009), is involved in stress-induced palatable food consumption by reducing the homeostatic satiety effect through its projections to the VTA (Ip *et al.*, 2023). Palatable food withdrawal is a stressful stimulus (Sharma *et al.*, 2013), and it is plausible that RMTg-VTA pathway influence on palatable food consumption during the re-access period might be under the control of the LHb. Additionally, an acute 16h overnight fast has been shown to suppress RMTg GABA neuron firing (Godfrey *et al.*, 2022), an effect that would disinhibit VTA DA neurons and could contribute to promote food intake. This could be extrapolated to palatable food, so that suppression of the RMTg-VTA pathway could facilitate palatable food consumption following a withdrawal period. However, conflicting results were obtained as food restriction has also been reported to increase cFos protein expression in the RMTg (Jhou *et al.*, 2009), although this phenomenon could be attributed to RMTg acute activation as a component of negative prediction error signaling (Sanchez-Catalan *et al.*, 2022).

In contrast to the RMTg-VTA pathway lesion, the RMTg-LH pathway lesion resulted in a milder phenotype, marked by an increased locomotor activity during the last week of palatable food withdrawal period, along with a reduction in chow intake during the re-access period. This observation could be partially attributed to methodological factors.

Indeed, the retrograde virus was injected into a confined portion of the LH (-3.14mm from bregma) to specifically target OX neurons, which is a reduced part compared to the overall size of this structure (Yoshida *et al.*, 2006). Although the LH receives a substantial number of afferents from the RMTg (Kaufling *et al.*, 2010), these afferents span other parts of the LH, comprised between -2,6 and -3,6mm from bregma (Kaufling *et al.*, 2010). Furthermore, our results show that only a small proportion of LH OX neurons appear to be contacted by RMTg terminals, and that the population of neurons in the RMTg-LH pathway is lower compared with that in the RMTg-VTA pathway. Thus, the neuronal population addressed in our study is limited, which could account for this subtle observed phenotype. LH ORX neurons have multiple functions including feeding, arousal, energy homeostasis and reward (Sakurai 2014). Specifically, OX has been involved in reward-seeking behaviors and previous studies indicate that OX neurons may regulate food-seeking behavior in the context of caloric restriction (Vialou *et al.*, 2011; Pankevich *et al.*, 2010; Teegala *et al.*, 2023). OX neurons operate as nutrient sensors and convey information regarding the metabolic status to circuits involved in sleep, arousal, cognition, and motor control (Sakurai *et al.*, 2014). Their activity is involved in locomotion initiation. Indeed, optogenetic stimulation and inhibition of ORX neurons respectively increases and decreases locomotion initiation probability, without affecting basal locomotor activity (Karnani *et al.*, 2020). Interestingly, a subpopulation of OX neurons, whose activity allows to predict the probability of motor initiation, are differentially modulated by food deprivation. Thus, ablation of RMTg inhibitory projections to LH OX neurons may result in a facilitation of locomotor initiation at the end of the palatable-food withdrawal period, a time when emotional state and arousal are most profoundly impacted.

The reduction in chow consumption observed in RMTg-LH lesioned rats during the re-access period, while not impacting palatable food or total caloric intake, presents a more intricate challenge for interpretation. Chronic exposure to palatable food is known to induce a devaluation of standard healthy food, a phenotype that persists following palatable food removal (Tenk and Felfeli, 2017; Mazzone *et al.*, 2020). Our results suggest that the RMTg-LH pathway could be involved in standard food devaluation processes following palatable food access and withdrawal. The LH is a complex region housing a diverse array of cell types, such as ORX, glutamate and GABA neurons, each with highly specialized connectivity and food-related regulatory functions (Koekkoek *et al.*, 2021; Rossi *et al.*, 2021; Thomas *et al.*, 2022; Slomp *et al.*, 2023).

Interestingly, a recent study reported a decreased synaptic strength of RMTg inputs from GABA LH neurons following fasting (Godfrey *et al.*, 2022), suggesting a potential involvement of the reciprocal connection (LH-RMTg) in the promotion of fasting-induced food-motivated behaviors. Future studies would benefit from characterizing RMTg connectivity with LH neuronal subtypes from both a neuroanatomical and functional perspective in the context of food intake.

Preference for calorically rich substrates with high hedonic values over healthier alternatives is observed among various species, due to its role in maximizing survival. However, underlying neurobiological mechanisms driving this selection remain poorly understood. We showed that selective ablation of the RMTg-VTA pathway promotes intake behaviors toward fat during a fCHFS diet and during palatable food re-access following a withdrawal period. Additionally, it facilitates palatable food relapse and enhances locomotor activation both during palatable food withdrawal and re-access, suggesting an exacerbation of food-seeking behaviors. These effects may result from a reduction in the tonic inhibitory control exerted by the RMTg on VTA DA neurons, leading to increased mesolimbic DA signaling and associated plasticity mechanisms. Studies suggest that fat has its own metabolic, physiological and organoleptic properties. Compared to sucrose, it has a higher hedonic value and confers a survival benefit due to its high energy density. Physiologically, inhibition of the RMTg-VTA pathway could be involved in preferentially guiding animals toward the most caloric food to optimize energy intake and maximize survival. However, in an environment where palatable food is readily available, alterations of RMTg-VTA signaling might lead to altered food choice, palatable food consumption and relapse, that align with typical traits of most eating disorders and obesity. For future experiments, it would be valuable to investigate to what extent the RMTg-VTA pathway could be disrupted in the context of eating disorders and obesity, and assess the impact of its modulation on palatable food consumption and pathogenesis development.

Figure Captions

Fig. 1 Neuroanatomical characterization of RMTg-VTA and RMTg-LH connectivity. **A** Schematic of RMTg anterograde tracing procedure. BDA was unilaterally injected into the RMTg with the anterograde tracer BDA, biotinylated dextran amine and VTA and LH slices prepared for immunofluorescence (n=3). **B** Representative example of BDA injection site in the right RMTg. Scale bar = 200 μ m. **C** *Left picture*: TH/BDA co-labelling reveals that many RMTg terminals (BDA, Red) are visible in the vicinity of VTA DA cell bodies (TH, green). Scale bar = 200 μ m. *Right picture*: Magnification of the region depicted in the *left panel* (white square). Scale bar = 20 μ m. **D** *Left picture*: RMTg terminals (BDA, Red) are found in the vicinity of orexin neurons cell bodies and dendrites (OX, green) in the LH. Scale bar = 200 μ m. *Right picture* : 50 μ m Magnification of the region depicted in the *left panel* (white square). Scale bar = 20 μ m. **E** Schematic representation of AAV- mediated retrograde tracing procedure. Retrograde pAAV-EF1A-mCherry-IRES-Cre (red) and pEEN.AAV.hSyn.HI.eGFP-Cre (green) viruses were respectively injected into the VTA and the LH in the same animals (n=3). **F** Representative example of AAV injection site in the VTA. Scale bar = 200 μ m. **G** Representative example of AAV injection site in the LH. Scale bars = Scale bar = 200 μ m. **H** Representative example of mCherry (red) and eGFP (green) positive neurons in the RMTg. **I** Magnification of the region depicted in **H** (white square). Immunofluorescence reveals that RMTg neurons initiating RMTg-VTA (mCherry, red) and RMTg-LH (eGFP, green) pathways belong to separate populations. Scale bar = 50 μ m. Blue channel corresponds to DAPI immunofluorescence. White arrows point to potential RMTg terminals appositions onto VTA DA and LH OX neurons. BDA, Biotinylated Dextran Amine; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMH: Dorsomedial Hypothalamus; IP: Interpeduncular nucleus; LH ; Lateral Hypothalamus ; MM : Medial Mamillary Nucleus; OX, Orexin; RMTg, Rostromedial tegmental nucleus; RRF, Retro Rubral field; ScP, Superior Cerebral peduncle; SNc, Substantia Nigra Pars Compacta; SNr, Substantia Nigra pars

Reticulata; Th, Tyrosine Hydroxylase; VMH, Ventromedial Hypothalamus; VTA, Ventral Tegmental Area.

Fig.2 Experimental procedure for lesion experiments.

Fig.3 Bilateral excitotoxic lesion of the RMTg modulates palatable food intake in a free choice obesogenic diet. **A** Schematic representation of ibotenate injections procedure for RMTg nonspecific lesion. **B** Representative NeuN immunostaining in the RMTg of rats from control (left image) and lesion (right image) groups shows a massive lesion following bilateral ibotenate injections. **C** Overlay of the lesions observed in the lesioned group shows a massive lesion encompassing the RMTg along the anteroposterior axis. Values represent distance from bregma in mm. **D** Following RMTg lesion, lesioned rats display a higher locomotor activity during both daytime and nighttime compared to control rats. **E** EPM testing reveals an anxiolytic effect of RMTg lesions. **F** Measurement of total calorie intake from each item along the 6-week fcHFHS diet reveals increased fat consumption and reduced sucrose intake in RMTg lesioned group, with no impact on chow consumption. **G** RMTg lesioned rats display enhanced locomotor activity at nighttime during the fourth week of palatable food withdrawal. **H** During the first hour of palatable food re-access, RMTg lesion does not affect food intake. **I** Locomotor activity is increased in RMTg lesioned group during the initial fifteen minutes of the re-access period. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$ for comparison between the RMTg control ($n=8$) and the RMTg lesioned ($n=12$) group. EPM, Elevated plus Maze; fcHFHS, free choice high fat high sugar diet; WD; Withdrawal; Re-A, re-access.

Fig.4 Targeted lesion of the RMTg-VTA pathway increases fat intake, relapse and promotes palatable food-related locomotor activation during withdrawal and re-access. **A** Schematic representation of AAV injections procedure for RMTg-VTA pathway lesion. The retrograde virus pEEN.AAV.hSyn.HI.eGFP-Cre is bilaterally injected in the VTA of all subjects, while the pAAV-FLEEx-TaCasp3-TEVp virus is bilaterally delivered in the RMTg of the lesioned group. Dotted lines depict the lesioned pathway. **B** Representative images of eGFP florescence in the RMTg reveals a discernible difference in the number of positive neurons between RMTg-VTA control and RMTg-VTA lesioned groups. Pictures on the right are magnifications of regions

depicted in the pictures on the left (white squares). Scale bars: *left pannels* = 1000 μm , *right pannels* = 50 μm . **C** Anteroposterior quantification of eGFP positive neurons within the RMTg shows a significant decrease following RMTg-VTA lesion. **D** Post-lesion locomotor activity measurement shows no difference between RMTg-VTA control and lesion groups. **E** Post-lesion EPM testing reveals a reduction in anxiety-like behavior in RMTg-VTA lesioned rats. **F** Measurement of total calorie intake from each item during the diet reveals increased fat consumption in the RMTg-VTA lesioned group, with no effect on sucrose or chow consumption. **G** At the end of the fourth week of palatable food withdrawal, RMTg-VTA lesioned rats display increased nocturnal locomotor activity. **H** RMTg-VTA lesioned rats consume more fat during the 24h00 re-access period. **I** During the night of palatable food re-access period, the lesioned group demonstrates heightened locomotor activity. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. AP, Anteroposteriority , RRF, Retro Rubral Field; IP, Interpeduncular nucleus; tth, trigeminothalamic tract; ml, medial lemniscus; post-L, Post-lesion; PFW, Palatable food withdrawal; Re-A, Re-access.

Fig.5 RMTg -VTA pathway lesion facilitates withdrawal-induced palatable food relapse. **A** Fat intake during the re-access period is negatively correlated with the number of positive eGFP neurons in the RMTg in RMTg-VTA lesioned rats. **B, C** Fat and sucrose consumption during the re-access period are correlated with the total calorie intake from each item during the six weeks diet in the lesioned group.

Fig.S1 Anterograde and retrograde tracing complementary analysis.

A Representative image of OX (brown) / BDA (dark) DAB double immunolabelling in the LH following BDA injection in the RMTg. Right image is a magnification of the region depicted in the left image (black square). Black arrows point to RMTg terminals appositions onto OX neurons. Scale bars *left pannel* = 200 μm ; *right panel* = 200 μm . **B** Anteroposterior quantification of RMTg terminals appositions onto OX neurons shows that $7.8 \pm 1.2\%$ of LH OX neurons appear to be contacted by RMTg terminals. **C** Anteroposterior counting of mCherry and eGFP positive cells in the RMTg following retro-AAV injections in the VTA (AAV mCherry, red) and LH (AAV eGFP, green) shows that RMTg-VTA pathway neurons are distinct from those belonging to the RMTg-LH pathway. AP, anteroposteriority; BDA, biotinylated dextran amine; DAB,

diaminobenzidine; DMH, dorsomedial hypothalamus; LH, lateral hypothalamus; OX, orexin; VMH, ventromedial hypothalamus.

Fig.S2 Excitotoxic RMTg lesion increases the number of LH OX neurons and NAc cFos positive nuclei following a 6-week fCHFHS diet. **A** Representative example of OX immunostaining in the LH from RMTg control (left image) and RMTg lesioned (right image) rats following a 6-week fCHFHS diet. Scale bars = 200µm. **B** OX neurons counting reveals that RMTg lesioned rats show an increased number of OX positive neurons in the LH following the diet. **C** Representative images of c-Fos immunolabelling (brown) in the NAc of RMTg control (top images) and lesioned (bottom images) rats following a 6-week fCHFHS diet. Right images are magnifications of regions depicted in pictures on the left (black squares). Scale bars *left panel* = 200 µm; *right panel* = 20µm. **D** Quantification shows that RMTg lesioned rats display an increased number of cFos positive nuclei in the NAc following a 6-week fCHFHS diet. * : $p < 0.05$. ACA, anterior commissure; DMH, Dorsomedial hypothalamus; LH, Lateral Hypothalamus; NAc, Nucleus Accumbens; VMH, Ventromedial hypothalamus.

Fig. S3 Nocturnal locomotor activity during 1st, 2nd and 3rd week of palatable food withdrawal. **A** Excitotoxic lesion of the RMTg induces locomotor hyperactivity during the two initial weeks of palatable food withdrawal. **B** RMTg-VTA lesion group displays increased nocturnal locomotor activity during the three initial weeks of palatable food withdrawal. **C** Nocturnal locomotor activity does not differ between RMTg-LH control and lesion groups during the initial 3 weeks of palatable food withdrawal. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$. WD : withdrawal.

Fig. S4 Lesions of the RMTg or its projections to the VTA or LH do not influence weight gain throughout the 6-week fCHFHS diet. **A** RMTg excitotoxic lesion does not impact weight gain during the diet. **B** RMTg-VTA pathway lesion does not influence weight gain during the diet. **C** RMTg-LH pathway lesion does not impact weight gain during the diet.

Fig. S5 Specific lesion of the RMTg-LH pathway influences locomotor activation during the last week of WD and chow intake during the re-access period. **A** Schematic representation of AAV injections procedure for RMTg-LH pathway lesion.

The retrograde virus pEEN.AAV.hSyn.HI.eGFP-Cre is bilaterally injected in the LH of all subjects, while the pAAV-TaCasp3-TEVp virus is bilaterally delivered in the RMTg of the lesioned group. Dotted lines depict the lesioned pathway. **B** Representative images of eGFP fluorescence in the RMTg reveals a discernible difference in the number of positive neurons between RMTg-LH control and RMTg-LH lesioned groups. Pictures on the right are magnifications of regions depicted in the pictures on the left (white squares). Scale bars: *left panels* = XX μm , *right panels* = XX μm . **C** Anteroposterior quantification of eGFP positive neurons within the RMTg shows a significant decrease following the RMTg-LH lesion. **D** Post-lesion locomotor activity measurement shows no difference between RMTg-LH control and lesion groups. **E** Post-lesion EPM testing shows no effect of RMTg-LH lesion on anxiety-like behavior. **F** Measurement of total calorie intake from each item during the diet shows no effect of RMTg-LH lesion on food consumption during the diet. **G** At the end of the fourth week of palatable food withdrawal, RMTg-LH lesioned rats display increased nocturnal locomotor activity compared to the control group. **H** RMTg-LH lesioned rats consume less chow during the 24h00 re-access period compared to the control group. **I** RMTg-LH lesion does not affect locomotor activity during palatable food re-access period. ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

Figure S6 Quantification of FoxP1 positive neurons in the RMTg following RMTg-VTA and RMTg-LH lesions. **A** Anteroposterior quantification of FoxP1 positive neurons within the RMTg shows a significant decrease following the RMTg-VTA lesion. **B** The number of FoxP1 positive cells does not differ between RMTg-LH lesioned and control groups. **** $p < 0.0001$.

Figure S7 Correlation analysis for RMTg-LH pathway lesion. **A** No correlations are observed between fat consumption during the re-access period and the number of eGFP positive neurons in RMTg-LH control (left plot) and lesioned (right plot) groups. **B** Fat intake during the re-access period is not correlated with total fat intake during the 6-week fCHFHS diet in RMTg-LH control (left plot) and lesioned (right plot) groups. **C** Sucrose intake during the re-access period is not correlated with total sucrose intake during the 6-week fCHFHS diet in RMTg-LH control (left plot) and lesioned (right plot) groups.

Résultats

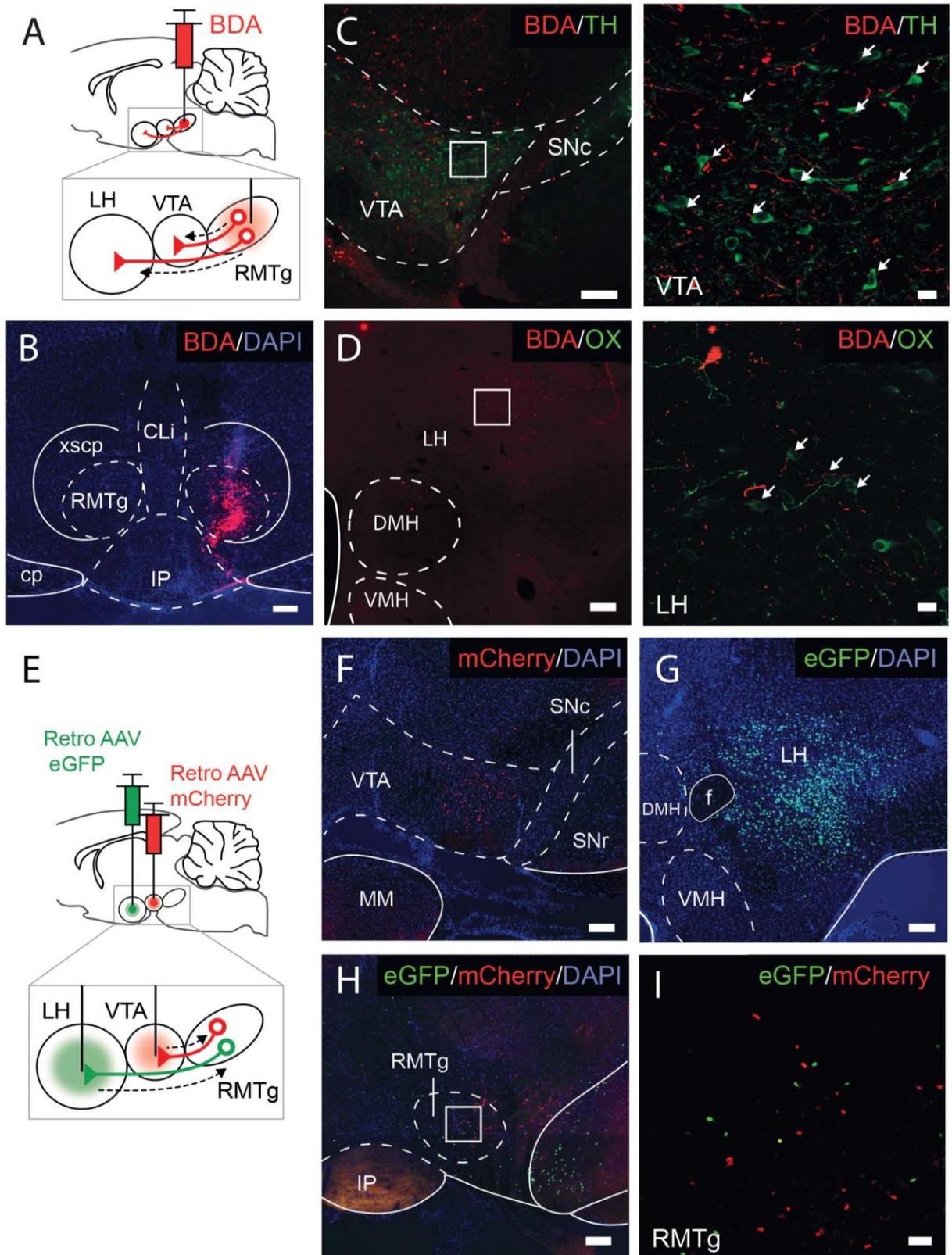


Fig.1

Résultats

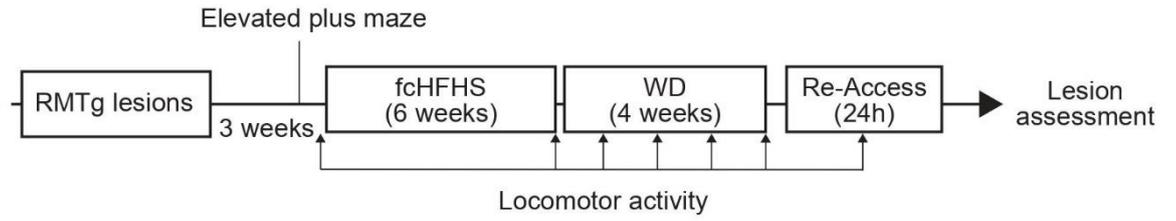


Fig. 2

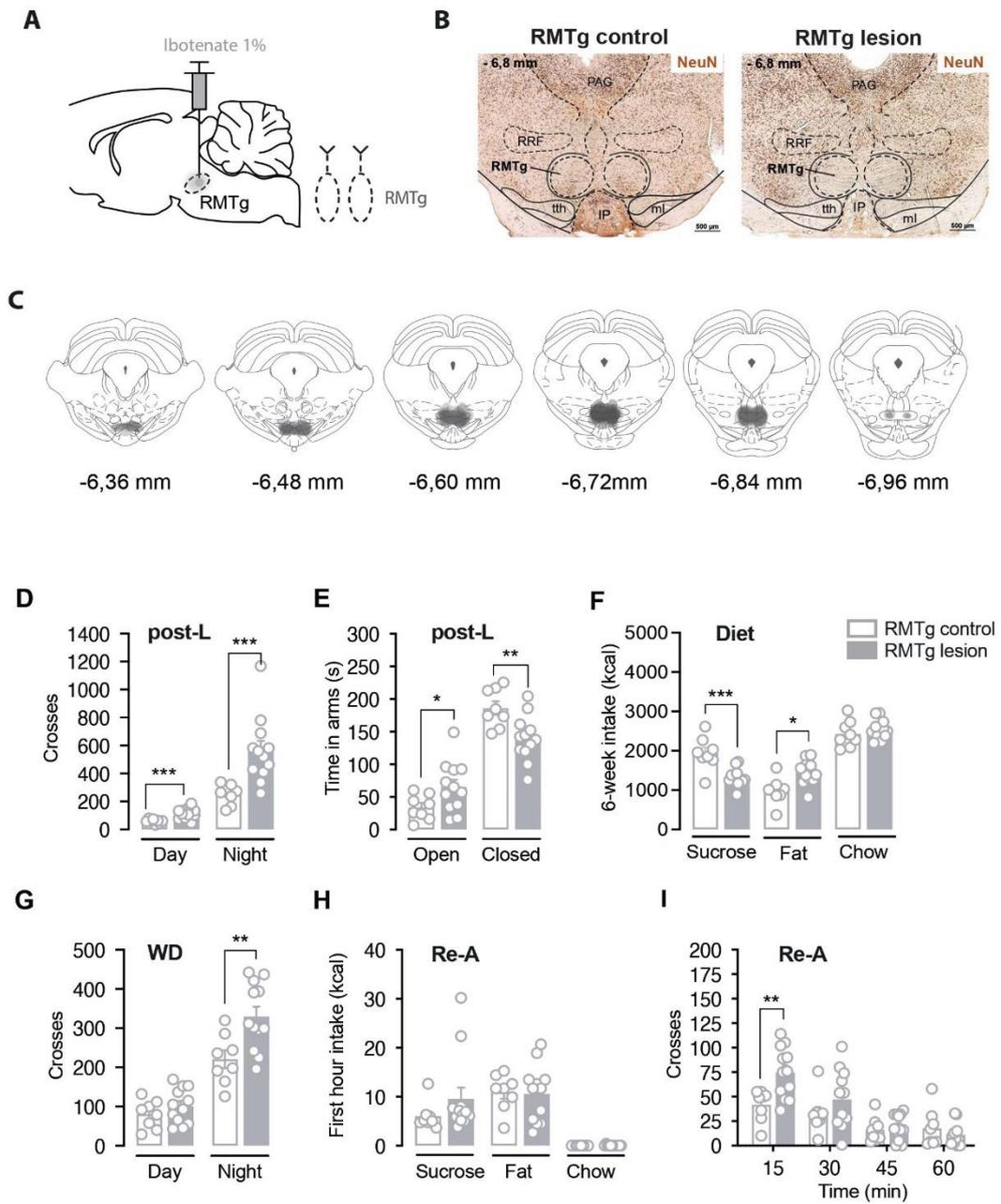


Fig. 3

Résultats

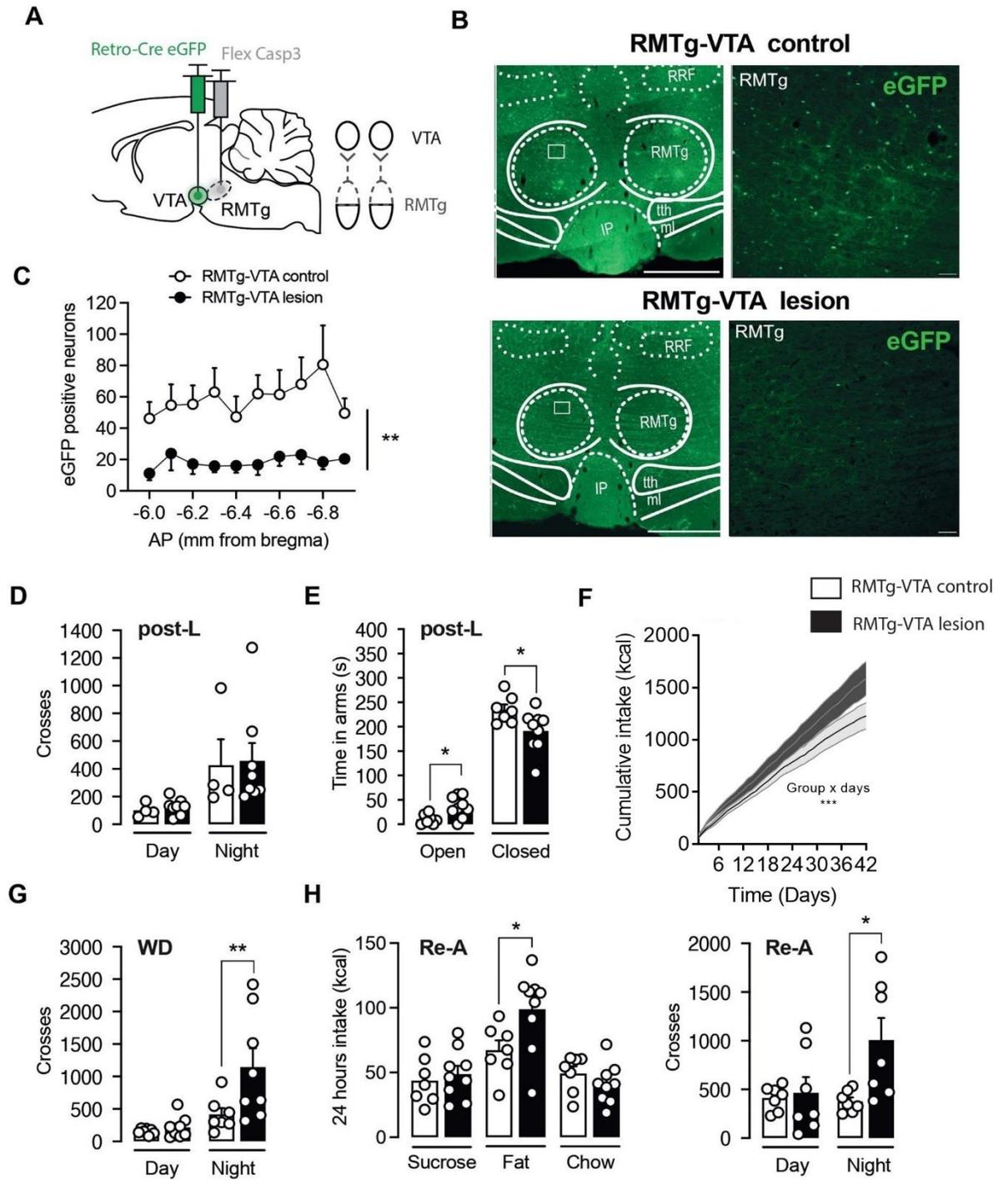
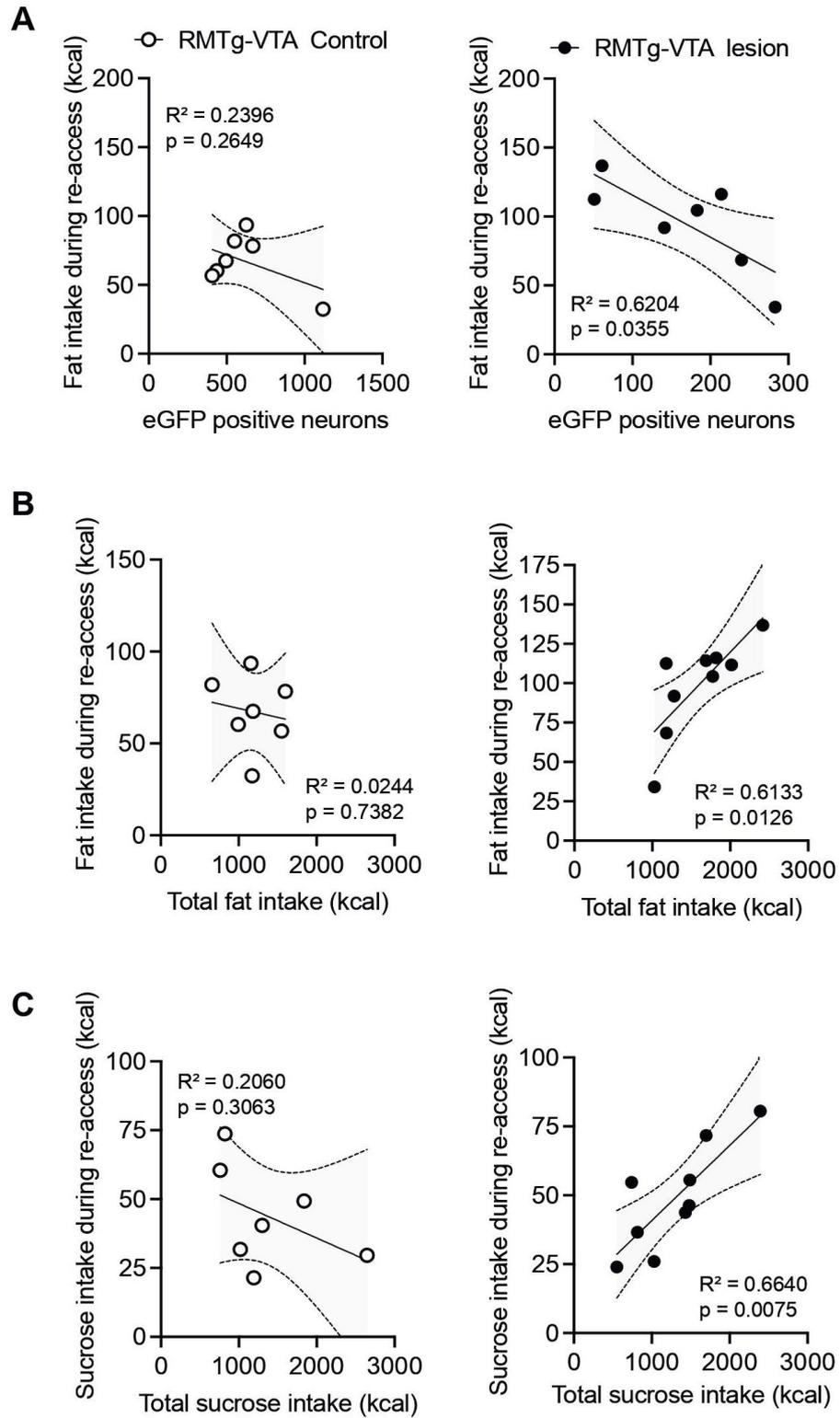


Fig. 4

Résultats



Résultats

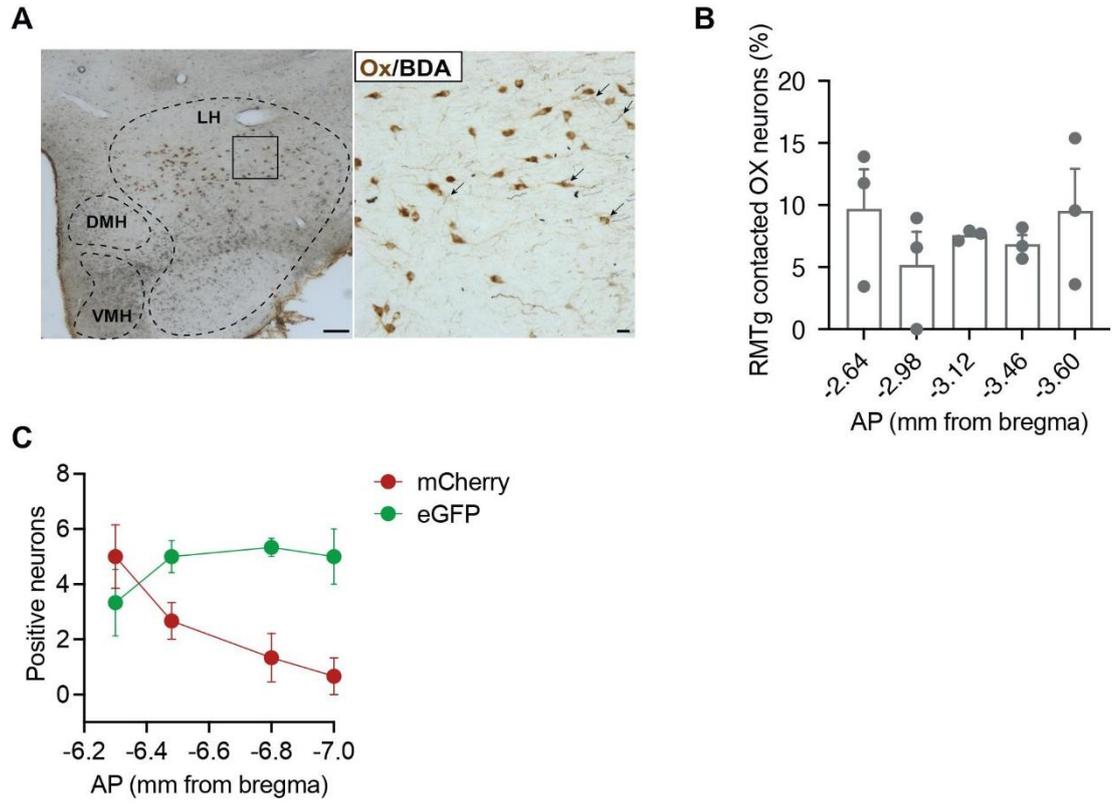


Fig. S1

Résultats

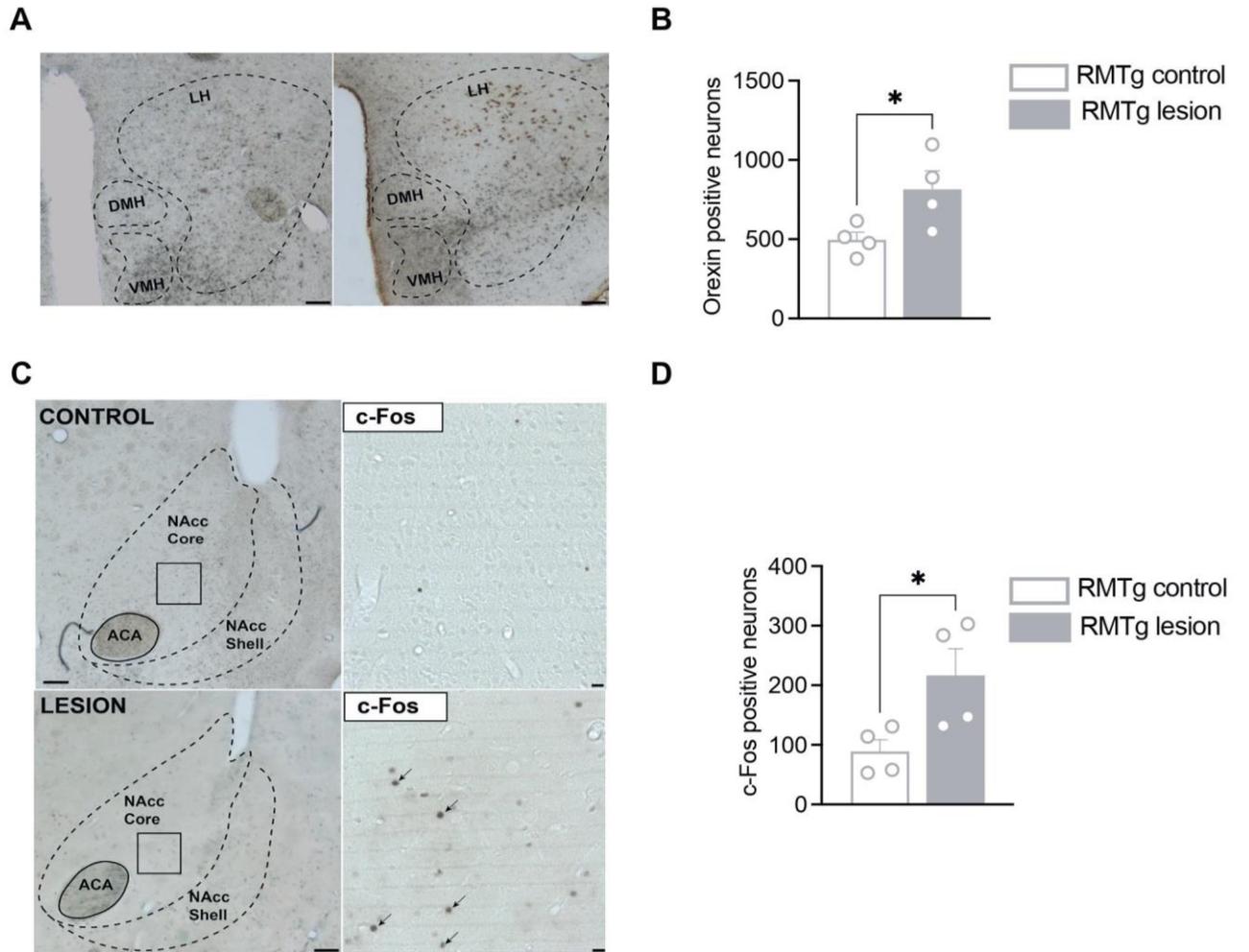


Fig. S2

Résultats

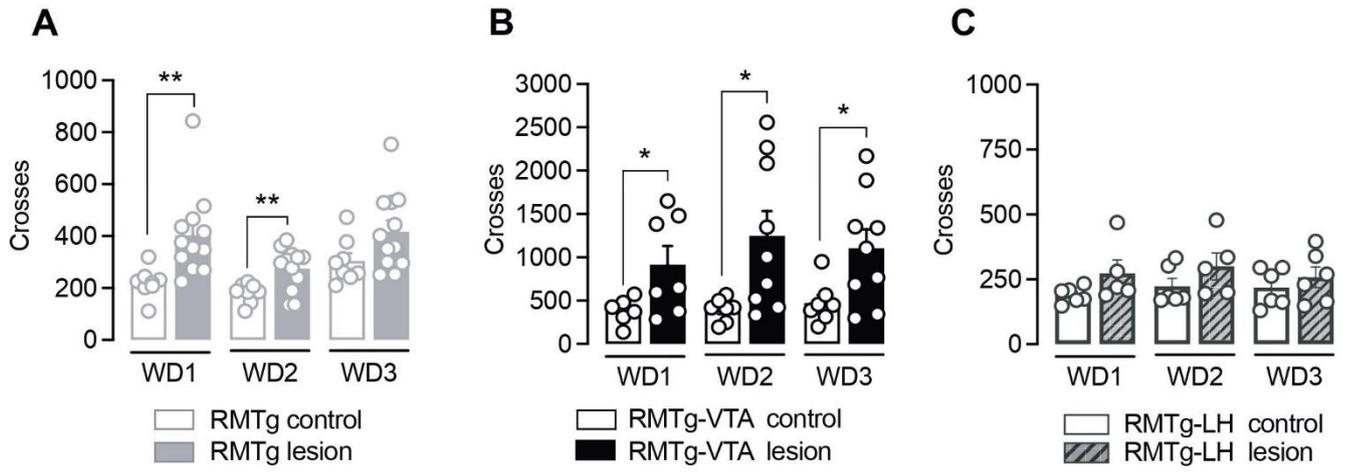


Fig. S3

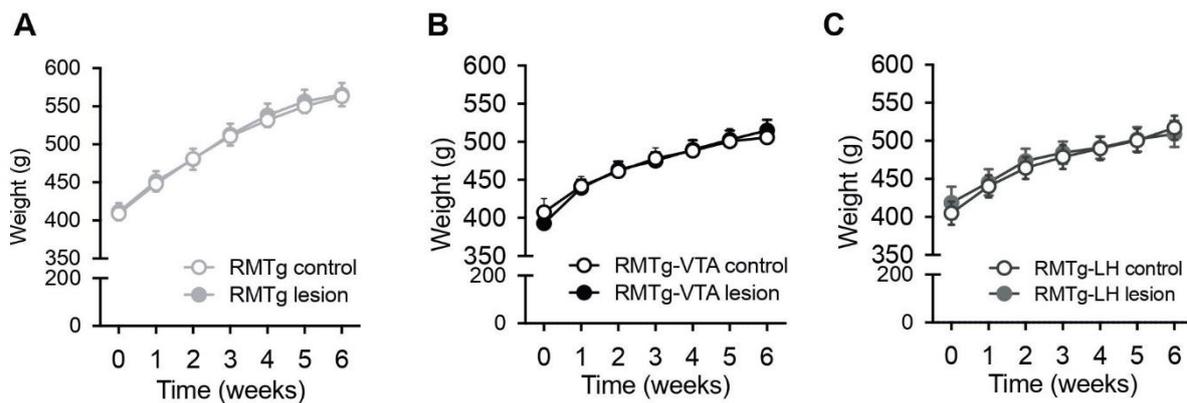


Fig. S4

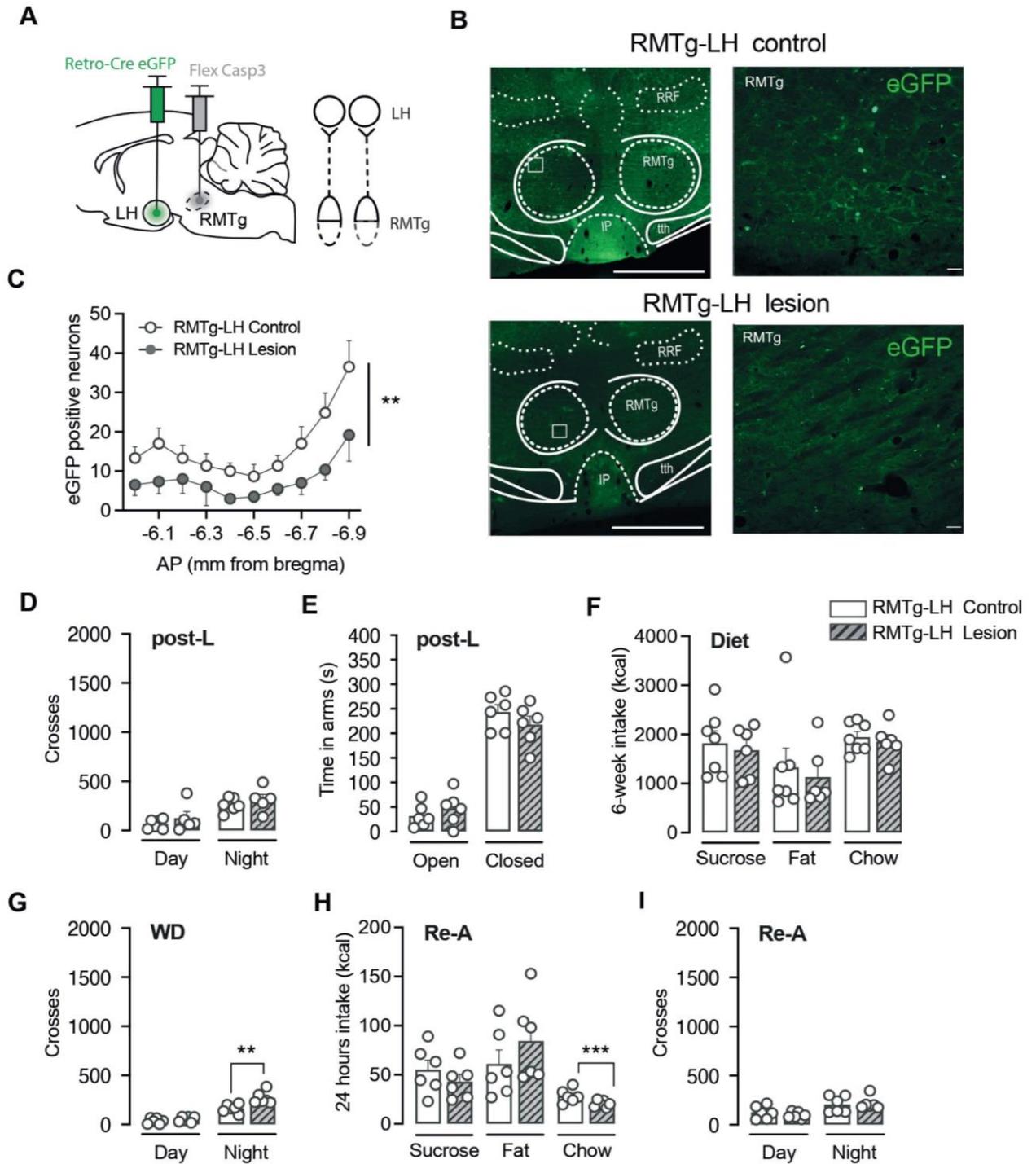


Fig. S5

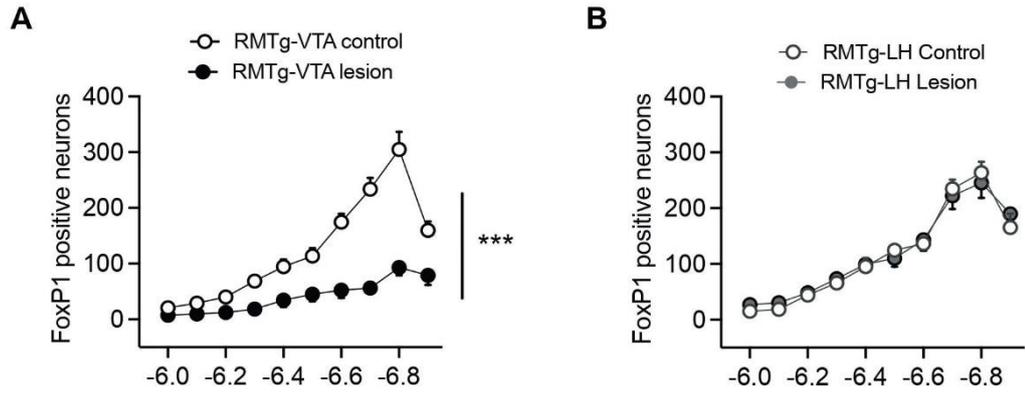


Fig. S6

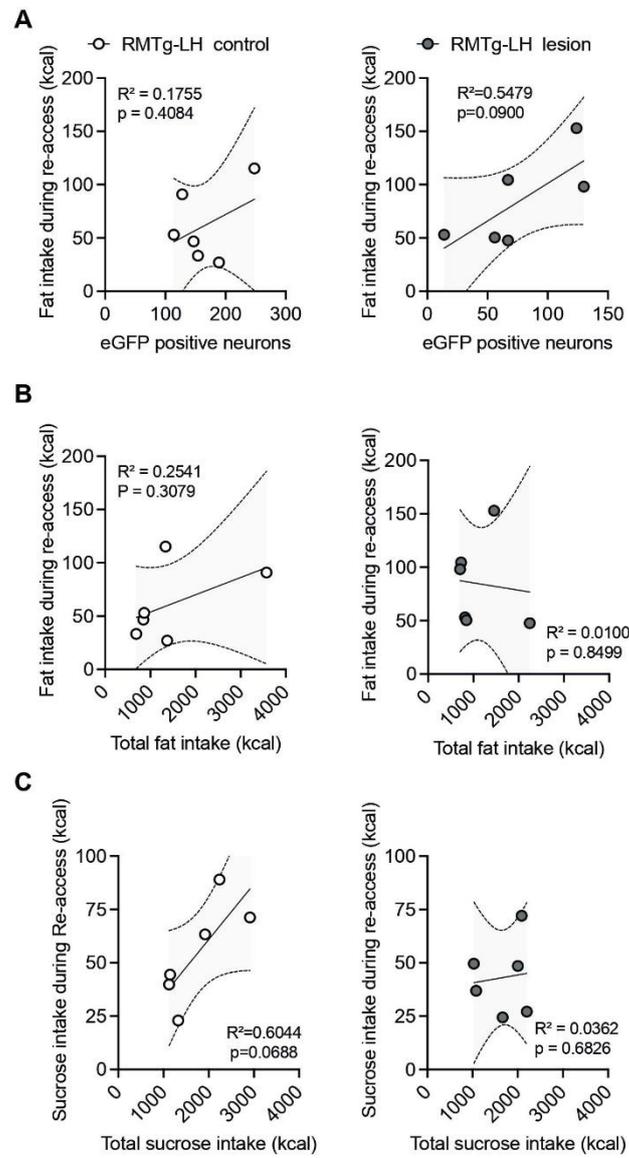


Fig. S7

References

1. Balcita-Pedicino, J. J., Omelchenko, N., Bell, R. & Sesack, S. R. The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: Ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J. Comp. Neurol.* **519**, 1143–1164 (2011).
2. Balodis, I. M. *et al.* Divergent neural substrates of inhibitory control in binge eating disorder relative to other manifestations of obesity. *Obesity* **21**, 367–377 (2013).
3. Bankhead, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* **7**, 16878 (2017).
4. Berridge, K. C. & Robinson, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews* **28**, 309–369 (1998).
5. Berridge, K. C. From prediction error to incentive salience: mesolimbic computation of reward motivation. *Eur J of Neuroscience* **35**, 1124–1143 (2012).
6. Blum, K. Neuro-Genetics of Reward Deficiency Syndrome (Rds) as the Root Cause of “Addiction Transfer”: A New Phenomena Common after Bariatric Surgery. *J Genet Syndr Gene Ther* **04**, (2013).
7. Boekhoudt, L. *et al.* Chemogenetic activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area, but not substantia nigra, induces hyperactivity in rats. *European Neuropsychopharmacology* **26**, 1784–1793 (2016).
8. Bourdy, R. & Barrot, M. A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends in Neurosciences* **35**, 681–690 (2012).
9. Bourdy, R. *et al.* The endocannabinoid system is modulated in reward and homeostatic brain regions following diet-induced obesity in rats: a cluster analysis approach. *Eur J Nutr* **60**, 4621–4633 (2021).
10. Bourdy, R. *et al.* Control of the Nigrostriatal Dopamine Neuron Activity and Motor Function by the Tail of the Ventral Tegmental Area. *Neuropsychopharmacol* **39**, 2788–2798 (2014).
11. Brown, P. L. *et al.* Habenula-Induced Inhibition of Midbrain Dopamine Neurons Is Diminished by Lesions of the Rostromedial Tegmental Nucleus. *J. Neurosci.* **37**, 217–225 (2017).
12. Carlin, J., Hill-Smith, T. E., Lucki, I. & Reyes, T. M. Reversal of dopamine system dysfunction in response to high-fat diet. *Obesity* **21**, 2513–2521 (2013).
13. Chang, G.-Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O. & Leibowitz, S. F. Maternal High-Fat Diet and Fetal Programming: Increased Proliferation of Hypothalamic Peptide-Producing Neurons That Increase Risk for Overeating and Obesity. *J. Neurosci.* **28**, 12107–12119 (2008).
14. Costall, B., Domeney, A. M. & Naylor, R. J. Locomotor hyperactivity caused by dopamine infusion into the nucleus accumbens of rat brain: specificity of action. *Psychopharmacology* **82**, 174–180 (1984).
15. Dela Cruz, J. A. D. *et al.* c-Fos induction in mesotelencephalic dopamine pathway projection targets and dorsal striatum following oral intake of sugars and fats in rats. *Brain Research Bulletin* **111**, 9–19 (2015).
16. Demeke, S. *et al.* Change in hyper-palatable food availability in the US food system over 30 years: 1988–2018. *Public Health Nutr.* **26**, 182–189 (2023).
17. Espitia-Bautista, E. & Escobar, C. Fat rather than sugar diet leads to binge-type eating, anticipation, effort behavior and activation of the corticolimbic system. *Nutritional Neuroscience* **24**, 508–519 (2021).
18. Ferrario, C. R. *et al.* Homeostasis Meets Motivation in the Battle to Control Food Intake. *J. Neurosci.* **36**, 11469–11481 (2016).
19. Ferreira, J. G. P., Del-Fava, F., Hasue, R. H. & Shammah-Lagnado, S. J. Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area–nigral complex in the rat. *Neuroscience* **153**, 196–213 (2008).
20. Fu, R. *et al.* Ablation of μ opioid receptor-expressing GABA neurons in rostromedial tegmental nucleus increases ethanol consumption and regulates ethanol-related behaviors. *Neuropharmacology* **107**, 58–67 (2016).

21. Gakare, S. G. & Ugale, R. R. Pharmacological evaluation of lateral habenula and rostromedial tegmental nucleus in the expression of ethanol-induced place preference. *Behav Pharmacol* **34**, 225–235 (2023).
22. Herkenham, M. & Nauta, W. J. H. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **187**, 19–47 (1979).
23. Hill, J. O. & Peters, J. C. Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. *Science* **280**, 1371–1374 (1998).
24. Hong, S., Zhou, T. C., Smith, M., Saleem, K. S. & Hikosaka, O. Negative Reward Signals from the Lateral Habenula to Dopamine Neurons Are Mediated by Rostromedial Tegmental Nucleus in Primates. *J. Neurosci.* **31**, 11457–11471 (2011).
25. Huff, M. L. & LaLumiere, R. T. The Rostromedial Tegmental Nucleus Modulates Behavioral Inhibition Following Cocaine Self-Administration in Rats. *Neuropsychopharmacol* **40**, 861–873 (2015).
26. Hyman, S. E., Malenka, R. C. & Nestler, E. J. NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 565–598 (2006).
27. Ip, C. K. *et al.* Critical role of lateral habenula circuits in the control of stress-induced palatable food consumption. *Neuron* **111**, 2583-2600.e6 (2023).
28. Jalabert, M. *et al.* Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 16446–16450 (2011).
29. Jennings, J. H., Rizzi, G., Stamatakis, A. M., Ung, R. L. & Stuber, G. D. The Inhibitory Circuit Architecture of the Lateral Hypothalamus Orchestrates Feeding. *Science* **341**, 1517–1521 (2013).
30. Zhou, T. C. The rostromedial tegmental (RMTg) “brake” on dopamine and behavior: A decade of progress but also much unfinished work. *Neuropharmacology* **198**, 108763 (2021).
31. Zhou, T. C. The rostromedial tegmental (RMTg) “brake” on dopamine and behavior: A decade of progress but also much unfinished work. *Neuropharmacology* **198**, 108763 (2021).
32. Zhou, T. C. The rostromedial tegmental (RMTg) “brake” on dopamine and behavior: A decade of progress but also much unfinished work. *Neuropharmacology* **198**, 108763 (2021).
33. Zhou, T. C., Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B. & Holland, P. C. The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron* **61**, 786–800 (2009).
34. Zhou, T. C., Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B. & Holland, P. C. The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron* **61**, 786–800 (2009).
35. Zhou, T. C. *et al.* Cocaine Drives Aversive Conditioning via Delayed Activation of Dopamine-Responsive Habenular and Midbrain Pathways. *J. Neurosci.* **33**, 7501–7512 (2013).
36. Kalivas, P. W., Duffy, P. & Eberhardt, H. Modulation of A10 dopamine neurons by gamma-aminobutyric acid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **253**, 858–866 (1990).
37. Kalivas, P. W., Widerlöv, E., Stanley, D., Breese, G. & Prange, A. J. Enkephalin action on the mesolimbic system: a dopamine-dependent and a dopamine-independent increase in locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther* **227**, 229–237 (1983).
38. Kalivas, P. W. & Bronson, M. Mesolimbic dopamine lesions produce an augmented behavioral response to enkephalin. *Neuropharmacology* **24**, 931–936 (1985).
39. Karnani, M. M. *et al.* Role of spontaneous and sensory orexin network dynamics in rapid locomotion initiation. *Progress in Neurobiology* **187**, 101771 (2020).
40. Kaufling, J., Veinante, P., Pawlowski, S. A., Freund-Mercier, M.-J. & Barrot, M. γ -Aminobutyric Acid Cells with Cocaine-Induced Δ FosB in the Ventral Tegmental Area Innervate Mesolimbic Neurons. *Biological Psychiatry* **67**, 88–92 (2010).
41. Kelly, P. H. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal or mesolimbic dopamine-containing terminals and the drug-induced rotation of rats. *Brain Research* **100**, 163–169 (1975).
42. Kenny, P. J. Reward Mechanisms in Obesity: New Insights and Future Directions. *Neuron* **69**, 664–679 (2011).
43. Koekkoek, L. L. *et al.* Disruption of lateral hypothalamic calorie detection by a free choice high fat diet. *The FASEB Journal* **35**, e21804 (2021).

44. Lavezzi, H. N., Parsley, K. P. & Zahm, D. S. Modulation of Locomotor Activation by the Rostromedial Tegmental Nucleus. *Neuropsychopharmacol* **40**, 676–687 (2015).
45. Liu, L. *et al.* Physiological Implications of Orexins/Hypocretins on Energy Metabolism and Adipose Tissue Development. *ACS Omega* **5**, 547–555 (2020).
46. Liu, S. *et al.* Consumption of palatable food primes food approach behavior by rapidly increasing synaptic density in the VTA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 2520–2525 (2016).
47. Mazzone, C. M. *et al.* High-fat food biases hypothalamic and mesolimbic expression of consummatory drives. *Nat Neurosci* **23**, 1253–1266 (2020).
48. Morel, C. *et al.* Midbrain projection to the basolateral amygdala encodes anxiety-like but not depression-like behaviors. *Nat Commun* **13**, 1532 (2022).
49. Nieh, E. H. *et al.* Decoding Neural Circuits that Control Compulsive Sucrose Seeking. *Cell* **160**, 528–541 (2015).
50. Pankevich, D. E., Teegarden, S. L., Hedin, A. D., Jensen, C. L. & Bale, T. L. Caloric Restriction Experience Reprograms Stress and Orexigenic Pathways and Promotes Binge Eating. *J. Neurosci.* **30**, 16399–16407 (2010).
51. Quansah Amissah, R., Basha, D., Bukhtiyarova, O., Timofeeva, E. & Timofeev, I. Neuronal activities during palatable food consumption in the reward system of binge-like eating female rats. *Physiology & Behavior* **242**, 113604 (2021).
52. Robinson, T. E. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitivity theory of addiction.
53. Rossi, M. A. *et al.* Transcriptional and functional divergence in lateral hypothalamic glutamate neurons projecting to the lateral habenula and ventral tegmental area. *Neuron* **109**, 3823–3837.e6 (2021).
54. Rossi, M. A. *et al.* Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding. *Science* **364**, 1271–1274 (2019).
55. Sakurai, T. The role of orexin in motivated behaviours. *Nat Rev Neurosci* **15**, 719–731 (2014).
56. Sánchez-Catalán, M.-J. & Barrot, M. Fos response of the tail of the ventral tegmental area to food restriction entails a prediction error processing. *Behavioural Brain Research* **425**, 113826 (2022).
57. Sharma, S., Fernandes, M. F. & Fulton, S. Adaptations in brain reward circuitry underlie palatable food cravings and anxiety induced by high-fat diet withdrawal. *Int J Obes* **37**, 1183–1191 (2013).
58. Slomp, M. *et al.* Free-choice high-fat diet consumption reduces lateral hypothalamic GABAergic activity, without disturbing neural response to sucrose drinking in mice. *Front. Neurosci.* **17**, 1219569 (2023).
59. Smith, R. J., Vento, P. J., Chao, Y. S., Good, C. H. & Jhou, T. C. Gene expression and neurochemical characterization of the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) in rats and mice. *Brain Struct Funct* **224**, 219–238 (2019).
60. Teegala, S. B. *et al.* Lateral hypothalamus hypocretin/orexin glucose-inhibited neurons promote food seeking after calorie restriction. *Molecular Metabolism* **76**, 101788 (2023).
61. Teegarden, S. L. & Bale, T. L. Decreases in Dietary Preference Produce Increased Emotionality and Risk for Dietary Relapse. *Biological Psychiatry* **61**, 1021–1029 (2007).
62. Tenk, C. M. & Felfeli, T. Sucrose and fat content significantly affects palatable food consumption in adolescent male and female rats. *Appetite* **118**, 49–59 (2017).
63. Thomas, C. S. *et al.* Optogenetic stimulation of lateral hypothalamic orexin/dynorphin inputs in the ventral tegmental area potentiates mesolimbic dopamine neurotransmission and promotes reward-seeking behaviours. *Neuropsychopharmacol.* **47**, 728–740 (2022).
64. True, C. *et al.* Early High-Fat Diet Exposure Causes Dysregulation of the Orexin and Dopamine Neuronal Populations in Nonhuman Primates. *Front. Endocrinol.* **9**, 508 (2018).
65. Vento, P. J., Burnham, N. W., Rowley, C. S. & Jhou, T. C. Learning From One's Mistakes: A Dual Role for the Rostromedial Tegmental Nucleus in the Encoding and Expression of Punished Reward Seeking. *Biological Psychiatry* **81**, 1041–1049 (2017).
66. Vialou, V. *et al.* A Role for Δ FosB in Calorie Restriction-Induced Metabolic Changes. *Biological Psychiatry* **70**, 204–207 (2011).
67. Volkow, N. D., Wise, R. A. & Baler, R. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nat Rev Neurosci* **18**, 741–752 (2017).

68. Wang, S., Tan, Y., Zhang, J.-E. & Luo, M. Pharmacogenetic activation of midbrain dopaminergic neurons induces hyperactivity. *Neurosci. Bull.* **29**, 517–524 (2013).
69. Yoshida, K., McCormack, S., España, R. A., Crocker, A. & Scammell, T. E. Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J of Comparative Neurology* **494**, 845–861 (2006).
70. Zhao, Y.-N. *et al.* GABAergic neurons in the rostromedial tegmental nucleus are essential for rapid eye movement sleep suppression. *Nat Commun* **13**, 7552 (2022).
71. Zweifel, L. S. *et al.* Activation of dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety. *Nat Neurosci* **14**, 620–626 (2011).

II : Analyses supplémentaires

Cette partie consiste en la description des résultats d'expériences supplémentaires reliées au manuscrit précédent, ces expériences et analyses supplémentaires (Restriction alimentaire, consommation jour vs nuit, analyse de clusters) ne sont pas présentes dans le manuscrit. Néanmoins, le matériel et méthode détaillé de chaque expérience est présent dans la thèse.

II-A : Analyse de l'activation neuronale du RMTg après une restriction alimentaire : suivi de l'expression de c-Fos

L'une des premières études réalisées sur le RMTg a montré qu'une restriction alimentaire conduit à une expression de c-Fos dans les neurones du RMTg projetant à la VTA (Jhou *et al.*, 2009b), indiquant une forte implication de la structure dans la régulation de la prise alimentaire. Cependant, une étude plus récente a contredit ce résultat en montrant que cette induction de c-Fos venait en réalité de l'erreur de prédiction négative (Sánchez-Catalán *et al.*, 2021). Malheureusement, le manque de détail du protocole de restriction alimentaire utilisé dans la première étude ne nous permet pas d'identifier le/les facteur(s) qui contribue(nt) à cette différence mais cette différence peut être dû à la durée courte du protocole de restriction dans la seconde étude où les rats sont mis à mort après sept jours. Dans cette étude nous avons procédé à une restriction alimentaire (**Cf Matériels&Méthodes, III-D Protocole de restriction alimentaire**) plus longue de celle de l'étude de Sánchez-Catalán (11 jours) afin de vérifier si une restriction alimentaire plus poussée peut effectivement conduire à une induction de c-Fos dans le RMTg. La restriction alimentaire maintenue pendant 11 jours (**Fig. 31A**) conduit à une diminution progressive du poids des rats jusqu'à atteindre 90% de leur poids initial (**Fig. 31C**).

L'analyse post-mortem du RMTg par immunofluorescence montre un nombre de neurones exprimant c-Fos (c-Fos+) plus important dans le RMTg après une restriction alimentaire (**Fig. 31B**) et un comptage réalisé sur différents niveaux d'antéropostériorité montre que l'expression des neurones c-Fos+ a surtout lieu dans la partie antérieure du RMTg, plus particulièrement à bregma -6.20 mm (**Fig. 31D**, contrôle vs restriction, Two-WAY ANOVA, AP x Group $F(9,38)=0.0203$, Bonferroni Post-hoc, $t(38)=4.764$, $p=0.0003$). Globalement, le nombre total de neurones c-Fos+

est plus important chez les rats ayant subi une restriction alimentaire (**Fig. 31D**, contrôle vs restriction, Student T-test, $t(4)=3.1997$, $p=0.03291$).

Cette expérience montre ainsi que la restriction alimentaire conduit à une induction, bien que faible, de c-Fos dans le RMTg et ainsi corrobore les observations de l'une des premières études fonctionnelles sur le RMTg (Jhou *et al.*, 2009b) où un traçage rétrograde a montré que les neurones du RMTg qui projettent à la VTA expriment c-Fos après une restriction alimentaire. Il serait intéressant de reproduire cette expérience avec une restriction alimentaire beaucoup plus longue (supérieure à deux-trois semaines) afin de voir si l'induction de c-Fos est plus remarquable et il pourrait être intéressant de combiner cette restriction avec un traçage rétrograde dans la VTA afin de voir si cette induction de c-Fos concerne bien les neurones du RMTg projetant à la VTA.

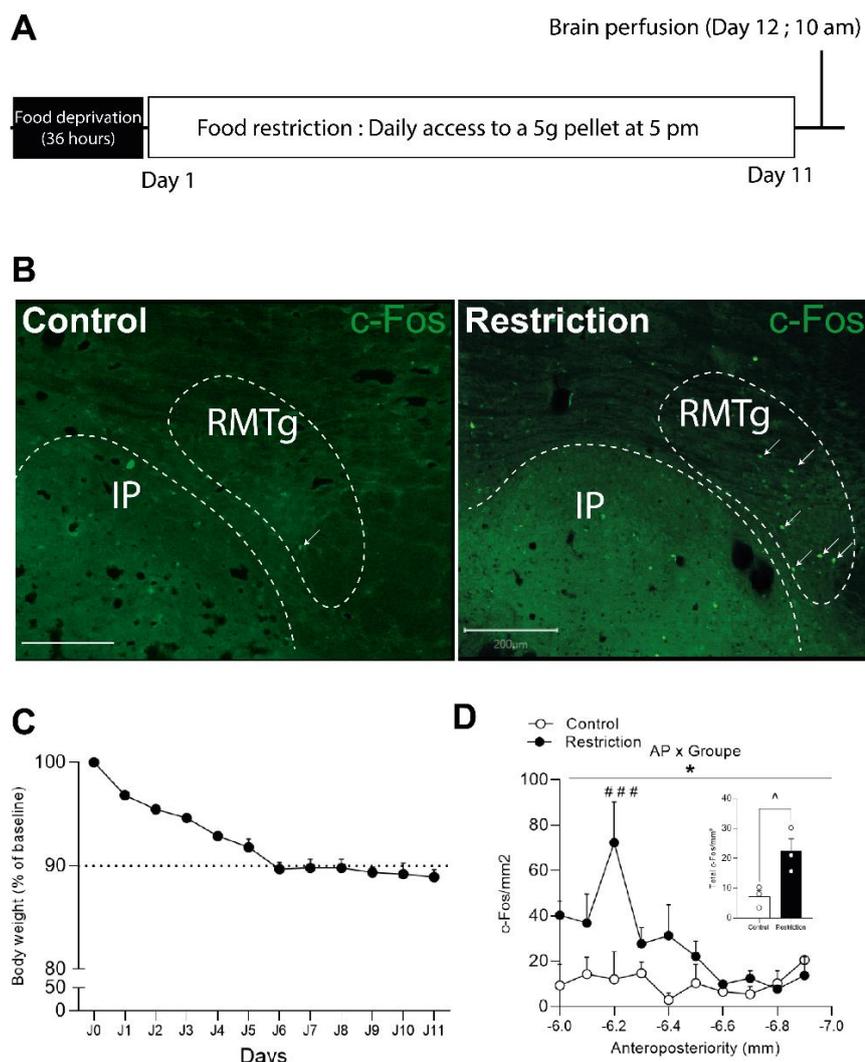


Figure 31 : Une restriction alimentaire provoque l'expression de c-Fos dans le RMTg

A Chronologie du protocole de restriction alimentaire. Les rats (n=3/groupe) sont privés de nourriture pendant 36 heures avant de recevoir une croquette de 5 g à 17 heures, chaque jour pendant 11 jours. Des rats du groupe contrôle ayant accès *ad libitum* à la nourriture standard sont suivis en parallèle. Les rats sont mis à mort le 12eme jour à 10h du matin (en période de restriction). **B** La restriction alimentaire conduit à une expression plus importante du marqueur d'activité neuronale c-Fos (image de droite) en comparaison à des rats du groupe contrôle (image de gauche). Barre d'échelle blanche = 200 µm, les flèches blanches indiquent les neurones c-Fos positifs. **C** Après 11 jours de restriction alimentaire, les rats perdent ~10% de leur masse initiale, la ligne en pointillé représente 90% du poids mesuré à J0. **D** Une restriction alimentaire conduit à une expression de c-Fos dans la partie antérieure du RMTg, plus particulièrement à -6.2 mm.

* : p<0,05 : Two-WAY ANOVA, Interaction effect ; ### : p<0.001 : Bonferroni Post-Hoc
^ : p<0,05, Student T-test

II-B : La voie RMTg-VTA dans la prise alimentaire

II-B-1 : Effets de la lésion sur la prise alimentaire en période diurne et nocturne

La mesure de la prise alimentaire pendant les six semaines de régime au début de la phase diurne (7h-19h) et avant le début de la phase nocturne (19h-7h) nous a permis d'étudier si la lésion de la voie RMTg-VTA affecte la prise alimentaire selon la phase du cycle jour/nuit. En effet, la prise alimentaire des rats a largement lieu pendant la phase nocturne, correspondant à la phase d'extinction de l'animalerie (Sidlo *et al.*, 1995). Or, la VTA étant impliquée dans la régulation de la prise alimentaire selon le rythme circadien (Koch *et al.*, 2020). De ce fait, il est possible qu'une lésion de cette voie affecte la rythmicité de la prise alimentaire. L'ensemble des mesures réalisées indique que la lésion de la voie n'affecte pas la consommation de nourriture palatable ou standard pendant la phase diurne (**Fig. 32A**, RMTg-VTA contrôle vs lésion, Two-WAY ANOVA, Main group effect, $F(1,14)=1.177$, $p=0.2964$) ni la prise calorique cumulée pendant les six semaines que ce soit pour le gras (**Fig. 33A**, RMTg-VTA contrôle vs lésion, Two-WAY-ANOVA, Group X Weeks effect, $F(5,70)=0.06060$, $p=0.9975$), le saccharose (**Fig. 33B**, RMTg-VTA contrôle vs lésion, Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect, $F(5,70)=0.4121$, $p=0.8388$) ou de nourriture standard

(**Fig. 33C**, RMTg-VTA contrôle vs lésion : Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect $F(5,70)=0.3167$, $p=0.9014$). La lésion de la voie RMTg-VTA n'affecte pas non plus la consommation moyenne de chacun des items pendant la phase nocturne (**Fig. 34A**, RMTg-VTA contrôle vs lésion, Two WAY ANOVA, Main group effect, $F(1,14)=0.4069$, $p=0.5538$) ni la prise calorique cumulée pendant la phase nocturne (**Fig. 34B** RMTg-VTA contrôle vs lésion, Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect, $F(15,120)=1.385$, $p=0.1653$). Cependant, une analyse en dissociant chacun des aliments montre que la prise cumulée de gras pendant la phase nocturne est plus importante chez les rats avec la lésion de la voie RMTg-VTA (**Fig. 35A**, RMTg-VTA contrôle vs lésion, Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect $F(5,70)=3.774$, $p=0.0044$) et, au terme des six semaines de régime, la consommation totale de gras est plus importante chez les rats avec la lésion (Student T-Test avec correction de Bonferroni, $t(7,9) = 3.041$, $p=0.0187$). La lésion n'impacte pas la consommation cumulée de saccharose pendant la phase nocturne (**Fig. 35B** RMTg-VTA contrôle vs lésion Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect, $F(5,70)=0.5806$, $p=0.7147$). Néanmoins, la consommation cumulée de nourriture standard est plus importante chez les rats avec la lésion (**Fig. 35C** RMTg-VTA contrôle vs lésion, Two-WAY ANOVA, Group X Weeks, $F(5,70)=2.691$, $p=0.0278$) mais, bien qu'une tendance soit visible, au terme des six semaines de régime, la consommation totale de nourriture standard n'est pas statistiquement plus importante chez le groupe lésion (RMTg-VTA contrôle vs lésion, Student T-test avec correction de Bonferroni, , $t(7,9)=2.608$, $p=0.0629$).

Ces résultats nous indiquent que la lésion de la voie RMTg-VTA n'affecte pas le rythme « classique » de la prise alimentaire chez les rongeurs avec une consommation essentiellement pendant la phase nocturne. Cependant, l'analyse de la consommation de chacun des items indique que la lésion conduit à une consommation plus importante de gras pendant la phase nocturne.

Light phase (7h-19h)

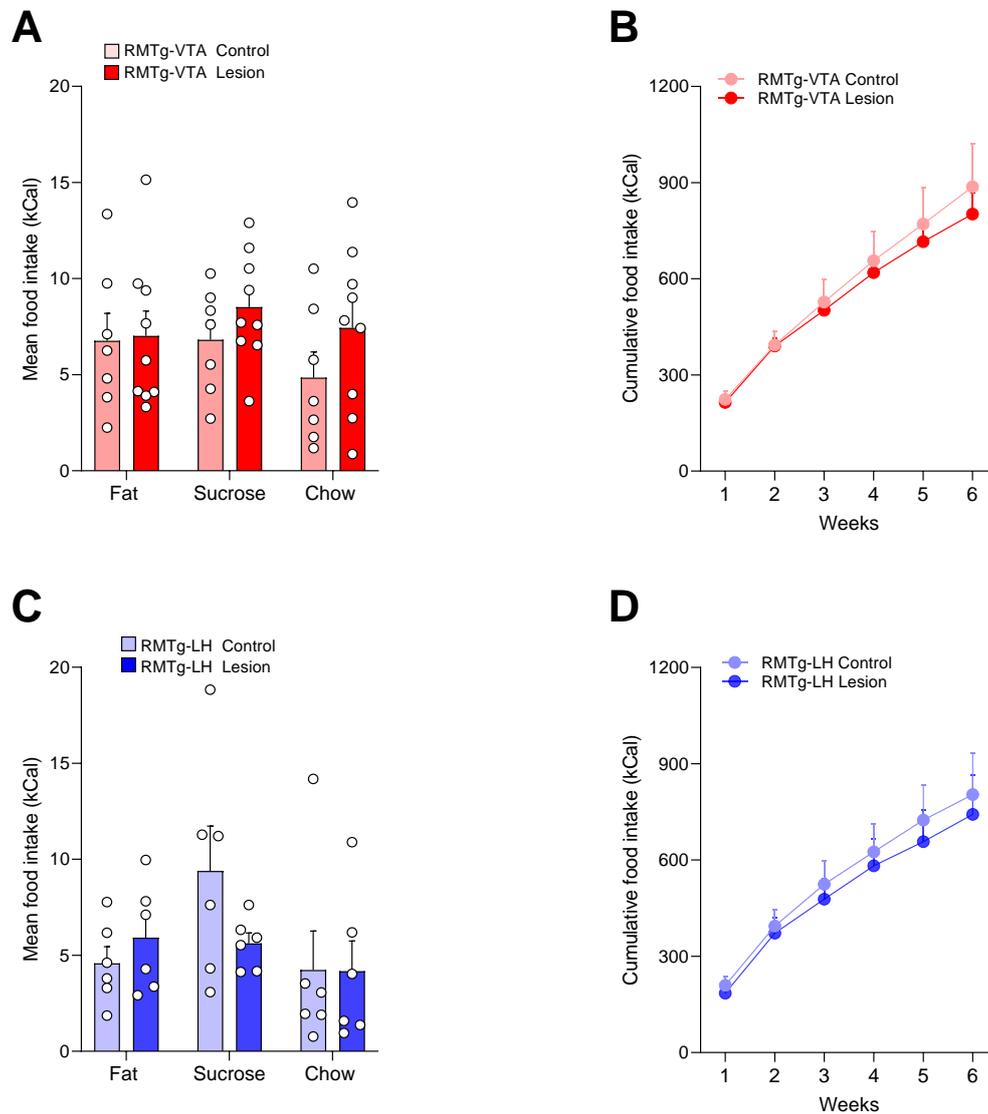


Figure 32 : Une lésion spécifique de la voie RMTg-VTA ou de la voie RMTg-LH n'affecte pas la prise alimentaire totale pendant la phase diurne

A Dans le modèle fCHFHS, la consommation moyenne de nourriture standard ou palatable n'est pas affectée par la lésion de la voie RMTg-VTA. **B** La prise calorique cumulée sur les six semaines de régime n'est pas affectée par une lésion de la voie RMTg-VTA. **C** La consommation moyenne de nourriture standard ou palatable pendant la phase diurne n'est pas affectée par une lésion de la voie RMTg-LH. **D** La prise calorique cumulée pendant la phase diurne sur les six semaines de régime n'est pas affectée par la lésion de la voie RMTg-LH.

Light phase (7h-19h)

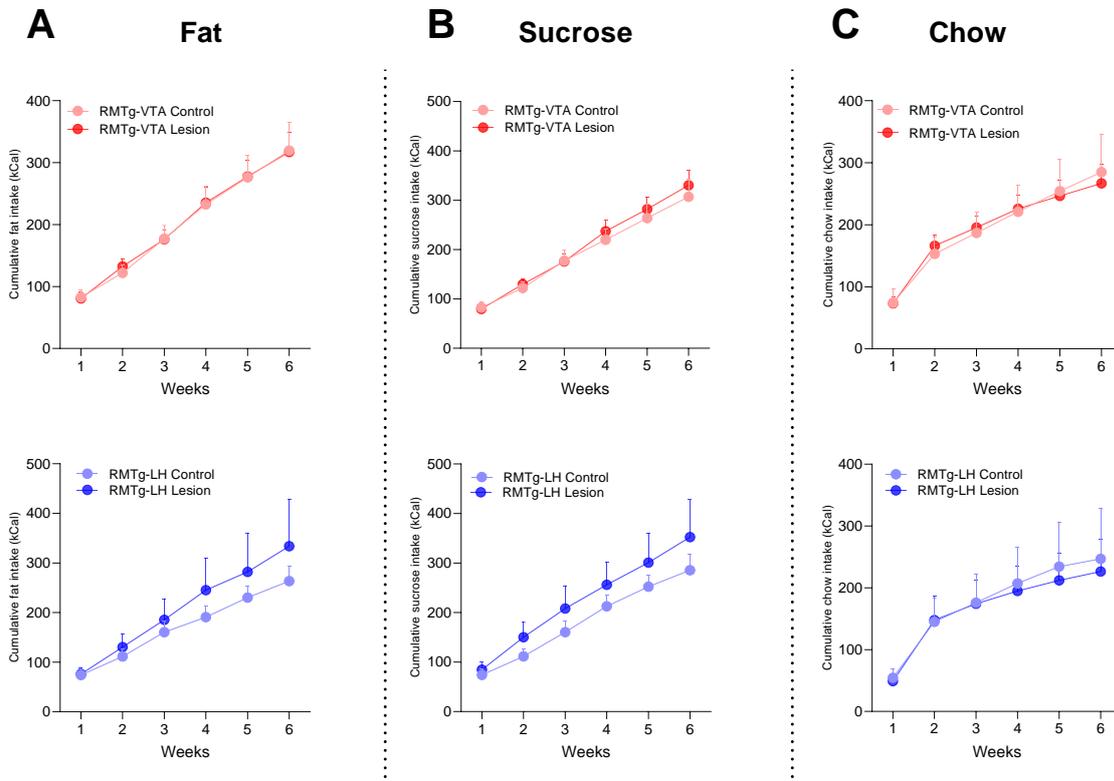


Figure 33 : Une lésion spécifique de la voie RMTg-VTA ou de la voie RMTg-LH n'affecte pas la consommation cumulée de nourriture standard et palatable pendant la phase diurne

Dans le modèle fCHFHS, la lésion de la voie RMTg-VTA ou de la voie RMTg-LH n'affecte pas la consommation cumulée de gras **A**, de saccharose **B** ou de nourriture standard **C**, pendant les six semaines de régime.

Dark phase (19h-7h)

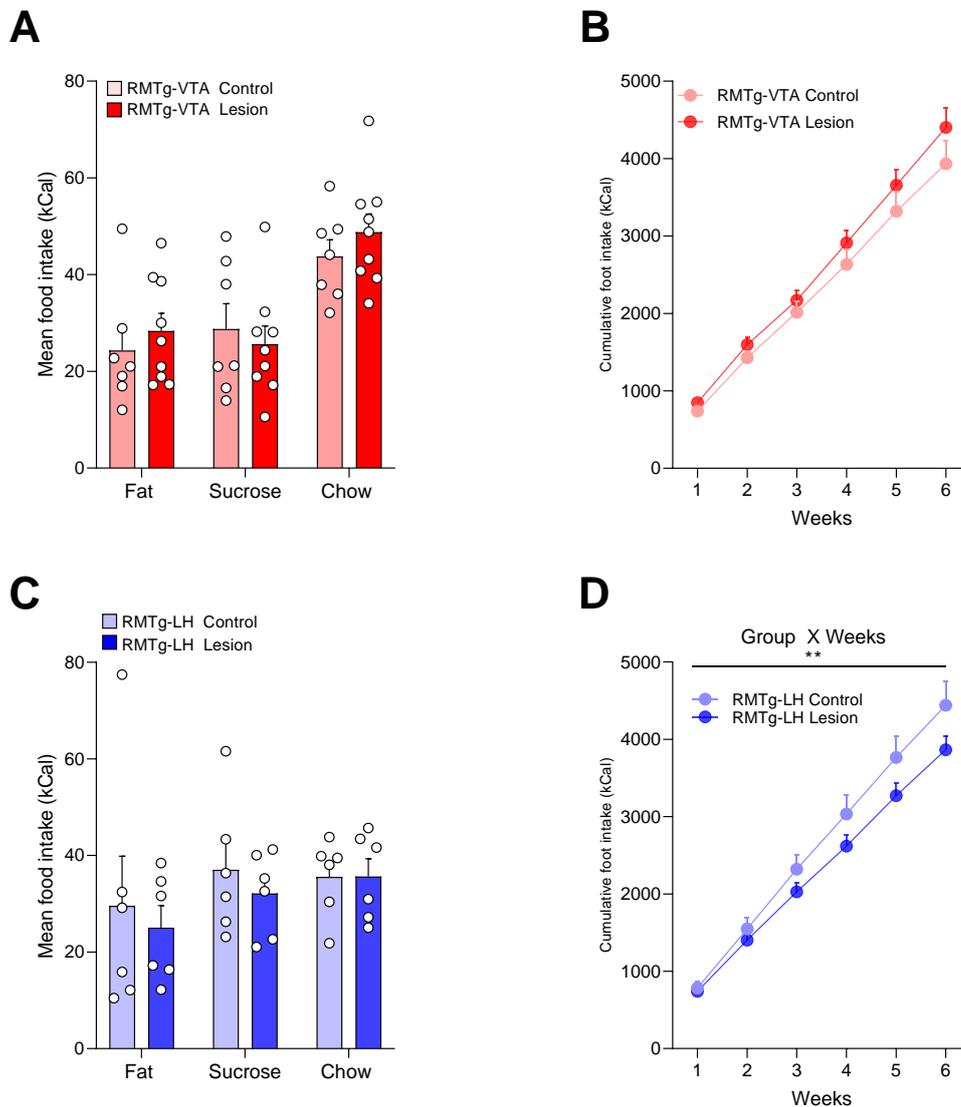


Figure 34 : Une lésion spécifique de la voie RMTg-LH, mais pas de la voie RMTg-VTA, réduit la prise alimentaire totale pendant la phase nocturne.

A Dans le modèle fCHFHS la consommation moyenne de nourriture standard ou palatable n'est pas affectée par la lésion de la voie RMTg-VTA. **B** La prise calorique cumulée sur les six semaines de régime n'est pas affectée par la lésion de la voie RMTg-VTA. **C** La consommation moyenne de nourriture standard ou palatable n'est pas affectée par la lésion de la voie RMTg-LH. **D** La prise calorique cumulée sur les six semaines de régime est réduite chez les rats avec une lésion de la voie RMTg-LH.

** : $p < 0.01$ (Two-WAY ANOVA, Group X Weeks, Interaction effect).

Dark phase (19h-7h)

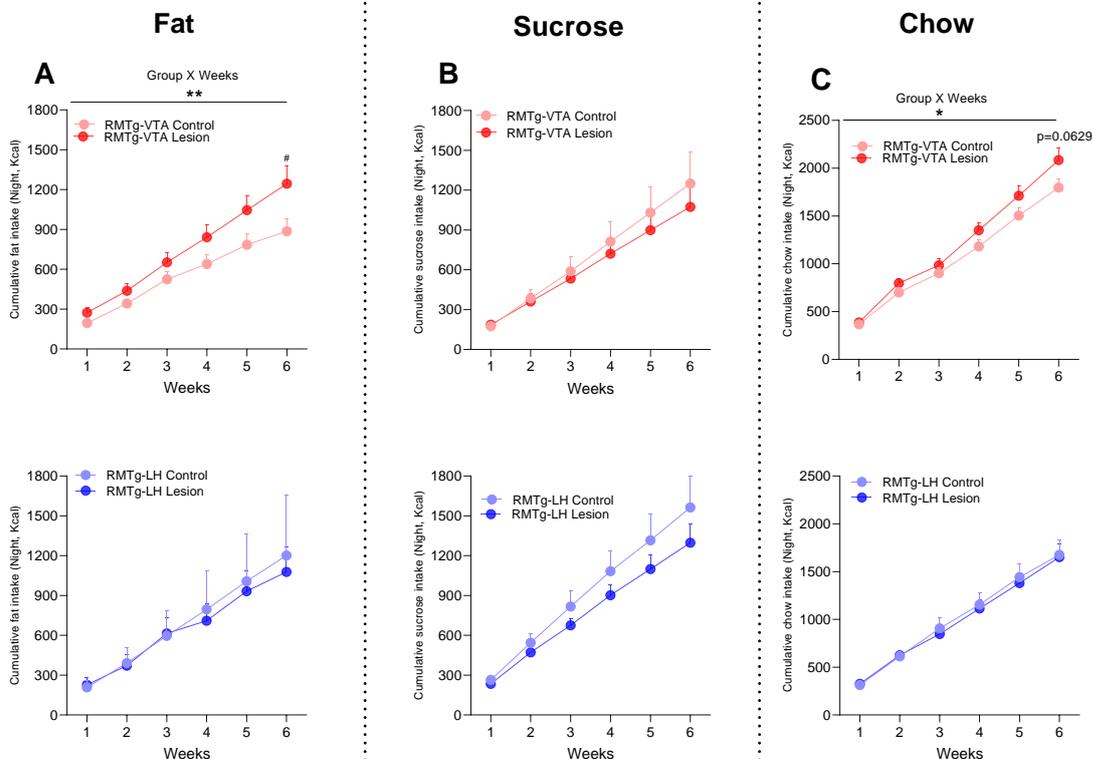


Figure 35 : Une lésion spécifique de la voie RMTg-VTA, mais pas de la voie RMTg-LH, conduit à une consommation de gras et de nourriture standard plus importante

A Dans le modèle fCHFHS, La consommation cumulée et totale de gras pendant les six semaines de régime est plus importante chez les rats après une lésion de la voie RMTg-VTA mais pas chez les rats avec une lésion de la voie RMTg-LH. **B** La consommation cumulée et totale de saccharose pendant les six semaines de régime n'est pas affectée par la lésion de la voie RMTg-VTA ou de la voie RMTg-LH. **C** La consommation cumulée de nourriture standard pendant les six semaines de régime est plus importante chez les rats après une lésion de la voie RMTg-VTA mais la consommation totale n'est pas significativement plus importante dans le groupe de rats avec la lésion RMTg-VTA. La lésion de la voie RMTg-LH n'a pas d'effet sur la consommation cumulée et totale de nourriture standard.

** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$ (Two-WAY-ANOVA Group X Weeks) ; # : $p < 0.05$ post-Hoc de Bonferroni (Group, effect, semaine 6).

II-B-2 : Effets de la lésion sur le sevrage et la rechute face à la nourriture palatable

Lors du réaccès, la consommation de gras (**Fig. 36A**) ne diffère pas entre le groupe contrôle et le groupe lésion après 1h (RMTg-VTA contrôle vs. lésion, Student T-test, $t(14)=1.641$, $p=0.1231$) ou 4h (RMTg-VTA contrôle vs. lésion, Student T-test, $t(14)=0.6890$, $p=0.5021$) mais la consommation totale de gras au terme des 24h est plus importante dans le groupe lésion (RMTg-VTA contrôle vs. lésion, Student T-test, $t(14)=2.360$, $p=0.0333$). La consommation de saccharose pendant le réaccès n'est pas affectée par la lésion (**Fig. 36B**, RMTg-VTA contrôle vs lésion, 1h : Student T-test, $t(14)=0.3486$, $p=0.7326$, 4h : Student T-test , $t(14)=0.2038$, $p=0.8414$; 24h : Student T-test, $t(14)=0.5241$, $p=0.6085$). Néanmoins, la lésion de la voie RMTg-VTA entraîne une consommation plus importante de nourriture standard (**Fig. 36C**) après 4h de réaccès (RMTg-VTA contrôle vs lésion, 1h : Student T-test, $t(14)=1.297$, $p=0.2156$, 4h : $t(14)=3.335$, $p=0.0049$; 24h : $t(14)=1.441$; $p=0.1716$). Cette expérience confirme que la consommation de nourriture palatable semble avoir lieu essentiellement pendant la phase nocturne et la lésion conduit à une consommation très importante de gras après une longue période de sevrage. Ainsi, le RMTg aurait essentiellement après une période de sevrage prolongée.

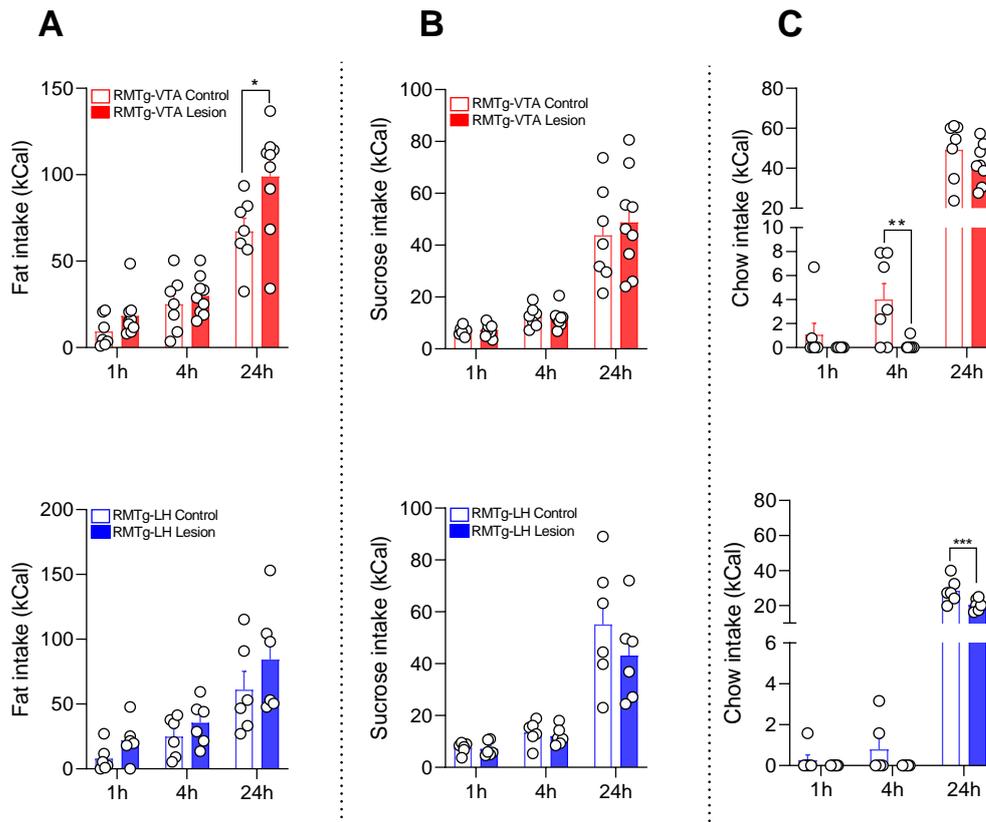


Figure 36 : La lésion de la voie RMTg-VTA ou de la voie RMTg-LH affecte la consommation de gras et de nourriture standard pendant la période de ré-accès. Dans le modèle fCHFHS (6 semaines) et suite à une période sans nourriture palatable de 4 semaines, une période de 24h de ré-accès à la nourriture est effectuée. **A** La lésion de la voie RMTg-VTA conduit à une consommation plus importante de gras après 24h de ré-accès. Il n'y a pas d'effet de la lésion de la voie RMTg-LH. **B** La lésion de la voie RMTg-VTA ou de la voie RMTg-LH n'affecte pas la consommation de saccharose pendant les 24h de ré-accès. **C** La lésion de la voie RMTg-VTA conduit à une consommation moins importante de nourriture standard observable 4h après le ré-accès, tandis que la lésion de la voie RMTg-LH provoque une moindre consommation de nourriture standard observable après 24h de ré-accès.

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ (Student T-test).

II-B-3 : Résultats d'une analyse de clusters non supervisée basée sur les données comportementales des groupes avec la lésion RMTg-VTA et le groupe contrôle

Nous avons ensuite procédé à une analyse des K-moyens (**Cf : Matériels et méthodes, VIII-D Analyse en clusters et en composantes principales (PCA)**) en prenant en compte l'essentiel de nos données comportementales (**Fig. 37A**). Le but de cette séparation en clusters est de voir si une analyse non supervisée (analyse qui permet une séparation en groupes uniquement sur une base de variables) permet de retrouver la séparation en groupe RMTg-VTA contrôle et RMTg-VTA lésion et de déterminer quelles variables sont les plus à même d'expliquer cette séparation. La détermination du nombre adéquat de clusters est réalisée à partir de la méthode des coudes (« Elbow Method ») (**Fig. 37A ; Cf : Matériels et méthodes, VIII-D-1 Principe de l'analyse en clusters**). Cette méthode permet de séparer l'ensemble des rats, à la fois du groupe RMTg-VTA contrôle et du groupe RMTg-VTA lésion, en K=2 clusters. Le cluster 1 (**Fig. 37B**) est composé exclusivement de rats du groupe RMTg-VTA lésion (n=6) tandis que le cluster 2 contient tous les rats du groupe RMTg-VTA contrôle (n=7) et 3 rats du groupe RMTg-VTA lésion. Une analyse en composantes principales (**Fig. 37C ; Cf : Matériel et méthodes, VIII-D-3 Principe de l'analyse PCA**), identifie les paramètres les plus à même d'expliquer la séparation en clusters. Ces paramètres sont l'actographie nocturne de la 1ère à la 4ème semaine de sevrage et lors de la rechute (WD1, WD2, WD3, WD4, ActoRe) ainsi que la consommation de gras et de nourriture standard au terme des 24h de réaccès (ChowRe, FatRe). L'analyse des actographies responsables de la séparation en clusters (**Fig. 37D**) montre une hyperactivité motrice du cluster 1 (Cluster 1 vs Cluster 2, Two-WAY-ANOVA, Main Group effect, $F(1,14)=33.76$, $p<0.0001$) et bien que la consommation de nourriture standard ne diffère pas entre les clusters 1 et 2 pendant le réaccès (**Fig. 37E**, Cluster 1 vs Cluster 2, Student T-test, $t(14)=1.819$, $p=0.0903$), le cluster 1 a une consommation de gras plus importante (Cluster 1 vs Cluster 2, Student T-test, $t(14)=4.346$, $p=0.0007$). Ainsi, cette analyse permet de retrouver assez fidèlement la séparation des groupes RMTg-VTA lésion et RMTg-VTA contrôle sur la seule base du profil comportemental et montre bien que la lésion conduit à un phénotype particulièrement remarquable soit une hyperactivité lors du sevrage et du réaccès ainsi qu'une surconsommation de gras pendant la rechute.

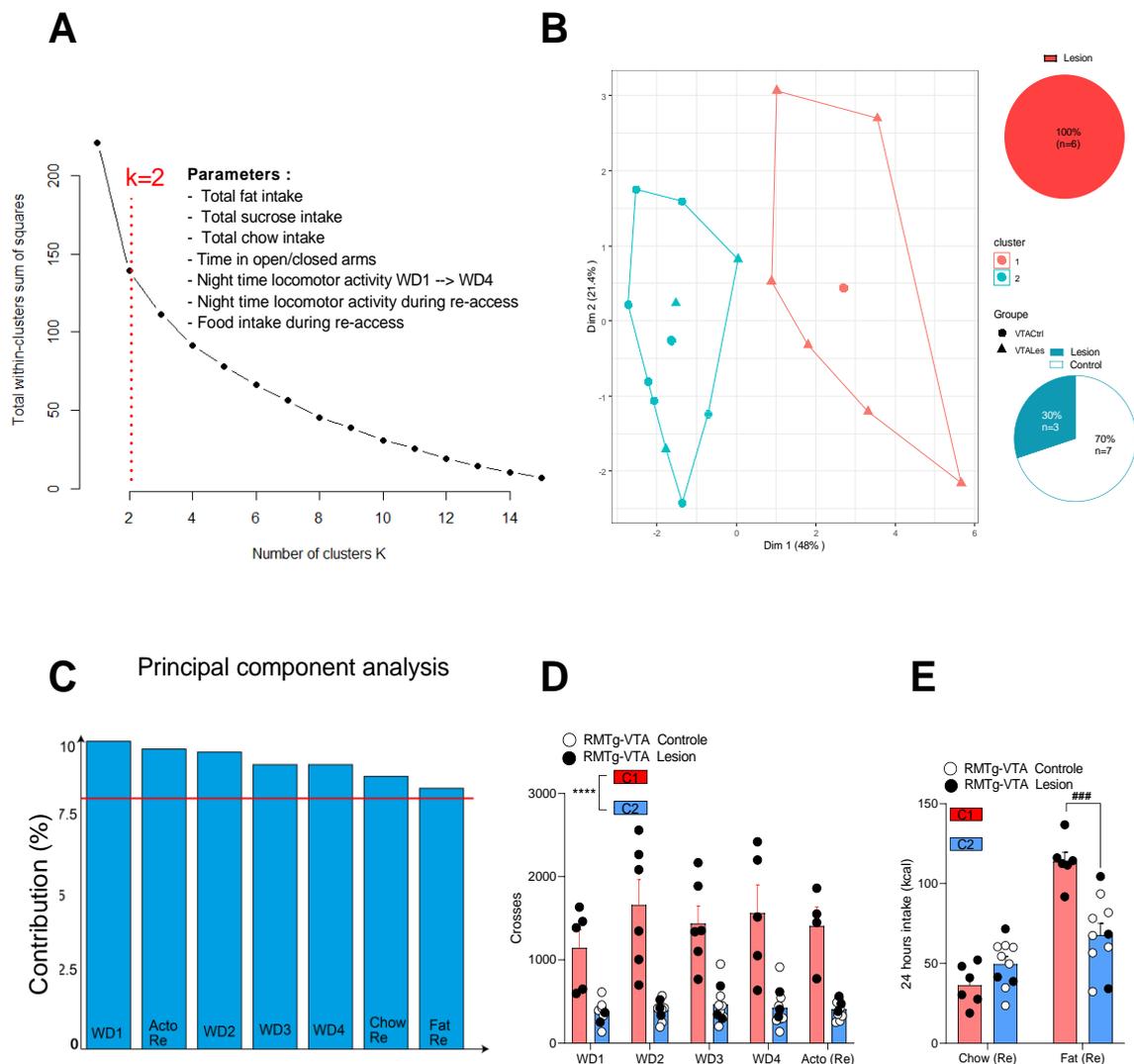


Figure 37 : Une analyse des K-moyens permet de séparer les animaux lésés pour la voie RMTg-VTA des rats contrôle. **A** La méthode des coudes permet de décomposer les données pour l'ensemble des rats du groupe lésion ou contrôle pour la voie RMTg-VTA en K=2 clusters. **B** Le cluster 1 est composé à 100% (n=6) de rats du groupe lésion tandis que le cluster 2 est composé à 70% (n=7) de rats contrôle et 30% (n=3) de rats avec la lésion. **C** Les paramètres ayant la plus grande contribution à la séparation en clusters (au-dessus de la ligne rouge) sont les actographies nocturnes pendant les 4 semaines de sevrage (WD1, WD2, WD3, WD4, et lors du Ré-access) ainsi que la consommation de nourriture standard et gras pendant la période de ré-access de 24h (ChowRE, FatRE). **D** Les rats du cluster 1 ont une activité locomotrice nocturne plus importante que les rats du cluster 2 pendant la période de sevrage. **E** La consommation de nourriture standard pendant la période de ré-access n'est pas différente entre les deux clusters mais la consommation de gras est plus importante chez les rats du cluster 1.

**** : $p < 0.0001$ (Two-WAY ANOVA, main group effect) ; ### : $p < 0.001$ (Student T-test).

II-C : La voie RMTg-LH dans la prise alimentaire

II-C-1 : Effets de la lésion sur la consommation d'aliments palatables et standards selon la période diurne/nocturne

Comme pour la lésion de la voie RMTg-VTA, l'effet de la lésion de la voie RMTg-LH sur la prise alimentaire a été analysé sur la prise alimentaire. Les mesures réalisées sur la phase diurne montrent que la lésion de la voie RMTg-LH n'affecte pas la consommation moyenne des items (**Fig. 32C**, RMTg-LH contrôle vs lésion, Two-WAY ANOVA, Main group effect, $F(1,10)=0.3676$, $p=0.5578$) et n'affecte pas la prise calorique cumulée (**Fig. 32D**, RMTg-LH contrôle vs lésion, Two-WAY ANOVA, Group X Weeks, $F(5,50)=0.1056$, $p=0.9906$). L'analyse de la consommation de chacun des items ne montre pas d'effet de la lésion que ce soit sur la consommation de gras (**Fig. 33A**, RMTg-LH contrôle vs. lésion, Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect, $F(5,50)=0.5161$, $p=0.7628$), de saccharose (**Fig. 33B**, RMTg-LH contrôle vs lésion Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect, $F(5,50)=0.4679$, $p=0.7983$) ou de nourriture standard (**Fig. 33C**, RMTg-LH contrôle vs Lésion: Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect, $F(5,50)=0.0917$, $p=0.9922$). Cependant, même si la consommation moyenne hebdomadaire pendant la phase nocturne n'est pas affectée par la lésion (**Fig. 34C**, RMTg-LH contrôle vs lésion, Two-WAY ANOVA, Main group effect, $F(1,10)=0.9265$, $p=0.3585$), la prise calorique cumulée pendant la phase nocturne (**Fig. 34D**) est plus faible chez les rats avec une lésion de la voie RMTg-LH (RMTg-LH Contrôle vs. Lésion, Two-WAY ANOVA, Group X Weeks, $F(5,50)=3.611$, $p=0.0073$). La lésion n'affecte pas non plus la consommation de chacun des aliments pendant la phase nocturne (**Fig. 35A/B/C** Gras : Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect, $F(5,50)=0.1339$, $p=0.9838$, Saccharose : Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect, $F(5,50)=0.9079$, $p=0.4835$, Nourriture standard : Two-WAY ANOVA, Group X Weeks effect, $F(5,50)=0.1863$, $p=0.9665$). Cette analyse permet de voir que la lésion de la voie RMTg-LH ne semble pas affecter la consommation de chacun des items du régime fchFHS mais semble avoir un effet sur la consommation calorique cumulée pendant la phase nocturne, phase pendant laquelle la prise alimentaire est la plus importante.

II-C-2 : Effets de la lésion sur le sevrage et la rechute face à la nourriture palatable

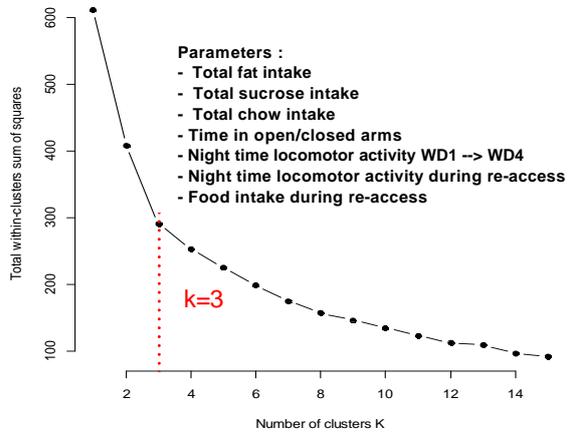
La lésion de la voie RMTg-LH n'affecte pas non plus la consommation de gras pendant le réaccès après 1h (**Fig. 36A**, RMTg-LH contrôle vs. lésion Student T-test, $t(10)=1.873$, $p=0.0905$), 4h (RMTg-LH contrôle vs. lésion Student T-test, $t(10)=1.129$, $p=0.2852$) ou 24h (RMTg-LH contrôle vs. lésion Student T-test, $t(10)=1.129$, $p=0.2852$). Elle n'a également pas d'effet sur la consommation de saccharose (**Fig. 36B**, RMTg-LH contrôle vs lésion 1h : Student T-test, $t(10)=0.2882$, $p=0.7791$, 4h : Student T-test, $t(10)=0.5748$, $p=0.5781$, 24h : Student T-test, $t(10)=0.9910$, $p=0.3451$). Cependant, la lésion de la voie RMTg-LH affecte la consommation totale de nourriture standard après les 24h de réaccès (**Fig. 36C**, RMTg-LH contrôle vs lésion, 1h : Student T-test, $t(10)=1.000$, $p=0.3409$; 4h : Student T-test, $t(10)=1.464$, $p=0.1739$, 24h : Student T-test, $t(10)=4.308$, $p=0.000329$). Ainsi, le phénotype de la lésion RMTg-LH sur la prise alimentaire est assez subtil, cette voie semble principalement impliquée dans la régulation de la prise calorique totale et la consommation de nourriture standard après une longue période de sevrage.

II-C-3 : Résultats d'une analyse de clusters non supervisée basée sur les données comportementales des sujets du groupe RMTg-LH lésion et contrôle

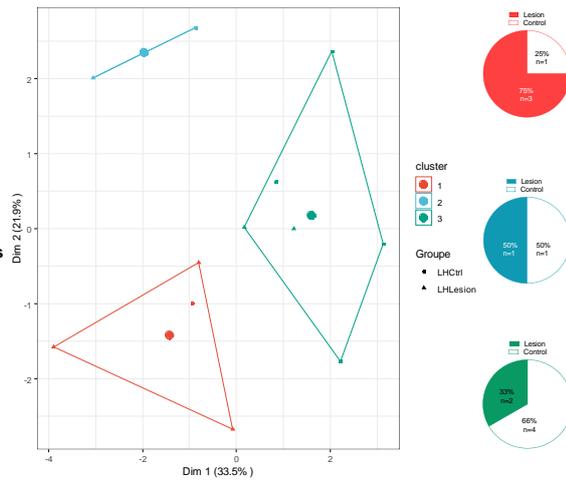
Comme pour la voie RMTg-VTA, une analyse en clusters, est réalisée sur les données des rats du groupe RMTg-LH contrôle et lésion. Ce set de données peut être séparé en $K=3$ clusters (**Fig. 38A**), le cluster 1 (**Fig. 38B**) est composé à 75% de rats issu du groupe RMTg-LH lésion ($n=3$) et 25% de rat RMTg-LH contrôle ($n=1$). Le cluster 2 est composé d'un rat du groupe RMTg-LH contrôle et lésion et le cluster 3 est composé à 66% de rats du groupe RMTg-LH contrôle ($n=4$) et 33% de rats du groupe RMTg-LH lésion ($n=2$). Une analyse en composantes principales (**Fig. 38C**) identifie 5 paramètres comme responsables de la séparation en clusters. Ces paramètres sont le temps passé dans les branches ouvertes et fermées du labyrinthe en croix surélevé (Open, Closed), la consommation de saccharose et de gras pendant la phase de réaccès (SucroseRe, FatRe) et l'actographie nocturne pendant les semaines 2-4 de sevrage (WD2,WD3,WD4). L'analyse du temps passé dans les branches ouvertes ou fermées du labyrinthe après la séparation en cluster (**Fig. 38D**) montre que les rats du cluster 1 et 2 passent plus de temps dans les branches fermées que ceux du cluster 3 (One-WAY ANOVA, $F(2,9)=13.44$, $p=0.0020$, Fisher LSD Post-

Hoc Cluster 1 vs Cluster 3 : $t(9)=4.072$, $p=0.0084$; Fisher LSD Post-Hoc Cluster 2 vs Cluster 3 : $t(9)=4.333$, $p=0.0057$) ainsi que moins de temps dans les branches ouvertes (One-WAY ANOVA, $F(2,9)=11.01$, $p=0.0038$, Fisher LSD Post-Hoc Cluster 1 vs Cluster 3 : $t(9)=2.952$, $p=0.0162$; Cluster 2 vs Cluster 3 : $t(9)=4.394$, $p=0.0017$). Cependant, aucune différence entre les 3 clusters n'est observée pour la consommation de nourriture standard et de gras pendant la période de ré-accès (**Fig. 38E**), Nourriture standard : One-WAY ANOVA, $F(2,9)=3.404$, $p=0.0793$; Gras : One-WAY ANOVA, $F(2,9)=1.459$, $p=0.2825$). Néanmoins, l'activité locomotrice nocturne pendant la 2eme et 3eme semaine de sevrage est plus importante chez le cluster 1 (**Fig. 38F**, WD2 : One-WAY ANOVA, $F(2,8)=5.133$, $p=0.0368$; Fisher LSD Post Hoc Cluster 1 vs Cluster 3, $t(8)=4.144$, $p=0.0449$; WD3 : One-WAY ANOVA, $F(2,8)=5.912$, $p=0.0265$; Fisher LSD Post Hoc Cluster 1 vs Cluster 3, $t(8)=0.0215$; WD4 : One-WAY ANOVA, $F(2,9)=1.398$, $p=0.2960$) l'activité locomotrice n'est pas différente entre groupes pour la 4eme semaine de manque. Cette analyse en clusters ne permet pas de retrouver une séparation claire des groupes RMTg-LH contrôle et lésion et indique ainsi que la lésion de cette voie ne conduit pas à un phénotype comportemental spécifique.

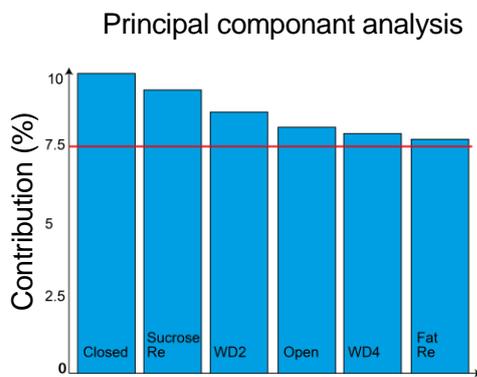
A



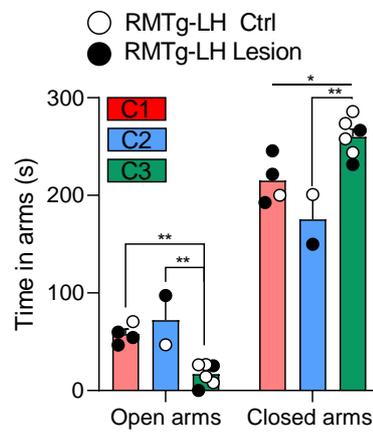
B



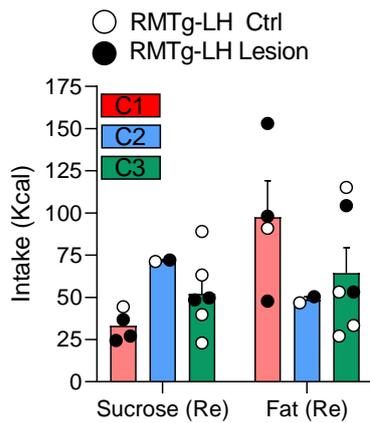
C



D



E



F

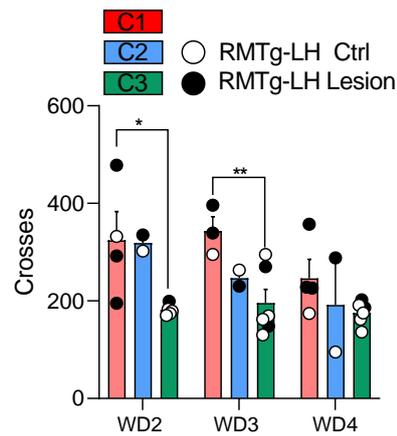


Figure 38: Une analyse des K-moyens ne permet pas de séparer les RMTg-LH du groupe lésion de ceux du groupe contrôle. (A) La méthode des coudes permet de décomposer les données de l'ensemble des rats lésés ou contrôles pour la voie RMTg-LH en K=3 clusters. (B) Le cluster 1 est composé à 75% (n=3) de rats du groupe lésion et 25% (n=1) de rat du groupe contrôle. Le cluster 2 est composé à 50% (n=1) de rats du groupe lésion et 50% (n=1) de rats du groupe contrôle. Le cluster 3 est composé à 33% (n=2) de rats contrôle et 66% (n=4) de rats du groupe lésion. (C) Les paramètres ayant la plus grande contribution à la séparation en clusters sont le temps passé dans les bras fermés et ouverts dans le labyrinthe en croix surélevé (Open, Closed), la consommation de saccharose et de gras pendant les 24h de ré-accès (SucroseRe, FatRe) et les actographies nocturnes pendant la 2eme, 3eme et 4eme semaine de sevrage (WD2, WD3, WD4). (D) Les rats des clusters 1 et 2 passent plus de temps dans les branches ouvertes tandis que les rats du cluster 1 et 3 passent plus de temps dans les branches fermées. (E) La consommation de saccharose et de gras pendant le ré-accès ne diffère pas entre les trois clusters. (F) Les rats du cluster 1 ont une activité locomotrice plus importante que le cluster 3 pendant la 2eme et 3eme semaine de sevrage.

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ Fisher LSD-Post Hoc après One-WAY-ANOVA significative ($p < 0.05$).

Partie 2 : Conséquences de l'obésité et de l'hyperphagie boulimique sur l'expression du système endocannabinoïde

Cette prochaine partie concerne l'étude de l'expression de l'ECS dans le RMTg et les structures du circuit de la récompense dans un modèle d'obésité et d'HB. En effet, ce système biomoléculaire est fortement exprimé dans le circuit de la récompense, à un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire et son expression est affectée dans des pathologies comme l'obésité et l'HB. Dans cette étude, nous avons voulu déterminer si les adaptations de l'ECS étaient différentes ou semblables entre ces deux pathologies. Puisque le RMTg a un rôle inhibiteur sur le circuit de la récompense, il est possible que cette structure présente des adaptations de l'ECS liées à l'obésité et l'HB. Nous sommes par ailleurs les premiers à étudier l'expression de l'ECS dans cette structure. Dans cette étude, nous avons développé un modèle d'HB avec un accès intermittent 3 jours par semaine pendant 2h au régime fCHFHS. Au terme des six semaines de protocole, nous avons analysé l'expression de l'ECS dans différentes structures du circuit de la récompense ainsi que le RMTg. Les résultats de cette étude constituent une deuxième publication en cours de préparation.

I : Manuscrit article: Binge-eating and obesity induce distinct endocannabinoid system transcriptional regulations in reward-related brain regions

Cannabis & Cannabinoid Research

Florian SCHOUKROUN, Romain BOURDY*, Katia BEFORT*

ABSTRACT

Binge eating disorder (BED) is characterized by the overconsumption of highly palatable food in a short amount of time. BED patients do not display compensatory behaviors such as purging, that could lead to obesity. The endocannabinoid system (ECS) is a biomolecular system involved in palatable food intake and is highly expressed in reward-related brain regions. Recent body of work has shown that ECS is affected in both obesity and BED. However, some discrepancies are reported regarding central dysregulations in these two diseases. Our study aimed to explore potential differences in ECS gene expression between obesity and BED.. For this study, male adult Wistar rats were divided into 3 groups : A non-access group (NA) with access only to normal diet, A continuous access group (CA) exposed continuously to a “free choice high fat high sugar” (fCHFHS) diet and modeling obesity, and an intermittent access group with an intermittent access (IA) to the fCHFHS diet, modeling BED. Food intake was measured daily for six weeks and tissue samples of the nucleus accumbens (NAc), dorsal striatum (DS), ventral tegmental area (VTA) and rostromedial tegmental nucleus (RMTg) were collected to measure mRNA levels of ECS-related genes using qPCR. Continuous and intermittent access to the fCHFHS diet successfully modeled the pattern of eating observed in obesity and BED. Transcriptional analysis show a reduction of ECS expression in the NAc and RMTg in the CA group while in the IA group, ECS expression was reduced in the dorsal striatum but increased in the RMTg. Furthermore, correlation analysis showed that ECS-related gene expression is differently affected depending on the amount of sucrose or fat consumed. Our findings support the hypothesis that the ECS is differently affected in

BED and obesity and indicate that the RMTg could be a region of interest in future studies of these conditions. Furthermore, dysregulation of the ECS seems closely linked with the amount and type of palatable food ingested, supporting the need for additional studies on the differential effects of fat and sugar consumption on the ECS in the reward pathway.

Introduction

Binge-Eating Disorder (BED) is the most common eating disorder characterized by uncontrolled episodes of excessive food consumption without compensatory behaviors like purging or exercising. This pathology has a prevalence of 1.9% and 1.6% in France (Guerdijkova, 2019, Kessler *et al.*, 2013). This pathology often co-occurs with obesity. Indeed, 30-46% of obese patients meet the criteria for BED (Spitzer *et al.*, 1993, Marcus *et al.*, 1985). The most commonly consumed foods during binge episodes are high-fat and high-sugar items, which greatly contribute to the obesity epidemic (Hildebrandt *et al.*, 2021 ; American Psychiatric Association, 2013). Treatment options for BED are currently limited, with only one FDA-approved molecule available in the United States: Lisdexamphetamine dimesylate, an amphetamine compound that significantly reduces bingeing episodes in patients (Citrome, 2015). However, this molecule is not available in France due to its potential for substance use disorder (Carlton *et al.*, 2023). One of the systems of interest in this condition is the endocannabinoid system (ECS), an endogenous system composed of two receptors, Cannabinoid receptor 1 (CB1) and cannabinoid receptor 2 (CB2), and their ligands, 2-arachydonoyglycerol (2-AG) and anandamide (AEA). The ECS is highly expressed in the brain reward system which includes regions such as the Nucleus Accumbens (NAc), dorsal striatum (DS) and ventral tegmental area (VTA), brain regions that have been previously demonstrated to regulate palatable food consumption (Ferrario *et al.*, 2016 ; Macedo *et al.*, 2016 ; Quansah Amissah *et al.*, 2021 ; Corwin *et al.*, 2016). More recently, changes of the ECS tone has been linked to obesity and BED (Lau *et al.*, 2017 ; Bourdy & Befort, 2023, Engeli *et al.*, 2005). Another region expressing the ECS is the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a relatively unexplored area that has previously been studied for its potential to act as a regulatory brake on the reward pathway by inhibiting dopaminergic neurons in the VTA (Lecca *et al.*, 2011 & 2012 ; Kauffling *et al.*, 2010 ; Jhou *et al.*, 2009 ; Jalabert *et al.*,

2011 ; Kaufling & Aston-Jones, 2015 ; Smith *et al.*, 2019 ; Taylor *et al.*, 2019). Therefore, there is a strong possibility that the RMTg ECS is dysregulated in obesity and BED, and these possible dysregulation could participate in the dysfunction of the reward system observed in both pathologies. Furthermore, preclinical studies report inconsistent results relative to the modulation of the ECS in various BED paradigms. Indeed, studies on fat bingeing report a decrease of the ECS tone (Blanco-Gandia *et al.*, 2017 ; Satta *et al.*, 2018, Bello *et al.*, 2012) whereas sucrose-bingeing produces an opposite effect (Soto *et al.*, 2014 ; De Sa Nogueira *et al.*, 2021, Pucci *et al.*, 2019 & 2022). Therefore, the nature of palatable food consumed appears to be a critical factor in BED (Espitia-Bautista *et al.*, 2021 ; Soto *et al.*, 2014 ; Rospond *et al.*, 2014) and obesity (Bourdy *et al.*, 2021 ; Rospond *et al.*, 2019) paradigms. Indeed, previous studies usually focus on the consumption of one macronutrients such as fat (Satta *et al.*, 2018 ; Anastasio *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2017 ; Corwin *et al.*, 1998 ; Wojnicki *et al.*, 2008; Corwin & Buda Levin, 2004 ; Price *et al.*, 2019, Blanco-Gandia *et al.*, 2017 ; Satta *et al.*, 2018) or sucrose (Soto *et al.*, 2014 ; De Sa Nogueira *et al.*, 2021 ; Quansah Amissah *et al.*, 2021 ; Avena *et al.*, 2008) but few BED studies use a combination of both (Berner *et al.*, 2008 : Bello *et al.*, 2012 ; Parylak *et al.*, 2012 ; Corwin & Wojnicki *et al.*, 2009). These models, incorporating a combination of fat mixed with powdered sugar, closely mimic the type of foods that BED patients tend to indulge in (Kales *et al.*, 1990). Few used a combination of liquid sucrose and solid fat (Wojnicki *et al.*, 2010, Corwin & Wojnicki, 2009), making it a more suitable model for human food intake, as 10% of daily calories in humans come from liquid palatable solutions like sodas, which can promote weight gain (Rosinger *et al.*, 2017 ; Nguyen *et al.*, 2022). In a previous study, we used an obesogenic rat model (fCHFS) to explore its impact on the ECS (Bourdy *et al.*, 2021). We showed that a continuous access to this diet led to a global decrease of the transcriptional level of ECS elements in the NAc and VTA. In the current study, we adapted this model to an intermittent access of 2 hours, three days a week to the fCHFS diet in addition to their normal food, in order to compare the modulation of the ECS expression in reward-related brain region including the RMTg in both continuous and intermittent access paradigms.

Material & Methods

Subjects

A total of 64 male Wistar Rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint Isle, France) weighting 250 ± 20 g at arrival were individually housed in standard cages in a temperature and humidity-controlled environment in light-controlled room (lights on 07:00–19:00). Rats were habituated for two weeks to housing conditions with *ad libitum* access to standard chow (SAFE A03, 3.339 Kcal/g) and water. All procedures involving animal care were conducted in compliance with current laws and policies validated by the CREMEAS (Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale de Strasbourg) and approved by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (APAFIS #2019070816359145 v2). All efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Free-choice high fat high sucrose diet (HFHS)

Following a habituation period to the animal facility, rats were divided into three groups. A control group (NA) was exposed to a standard chow diet (SAFE A03, 3.339 kcal/g, 3.16.1% of proteins, 3.1% of lipids, 3.9% of fibers, 4.6% of inorganic matter and 60.4% nitrogen-free extract, Rosenberg, Germany). A continuous free-choice high fat high-sugar group (fcHFHS) (CA) was exposed to standard chow and water, combined with saturated fat (« blanc de bœuf » Paturage des Flandres, France, 9Kcal/g) and sucrose (10% dissolved in water, Powder Sugar, Erstein, 4kcal/g), as previously described (Bourdy *et al.*, 2021). An intermittent-access group (IA) had access to the same palatable food 2h/d, three times a week (3 pm to 5 pm, MWF : Monday, Wednesday, Friday). This type of exposure has previously been described to induce a bingeing behavior (Corwin *et al.*, 1998 ; Satta *et al.*, 2018). This regimen lasted for five to six weeks and food and liquid intake were measured every day twice a day for each group at 3 and 5 p.m. Rats were weighted weekly, and total food intake was expressed in kilocalories per 100 g of body weight. Two separate cohorts of rats were used for this experiment. The first cohort (NA=10 ; CA = 10 ; IA = 10) was used to check for BED phenotype in our protocol and the second cohort (NA=14 ; CA= 10 ; IA = 10) was used for molecular analysis of the ECs.

BED phenotype validation

Since BED is characterized by a high consumption of palatable food during a short amount of time, we validated the effectiveness of our BED protocol in our first

cohort by measuring palatable food consumption during the 1st and 2nd hour of access for both the CA and IA groups. Measures were taken on Monday during the 5th week of the protocol and we calculated the percentage of fat and sucrose intake during the 1st and 2nd hour of access. BED was validated if the proportion of sugar and fat consumed during the 1st hour was superior the consumption during the 2nd hour.

Sample collection and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Animals of the second cohort were given an overdose of pentobarbitone (182 mg/rat, IP). Weight was measured, and individual epididymal white adipose tissue was dissected. Liver was also dissected and weighted. One sample was flash-frozen in -55°C Isopentan for histological analysis and another was preserved at -80°C for molecular analysis, dissection of brain structures (PFC, DS, NAc, and VTA) was done as previously described (fBourdy *et al.*, 2021). The RMTg was also collected bilaterally (1 mm punch, -7.00 to -6.00 mm from bregma, 1 slice). Total RNA was extracted by homogenization of the tissue sample in 0.8 mL of UpTizol RNA Extraction Reagent (Interchim©). RNA quality and quantity were measured with a NanoVue™ (GE healthcare) spectrophotometer (GE healthcare). Reverse transcription was performed with iScript (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Biorad, France) on 750 ng of total RNA for the DS and NAc and 80 ng for the VTA and 100 ng for the RMTg due to the low RNA yield after extracting those structures. Real-time PCR was performed in triplicate using a CFX96 Touch™ apparatus (Biorad, France) and Sso Advanced™ Universal SYBR Green supermix (Biorad, France). Thermal cycling parameters were 30 s at 95 °C followed by 40 amplification cycles of 5 s at 95 °C and 45 s at 60 °C. Primer sequences for all tested genes are provided in Table 1. Expression levels were normalized to Rplp0 housekeeping gene levels, classically used for brain or food-related studies (Li *et al.*, 2014; Silberberg, Baruch, & Navon, 2009) and compared between controls and treated samples using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method (Livak & Schmittgen, 2001).

Table 1 : List of Primers Used in this Study, related to the experimental procedures

Gene	Forward	Reverse	Reference
Rplp0 (NM_022402)	CTGCCCGAGCCGGTGCCATC	TTCAATGGTACCTCTGGAG	(De Sa Nogueira <i>et al.</i> , 2021 ; Bourdy <i>et al.</i> , 2021)
Cnr1 (NM_012784)	TCTGCTTGCGATCATCATGGTG T	AGATGATGGGGTTCACGGTC	
Cnr2 (NM_001164143)	AATGGCGGCTTGGATTCAA	TAGAGCACAGCCACGTTCTC	
Nape-Pld (NM_199381)	AGAGATCCGTGGCGATTAC	ATCGTGACTCTCCGTGCTTC	
Mgll (NM_138502)	GTTGAAGAGGCTGGACATGC	TCACGTGCTGCAACAAATCT	
FAAH (NM_001369126)	CCCCAGAGGCTGTGTTCTTT	GTCAGATAGGAGGTCACGCA	
DAGL α -a (XM_039079785.1)	AGTGATCTGACCATCGCCCTTT CA	ACTGTTTCAGCAGGGTGGTTATGGA	(MacDowell <i>et al.</i> , 2016)
GPR55 (XM_006245493.4)	GTCGTCTTCGTGGTCTCCTT	GATGTTAGAGAAACACAGAGACAA CTG	(Hurst <i>et al.</i> , 2017)

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using R-studio 4.0.2 and GraphPad Prism 9.1 (GraphPad Software, La Jolla California USA). All data sets were tested for normality and homoscedasticity before applying parametric statistical tests. Total food intake was analyzed with One-Way-ANOVA. Final body weight and weekly food consumption were analyzed with repeated measure Two-Way ANOVA, and Bonferroni multiple comparisons were performed to assess differences between groups over time. Gene expression analyses were performed with One-Way ANOVA followed by Fisher LSD multiple comparisons. Outliers for qPCR analysis were identified when Δ Cq and relative-gene expression values were outside the [Q1 -1.5IQR ; Q3 +1.5 IQR] range. Correlation and linear regression analysis were performed either to compare sucrose/fat intake over time to gene expression or in between genes relative expression. Comparison of sucrose or fat intake during the 1st vs. 2nd hour was analyzed with a paired Student T-test.

Results

Intermittent access to a fCHFHS diet induces binge-eating like phenotype

In our protocol, rats were exposed either to a continuous (CA) or intermittent (IA) fCHFHS diet for five-six weeks (Fig. 1A). The average weekly consumption during the 2h access period showed that rats in the IA group consumed more sucrose (Fig. 1B, $p < 0.0001$) and more fat (Fig. 1C, $p < 0.0001$) than the CA group suggesting a binge eating phenotype in the IA group. Contrary to the CA group, whose consumption of fat and sucrose isn't higher during the 1st hour (Fig. 1D, Fat : $p = 0.4873$; Sucrose : $p = 0.8532$), the IA group displayed a higher consumption of both fat (Fig. 1E, $p < 0.05$) and sucrose (Fig. 1E, $p < 0.01$) during the 1st hour of access, illustrating the BED-like phenotype. Compared to NA, total caloric consumption was higher in the CA (Fig. 2A, NA vs. CA, $p < 0.001$) and IA groups (Fig. 2A, NA vs. IA, $p < 0.01$) and the CA group had a higher caloric intake than the IA group (Fig. 2A, CA vs. IA, $p < 0.01$). Interestingly, rats in the IA group consumed a similar amount of fat than rats in the CA group (Fig. 2B CA vs. IA, $p = 0.4956$), whereas rats from the CA group consumed more sucrose than the IA group (Fig. 2B, CA vs. IA, $p < 0.001$). Intra-group comparison showed that CA rats consumed a similar number of calories from fat and sucrose (Fig. 2B, CA, Sucrose vs. Fat, $p = 0.3053$), whereas rats in the IA group consumed more calories from fat than sucrose (Fig. 2B, IA, Sucrose vs. Fat, $p < 0.01$). No differences could be observed between groups concerning the final weight (Fig. 1F, $p = 0.591$), but both CA and IA groups showed a higher amount of visceral white adipose tissue (Fig. 1G, NA vs. IA $p < 0.05$; NA vs. CA $p < 0.001$).

Consequences of intermittent and continuous access to a fCHFHS diet on the endocannabinoid system expression in reward-related brain regions

Gene expression analysis of the endocannabinoid system was investigated in brain reward-related structures (DS, NAc, VTA) including the RMTg. Regarding to ECS receptors, a reduced CB1 expression was observed in the DS and NAc from in the IA group (Fig. 3A, 3B, NA vs. IA, $p < 0.05$). A similar effect was observed in the RMTg in the CA group (Fig. 3D, NA vs. CA , $p < 0.05$). In the IA group, CB2 expression was reduced in the NAc (Fig. 3B, NA vs IA, $p < 0.05$) and increased in the RMTg (Fig. 3D, NA vs IA, $p < 0.05$). Regarding synthesis or degradation enzymes,

only DAGL α expression was significantly modified. Indeed, a reduction of DAGL α transcripts was observed in the NAc of both CA (Fig. 3B, NA vs. CA, $p < 0.05$) and IA (Fig. 3B, NA vs. IA, $p < 0.001$) groups, whereas an increase of the enzyme was detected in the RMTg of the IA group (Fig. 3D, NA vs. IA, $p < 0.05$). Complementary analysis that didn't reveal statistically significant results are reported in the Figure 4.

Correlation analysis shows a different impact of fat and sugar overconsumption on ECS-related gene expression in the reward system

In the IA group, a negative correlation could be observed between NAPE expression and the total amount of fat consumed in the IA group (Fig. 5A, $R^2 = 0.5114$, $p < 0.05$) whereas a positive correlation could be seen between MGL expression and total sucrose intake (Fig. 5A, $R^2 = 0.5137$, $p < 0.05$) for the CA group. Interestingly, MGL expression was negatively correlated with total sucrose intake (Fig. 5A, $R^2 = 0.6191$, $p < 0.05$). In the NAc, a positive correlation was observed between CB1 expression and total sucrose intake (Fig. 5B, $R^2 = 0.7364$, $p < 0.05$), whereas in the CA group, CB2 and GPR55 expressions were positively correlated between each other (Fig. 5B, $R^2 = 0.6925$, $p < 0.05$). In addition, DAGL α expression was positively correlated with total fat intake (Fig. 5B, $R^2 = 0.9398$, $p < 0.01$). In the RMTg, a similar correlation between CB2 and GPR55 was observed for the IA group (Fig. 5C, $R^2 = 0.8560$, $p < 0.01$), and NAPE and FAAH expression were respectively correlated with total sucrose (Fig. 5C, $R^2 = 0.7174$, $p < 0.01$) and fat (Fig. 5C, $R^2 = 0.6103$, $p = 0.0381$) intake.

Discussion

In the present study, we successfully modeled eating patterns observed in obesity and BED in rats. Indeed, animals from the CA group presented an overall higher caloric intake compared to NA and IA groups and a higher mass of white adipose tissue. Meanwhile, rats from the IA group displayed a higher amount of palatable fat and sucrose intake in the 2-hour access period compared to the CA group and this consumption mostly occurred during the 1st hour of access. This mimics one symptom of BED: the consumption of a high amount of food in a discrete amount of time. Surprisingly, rats in the IA and CA groups consumed a similar total amount of calories from fat at the end of the diet, showing a higher propensity for bingeing of fat

compared to sucrose in the IA group. We were the first group to investigate ECS-related gene expression in the RMTg in BED and obesity models. Rats from the IA group shown increased CB2 and DAGL α transcript levels in this structure while CB1 receptor transcript level was reduced in the striatum. Meanwhile, rats in the CA group show, a decrease in DAGL α mRNA in the NAc and CB1 mRNA in the RMTg.

We used a BED model with two palatable items in different forms (liquid sucrose, solid fat) by adapting the classical fCHFHS model (La Fleur *et al.*, 2011 ; Bourdy *et al.*, 2021), changing the continuous access to an intermittent “MWF” access (Corwin *et al.*, 1998, 2016 ; Wojnicki *et al.*, 2005 ; Satta *et al.*, 2018 ; Quansah Amissah *et al.*, 2021). Contrary to our previous study (Bourdy *et al.*, 2021) we did not observe a reduction of FAAH or MGL transcripts nor an increase of NAPE mRNAs. Furthermore, we didn't see a reduction of CB1 transcripts nor of synthesis or degradation enzymes in the VTA. The contrasting findings in the NAc and VTA may be attributed to a more pronounced obesity-like phenotype observed in our prior study. In that study, rats with continuous access to the fCHFHS diet exhibited greater weight gain compared to the control group. This implies that ECS disruption may be intricately associated with weight gain, close to the negative correlation observed between D2 receptor availability and BMI values in obese patients (Wang *et al.*, 2001). However, we did observe a decrease in DAGL α transcripts in the NAc, which could potentially reflect a decrease in 2-AG levels in this structure. Additionally, we observed a positive correlation between CB2 and GPR55 expression in the NAc of the CA group. The role GPR55 remains unclear but has been shown to heterodimerize with CB2 (Balenga *et al.*, 2014). Our results suggest that CB2 and GPR55 receptors could heterodimerize in reward-related brain region following excessive palatable food consumption. However the effect of this possible heterodimerization, and more generally the role of GPR55 in food intake needs further investigation. We partially replicated our previous findings with the continuous access group and we confirmed, to a certain extent, our previous findings indicating that obesity leads to a reduction in ECS expression within the reward pathway, and a potential heteroimerization of CB2 and GPR55 receptors in the NAc. Moreover, we found a reduction of CB1 expression in the RMTg in the CA group. Lecca *et al.* (Lecca *et al.*, 2011 ; 2012) have demonstrated that CB1R is expressed in the RMTg and that CB1 agonists could disinhibit VTA dopaminergic neurons through by inhibiting the RMTg. It has been shown that an increased endocannabinoid signaling in the RMTg, notably through CB1 receptors, was involved

in innate alcohol preference in a specific strain of rats (Melis *et al.*, 2014). It is plausible that the ECS in the RMTg plays a broader role in regulating the reward pathway, influencing the inclination to engage in rewarding behaviors, such as consuming palatable food. Hence, a decrease in CB1 receptor expression in the RMTg could be an adaptive mechanism aimed at attenuating the activity of the reward pathway as a means to mitigate the consumption of palatable food. In the IA group, the decrease in CB1 expression observed in the striatum aligns with previous research that has shown similar results in fat bingeing (Satta *et al.*, 2018; Bello *et al.*, 2012; Blanco-Gandia *et al.*, 2017). We also found a reduction of DAGL α expression in this structure, suggesting a strong reduction of the endocannabinoid tone, with a possible reduction of 2-AG levels. In the NAc, previous works have demonstrated that 2-AG, through retrograde signaling, can suppress excitatory inputs (Robbe *et al.*, 2001 ; Bilbao *et al.*, 2020). Moreover, PFC neurons projecting to the NAc decrease palatable food intake in a binge eating protocol (Anastasio *et al.*, 2019). Therefore, the decrease in CB1 receptors expression could be located within pre-synaptic glutamatergic terminals from PFC neurons and could be set in place to increase PFC-NAc excitatory inputs in order to limit palatable food intake. Interestingly, a previous study we conducted on ECS expression following sucrose bingeing yielded contrasting results, demonstrating a notable increase in CB1 expression in the NAc (De sa Nogueira *et al.*, 2021). Another study, using an intermittent access to sucrose 2h/day, 5 days a week has also noted an increased CB1 expression in the NAc (Soto *et al.*, 2014). Moreover, a continuous access to sucrose or fructose similarly leads to an increase in CB1 expression in the hippocampus (Lindqvist *et al.*, 2008). Hence, it appears that the type of food consumed triggers distinct forms of neuroadaptation in the ECS, with sucrose and fat respectively increasing and decreasing CB1 expression. Moreover, the total sucrose intake showed a positive correlation with CB1 expression in the NAc within the IA group, providing further evidence that sucrose is the primary macronutrient contributing to CB1 overexpression.

Remarkably, CB2 receptor expression in the NAc was also decreased in the IA group. Previous studies have demonstrated a generally contrasting regulation between CB1R and CB2R expression in the substantia nigra, PFC, and NAc (Garcia-Cabrerizo & Fuster, 2016; Navarette *et al.*, 2018; Garcia-Blanco, 2023). CB2R being highly expressed in activated microglia (Cabral & Marciano-Cabral, 2008) and CB2-KO mice presenting a higher inflammatory and a leaking blood brain barrier (Amenta *et al.*, 2014

; Engel *et al.*, 2010 ; Komorowska-Müller & Schmöle, 2020), this receptor seems to have a particular role in controlling the inflammatory response. Therefore, it is not far stretched to imagine that the lowered expression of CB2R could reflect an ongoing neuroinflammatory process linked to palatable food bingeing. Furthermore, obese patients suffering from binge-eating display higher levels of C-reactive protein and circulating white blood cells, both of which constitutes inflammation markers (Succuro *et al.*, 2015). Preclinical studies have demonstrated that an intermittent access to a 5% sucrose solution for 12 weeks increases the number of activated microglia in reward-related brain regions such as the PFC (Paktar *et al.*, 2021) while a 12 weeks' exposure to a high-fat high-sucrose diet induces neuroinflammation in the NAc (Decarie-Spain *et al.*, 2018). Another possible explanation could be that the reduction in CB2R, similarly to CB1R, represents a neuroadaptive mechanism designed to mitigate loss of control over food intake. A recent study highlighted the role of CB2R in the development of "food addiction" in mice exposed to an operant protocol where lever press delivers a chocolate-flavored pellet (Garcia-Blanco *et al.*, 2023). In this study CB2 KO mice exhibited a reduced compulsivity described as pursuing the reward despite negative consequences like electric shocks and increased compulsivity in one trait associated with binge-eating as self-reported in binge eaters (Galanti *et al.*, 2007). Consequently, bingeing on palatable food could lead to a decrease of CB2 in order to further blunt palatable food consumption.

The ECS in the RMTg has been investigated on only 3 previous electrophysiological studies (Lecca *et al.*, 2011 & 2012 ; Melis *et al.*, 2014). These studies point to a role of the RMTg's ECS in modulating the activity of VTA dopaminergic neurons. This modulation occurs through CB1 and 2-AG which modulates alcohol preference and consumption. This effect could be extended to natural rewards such as palatable foods. In our experiments, we show an increase in DAGL α and CB2 expression in the RMTg of bingeing rats. This may underlie an elevation of 2-AG signaling, contributing to the disinhibition of VTA dopaminergic neurons. Previous studies have similarly demonstrated that disinhibiting dopaminergic neurons in the VTA by modulating GABAergic inputs from the lateral hypothalamus (LH) results in an increased consumption of palatable foods (Nieh *et al.*, 2015 & 2016, Jennings *et al.*, 2015, Rossi *et al.*, 2019). Therefore, the increased ECS tone in the RMTg could disinhibit dopaminergic neurons in BED and further encourage palatable food consumption. Interpreting the reduction of CB2 expression in the NAc and its

increase in the RMTg remains challenging, especially since the role of CB2 in the RMTg remains to be determined. It is possible that the reduction of CB2 observed in the NAc represents an adaptive mechanism, but these adaptations may not have occurred yet in the RMTg. It could also be a sign of higher microglial recruitment occurring in the RMTg, because of the high amount of palatable food consumed. However, since 2-AG is synthesized in neurons, the increase in DAGL α expression indicates that the modulation of the endocannabinoid system in the RMTg seems more likely to occur in neurons. Interestingly, we also observed the correlation between CB2 and GPR55 expression in the RMTg of bingeing rats, a correlation that was not observed in the CA group. This could suggest that CB2-GPR55 heterodimerization occurs in distinct neuronal brain regions depending on the eating pattern. Taken with the previous results in the CA group, this could indicate that a continuous access to palatable food leads to adaptive mechanism of the ECS in the RMTg, mechanisms that do not occur in BED. The reason for such a difference has yet to be examined but it could be possibly linked with the distinctive eating pattern in both models. Indeed, both CA and IA rats consumed a comparable amount of fat over the six-week protocol. However, in the CA group, this consumption took place gradually throughout all the days of the six weeks, whereas in the IA group, it was concentrated within a discrete period of time, three days a week.. Therefore, it is possible that overconsuming fat within such a short timeframe hinders the adaptive mechanism intended to regulate palatable food intake, potentially leading to further overconsumption.

Interestingly, ECS expression was reduced in the RMTg after an obesity protocol while an increase was observed following a BED protocol. The reason for such differences remains to be explored but since a previous study has demonstrated that a higher ECS tone in the RMTg promotes alcohol consumption (Melis *et al.*, 2014), we can suppose that this effect could occur for other reward-related substances, such as palatable foods. Additional research is required in this study to understand RMTg's involvement in obesity and BED, particularly through the ECS. In our study, we did not measure endocannabinoids levels which is a crucial element .We can imagine that the RMTg could be a target of interest for future pharmacological studies investing how acting locally on the ECS could modulate palatable food intake and bingeing . Similar to our prior study (Bourdy *et al.*, 2021), our findings suggest that ECS dysregulation appears to be closely tied to the specific type of palatable food consumed. This underscores a dissociative impact of fat and sucrose on the brain, potentially explaining the disparities

observed in studies utilizing sucrose (De Sa Nogueira *et al.*, 2021, Soto *et al.*, 2014) and fat (Satta *et al.*, 2018 ; Blanco-Gandia *et al.*, 2017, Bello *et al.*, 2012) bingeing models. This underscores the necessity for future research to differentiate the effects of fat and sucrose on the brain, particularly within the reward system, in order to elucidate their respective roles in the loss of control over food intake observed in obesity and BED.

Figure captions

FIG.1: Intermittent access to fCHFHS induces fat and sucrose bingeing

(A) Timeline of the experimental procedures. (B & C) The intermittent access to sucrose [Two-Way ANOVA, Main group effect, $F(1,18)=126,213$, $p<2e-16$] and fat [Two-Way ANOVA, Main group effect $F(1,18)=134,407$, $p<2e-16$] induces a higher consumption of fat and sucrose during the 2h access during the entire duration of the protocol. (D) The continuous access does not induce a binge-eating like phenotype on fat [Paired T-test, $t(7)=0.7330$, $p=0.4874$] nor sucrose (Paired T-test, $t(9)=0.1903$, $p=0.8532$) (E). The intermittent access group display a binge-eating like phenotype on fat [Paired T-test, $t(9)=2.569$, $p=0.03$] and sucrose [Paired T-test, $t(9)=4.905$, $p=0.0008$]. NA : No-access (n=10-14), CA : Continuous access (n=8-10), IA : Intermittent Access (n=10). Results are presented in mean \pm SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

FIG.2: Intermittent and continuous access to fCHFHS induce caloric overload and adiposity

(A) Rats in the CA or IA groups have an overall higher caloric intake than the NA group. [One-Way ANOVA, Main-Group effect, $F(2,31)=3,33e-05$, Fisher LSD post-hoc NA vs. CA $p<0,0001$; Fisher LSD post-hoc NA vs. IA $p=0,0058$] . (B) Rats in the CA group consumed more sucrose than the rats in the IA group [Aspin-Welch Test, $t(9.0959)=5,8992$, $p=0.0022$] but both the group consumed a similar amount of fat [Student T-test, $t(18)=0.68093$, $p=0.5046$]. Rats in the IA group consumed more fat

than sucrose [*Paired-Student T-Test*, $t(9)=4.045$, $p=0.002907$]. (C) Neither the CA nor IA group present an increased body weight compared to NA [*One-Way- ANOVA, Main-Group effect* $F(2,31)=0,535$, $p=0,591$]. (D) The IA and CA group shows an increased adiposity [*One-Way- ANOVA, Main-Group effect* $F(2,31)=7,997$, $p=0.00158$, *Fisher LSD post-hoc NA vs. CA* $p=0.0005$, *NA vs. IA* $p=0.0221$]

NA : No-access (n=14), CA : Continuous access (n=10), IA : Intermittent Access (n=10). Results are presented in mean \pm SEM. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$

FIG 3: Intermittent and continuous access to fat and sucrose modulate endocannabinoid system expression in the striatum and the RMTg

(A) In the dorsal striatum (DS), CB1 expression is decreased for the IA group [*One-Way ANOVA, Main group effect* $F(2,31)=3.977$, $p=0.029$, *Fisher LSD post-hoc NA vs. IA* $p=0,0156$]. (B) CB1, CB2 and DAGL α expression were significantly decreased in the NAc of rats in the IA group, DAGL α expression was also decreased in the CA group [*CB1; One-Way ANOVA, Main group effect* $F(2,21) = 6.159$, $p=0.00785$, *Fisher LSD post-hoc NA vs. IA* $p=0.0021$; *CB2 One-Way ANOVA, Main group effect* $F(2,23)=6.214$, $p=0.00695$, *Fisher LSD post-hoc* $p=0.0018$; *DAGL α One-Way ANOVA Main group effect* $F(2,21)=11.9$, *Fisher LSD post-hoc NA vs. IA* $p=0.0002$, *NA vs. CA* $p=0.0111$]. (C) Gene expression for the endocannabinoid system in the VTA was unaffected by intermittent or continuous access to palatable food. (D) In the RMTg, the expression of CB1 was reduced for the continuous access group while CB2 and DAGL α expression were increased in the intermittent access group [*CB1 One-Way ANOVA* $F(2,19)=3.651$, $p=0.0455$, *Fisher LSD post-hoc NA vs. CA* $p=0.0142$; *CB2 One-Way.ANOVA* $F(2,21)=4.107$, $p=0.0313$, *Fisher LSD post-hoc NA vs. IA* $p=0.015$; *DAGL α One-Way ANOVA* $F(2,21)=3.772$, $p= 0.0398$, *Fisher LSD post-hoc NA vs. IA* $p=0.0172$] NA : No-access (n=10-14), CA : Continuous access (n=6-10), IA : Intermittent Access (n=4-10). Results are presented in mean \pm SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

FIG. 4: Table of statistical analysis performed for ECS gene expression in the DS, NAc, VTA and RMTg

Analyses were performed using a One-Way ANOVA with Fisher LSD Post-Hoc if the ANOVA was significant. Statistically significant results were presented in bold font.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

FIG. 5 Correlation analysis shows a different impact of fat vs. sugar consumption on the endocannabinoid system

(A) A negative correlation is present between NAPE expression and total fat intake while MGL respectively positively and negatively correlated with total sucrose and total fat intake [*NAPE x Total Fat intake*, Linear regression analysis, $F(1,8) = 8.375$, $p = 0.0201$; *MGL x Total Sucrose Intake* Linear regression analysis, $F(1,7) = 7.395$, $p = 0.0298$; *MGL x Total Fat Intake* Linear regression analysis $F(1,7) = 11.38$, $p = 0.0119$] **(B)** CB1 and CB2 expression was significantly decreased in the NAc of rats in the intermittent access group while DAGL α expression was reduced in both the continuous and intermittent access group [*CB1 x Total Sucrose Intake*, Linear regression analysis, $F(1,5) = 13.97$, $p = 0.0135$; *GPR55 x CB2*, Linear regression analysis, $F(1,5) = 11.26$, $p = 0.0202$; *DAGL α x Total Fat Intake* Linear regression analysis $F(1,3) = 46.85$, $p = 0.0064$] **(C)** A positive correlation between the expression of GPR55 and CB2 is observed in the RMTg of IA groups. In the CA group, NAPE and FAAH expression are respectively positively correlated with total sucrose and total fat intake [*GPR55 x CB2*, Linear regression analysis $F(1,6) = 21.27$, $p = 0.0036$; *NAPE x Total sucrose intake*, Linear regression analysis $F(1,6) = 15.23$, $p = 0.0080$; *FAAH x Total Fat intake* Linear regression analysis $F(1,5) = 7.831$, $p = 0.0381$] NA : No-access (n=10-14), CA : Continuous access (n=6-10), IA : Intermittent Access (n=4-10). Results are presented as individual data points with the best fitted line and the 95% confidence interval bands.

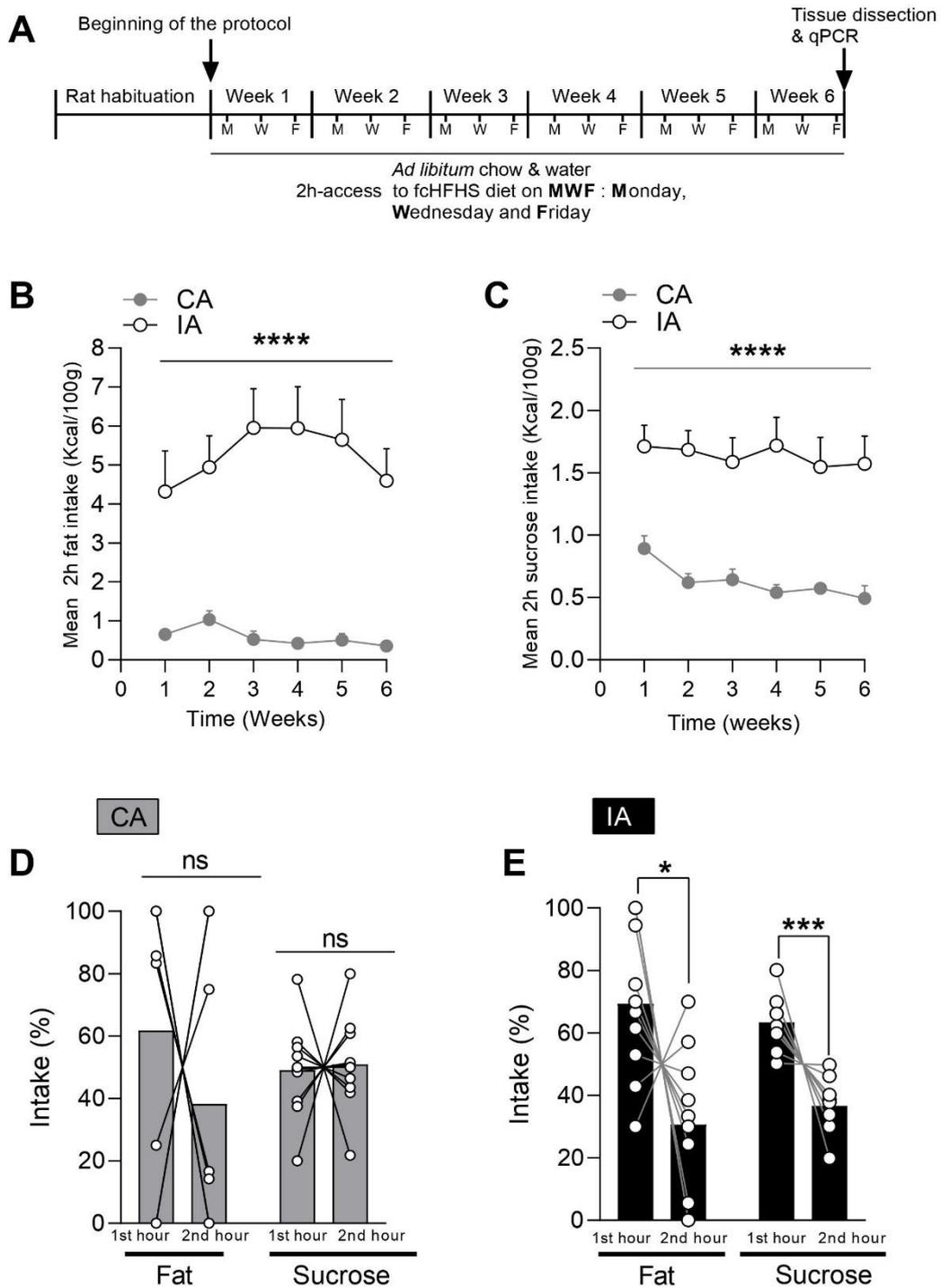


FIG.1

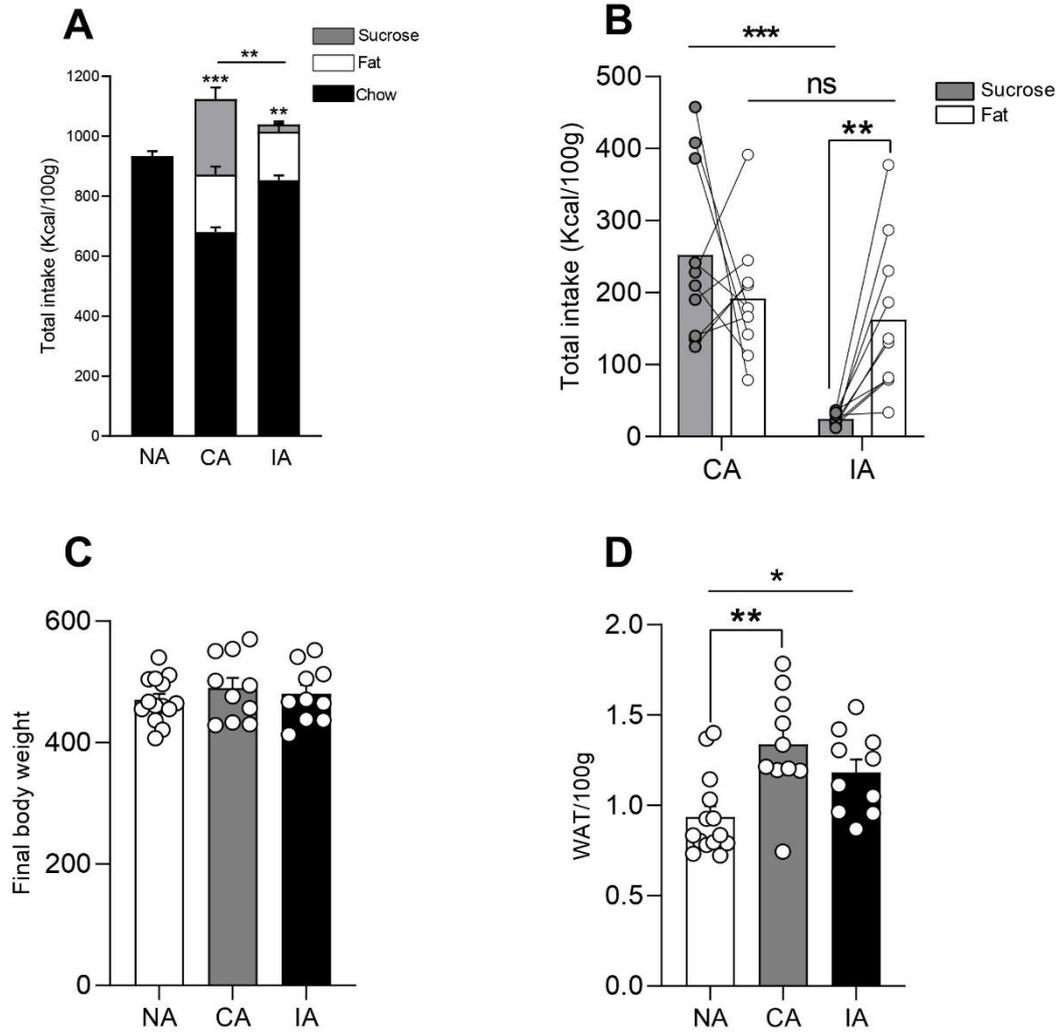


FIG.2

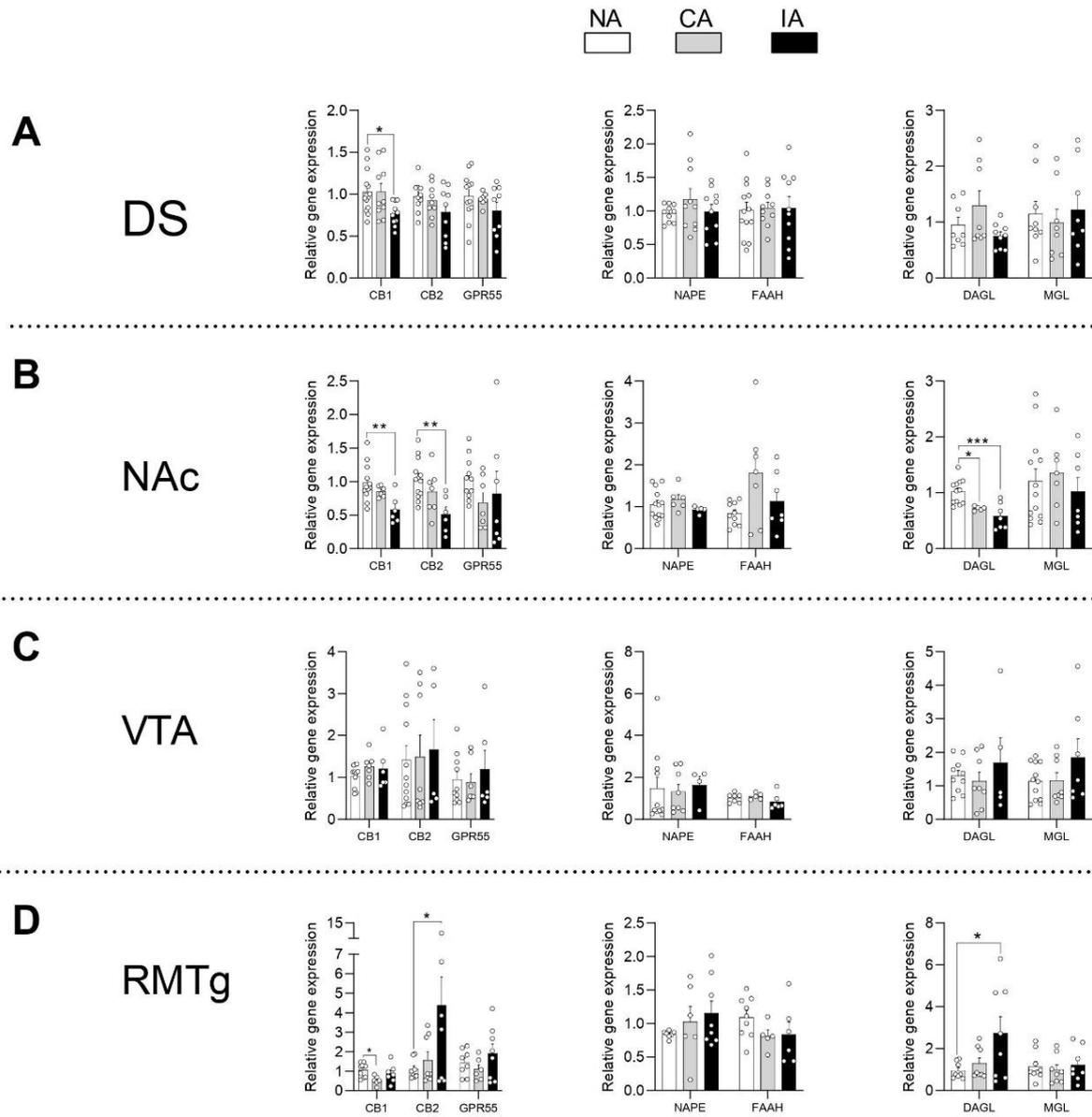


FIG.3

NA vs CA vs IA							
	CB1	CB2	GPR55	NAPE	FAAH	DAGL	MGL
DS	F(2,31)=3.977. p=0.029* NA vs IA. p=0.0156* NA vs CA. p=0.9911	F(2,25)=1.638 p=0.2146	F(2,25)=1.254 p=0.3026	F(2,27)=0.9583 p=0.3962	F(2,30)=0.02126 p=0.9790	F(2,22)=2.631 p=0.0945	F(2,22)=0.2228 p=0.8020
NAC	F(2,21)=6.159. p=0.0079** NA vs IA. p=0.0021** NA vs CA. p=0.2701	F(2,23)=6.214. p=0.0070** NA vs IA. p=0.0018** NA vs CA. p=0.1951	F(2,22)=0.9665 p=0.3960	F(2,21)=0.9059 p=0.4194	F(2,21)=3.159 p=0.0632	F(2,21)=11.39. p=0.0004*** NA vs IA. p=0.0214 NA vs CA. p=0.0003	F(2,24)=0.3743 p=0.6917
VTA	F(2,21)=1.007 p=0.3821	F(2,22)=0.06062 p=0.9413	F(2,20)=0.3115 p=0.7359	F(2,20)=0.07237 p=0.9034	F(2,15)=1.257 p=0.3129	F(2,20)=0.5439 p=0.5888	F(2,24)=1.603 p=0.2221
RMTg	F(2,19)=3.679 p=0.0447* NA vs IA. p=0.3263 NA vs CA p=0.0139*	F(2,21)=4.102 p=0.0313* NA vs IA. p=0.0150* NA vs CA p=0.7069	F(2,19)=1.205 p=0.3215 NA vs IA. p=0.5219 NA vs CA p=0.3556	F(2,18)=0.9662 p=0.3994	F(2,17)=1.584 p=0.2339	F(2,21)=3.770 p=0.0399* NA vs IA. p=0.0172* NA vs CA p=0.6266	F(2,22)=0.2228 p=0.8020

FIG.4

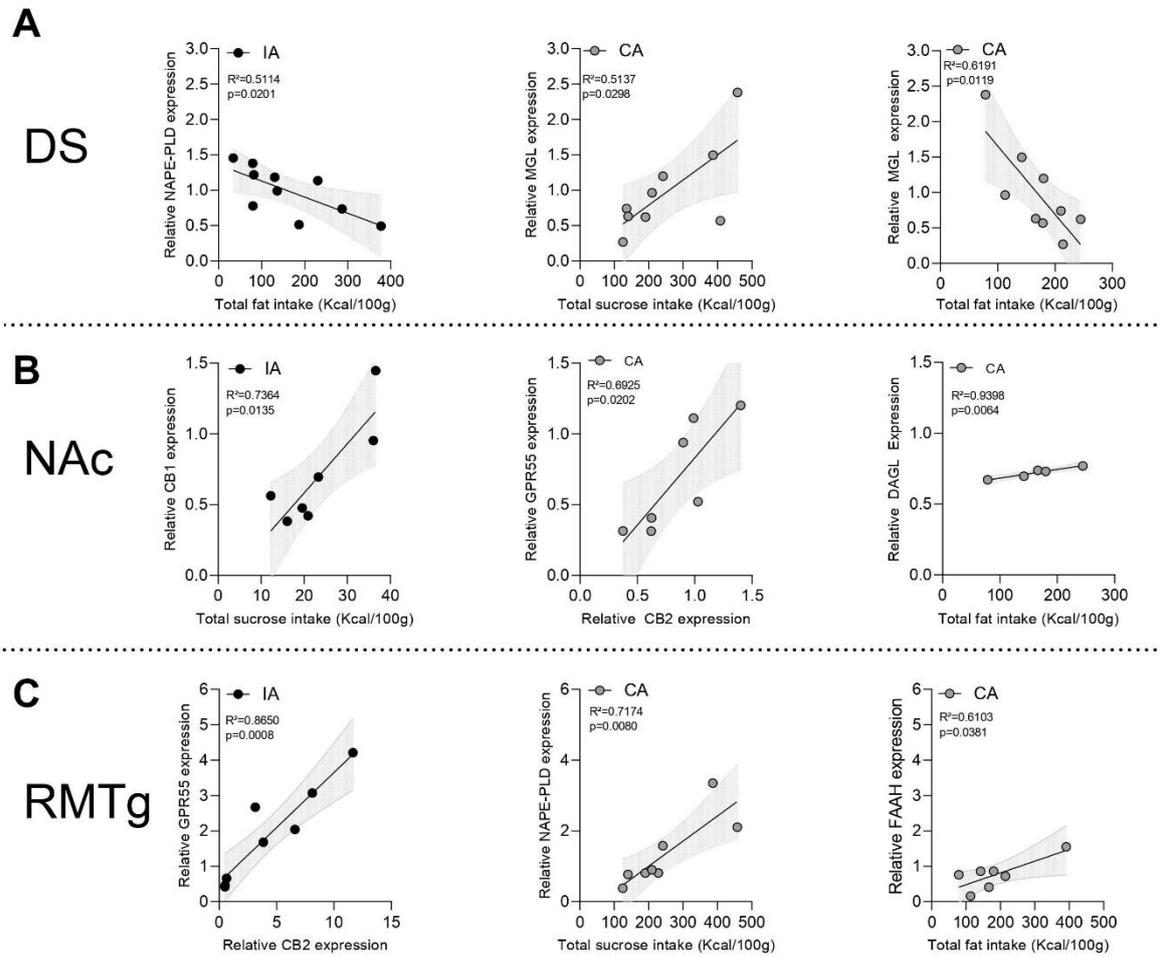


FIG.5

References

1. Anastasio, N. C. *et al.* Convergent neural connectivity in motor impulsivity and high-fat food binge-like eating in male Sprague-Dawley rats. *Neuropsychopharmacol.* **44**, 1752–1761 (2019).
2. Avena, N. M., Bocarsly, M. E., Rada, P., Kim, A. & Hoebel, B. G. After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology & Behavior* **94**, 309–315 (2008).
3. Balenga, N. A. *et al.* Heteromerization of GPR 55 and cannabinoid CB₂ receptors modulates signalling. *British J Pharmacology* **171**, 5387–5406 (2014).
4. Bello, N. T. *et al.* Dietary conditions and highly palatable food access alter rat cannabinoid receptor expression and binding density. (2012).
5. Berner, L. A., Avena, N. M. & Hoebel, B. G. Bingeing, Self-restriction, and Increased Body Weight in Rats With Limited Access to a Sweet-fat Diet. *Obesity* **16**, 1998–2002 (2008).
6. Bilbao, A. *et al.* Endocannabinoid LTD in Accumbal D1 Neurons Mediates Reward-Seeking Behavior. *iScience* **23**, 100951 (2020).
7. Blanco-Gandía, M. C. *et al.* Effects of bingeing on fat during adolescence on the reinforcing effects of cocaine in adult male mice. *Neuropharmacology* **113**, 31–44 (2017).
8. Bourdy, R. & Befort, K. The Role of the Endocannabinoid System in Binge Eating Disorder. *IJMS* **24**, 9574 (2023).
9. Bourdy, R. *et al.* The endocannabinoid system is modulated in reward and homeostatic brain regions following diet-induced obesity in rats: a cluster analysis approach. *Eur J Nutr* **60**, 4621–4633 (2021).
10. Cabral, G. A., Raborn, E. S., Griffin, L., Dennis, J. & Marciano-Cabral, F. CB₂ receptors in the brain: role in central immune function. *British J Pharmacology* **153**, 240–251 (2008).
11. Carton, L. *et al.* What is the potential for abuse of lisdexamfetamine in adults? A preclinical and clinical literature review and expert opinion. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **15**, 921–925 (2022).
12. Cifani, C. & D’Addario, C. Preclinical and Clinical Evidence for a Distinct Regulation of Mu Opioid and Type 1 Cannabinoid Receptor Genes Expression in Obesity. *Frontiers in Genetics* **10**, (2019).
13. Citrome, L. Lisdexamfetamine for binge eating disorder in adults: a systematic review of the efficacy and safety profile for this newly approved indication - what is the number needed to treat, number needed to harm and likelihood to be helped or harmed? *Int J Clin Pract* **69**, 410–421 (2015).
14. Corwin, R. L. & Buda-Levin, A. Behavioral models of binge-type eating. *Physiology & Behavior* **82**, 123–130 (2004).
15. Corwin, R. L. & Wojnicki, F. H. Baclofen, raclopride, and naltrexone differentially affect intake of fat and sucrose under limited access conditions. *Behavioural Pharmacology* **20**, 537–548 (2009).
16. Corwin, R. L. *et al.* Limited Access to a Dietary Fat Option Affects Ingestive Behavior But Not Body Composition in Male Rats. *Physiology & Behavior* **65**, 545–553 (1998).
17. De Macedo, I. C., De Freitas, J. S. & Da Silva Torres, I. L. The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review. *Advances in Pharmacological Sciences* **2016**, 1–7 (2016).

18. De Sa Nogueira, D. *et al.* Binge sucrose-induced neuroadaptations: A focus on the endocannabinoid system. *Appetite* **164**, 105258 (2021).
19. Décarie-Spain, L. Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat.
20. Engel, M. A. *et al.* MICE LACKING CANNABINOID CB1-, CB2-RECEPTORS OR BOTH RECEPTORS SHOW INCREASED SUSCEPTIBILITY TO TRINITROBENZENE SULFONIC ACID (TNBS)-INDUCED COLITIS.
21. Engeli, S. *et al.* Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in Human Obesity. *Diabetes* **54**, 2838–2843 (2005).
22. Espitia-Bautista, E. & Escobar, C. Fat rather than sugar diet leads to binge-type eating, anticipation, effort behavior and activation of the corticolimbic system. *Nutritional Neuroscience* **24**, 508–519 (2021).
23. Ferrario, C. R. *et al.* Homeostasis Meets Motivation in the Battle to Control Food Intake. *J. Neurosci.* **36**, 11469–11481 (2016).
24. Galanti, K., Gluck, M. E. & Geliebter, A. Test meal intake in obese binge eaters in relation to impulsivity and compulsivity. *Int. J. Eat. Disord.* **40**, 727–732 (2007).
25. García-Blanco, A. Role of CB2 cannabinoid receptor in the development of food addiction in male mice. *Neurobiology of Disease* (2023).
26. García-Cabrerizo, R. Opposite regulation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the prefrontal cortex of rats treated with cocaine during adolescence. *Neuroscience Letters* (2016).
27. Guerdjikova, A. I., Mori, N., Casuto, L. S. & McElroy, S. L. Update on Binge Eating Disorder. *Medical Clinics of North America* **103**, 669–680 (2019).
28. Hildebrandt, B. A. & Ahmari, S. E. Breaking It Down: Investigation of Binge Eating Components in Animal Models to Enhance Translation. *Front. Psychiatry* **12**, 728535 (2021).
29. Jalabert, M. *et al.* Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 16446–16450 (2011).
30. Jennings, J. H., Rizzi, G., Stamatakis, A. M., Ung, R. L. & Stuber, G. D. The Inhibitory Circuit Architecture of the Lateral Hypothalamus Orchestrates Feeding. *Science* **341**, 1517–1521 (2013).
31. Jhou, T. C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B. A. & Zahm, D. S. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J of Comparative Neurology* **513**, 566–596 (2009).
32. Kales, E. F. Macronutrient analysis of binge eating in bulimia. *Physiology & Behavior* **48**, 837–840 (1990).
33. Kauffling, J. & Aston-Jones, G. Persistent Adaptations in Afferents to Ventral Tegmental Dopamine Neurons after Opiate Withdrawal. *Journal of Neuroscience* **35**, 10290–10303 (2015).
34. Kessler, R. C. *et al.* The Prevalence and Correlates of Binge Eating Disorder in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *Biological Psychiatry* **73**, 904–914 (2013).
35. Komorowska-Müller, J. A. & Schmöle, A.-C. CB2 Receptor in Microglia: The Guardian of Self-Control. *IJMS* **22**, 19 (2020).
36. La Fleur, S. E., Luijendijk, M. C. M., Van Rozen, A. J., Kalsbeek, A. & Adan, R. A. H. A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. *Int J Obes* **35**, 595–604

- (2011).
37. Lau, B. K., Cota, D., Cristino, L. & Borgland, S. L. Endocannabinoid modulation of homeostatic and non-homeostatic feeding circuits. *Neuropharmacology* **124**, 38–51 (2017).
 38. Lecca, S. Inhibitory Inputs from Rostromedial Tegmental Neurons Regulate Spontaneous Activity of Midbrain Dopamine Cells and Their Responses to Drugs of Abuse.
 39. Lecca, S. *et al.* Effects of Drugs of Abuse on Putative Rostromedial Tegmental Neurons, Inhibitory Afferents to Midbrain Dopamine Cells. *Neuropsychopharmacol* **36**, 589–602 (2011).
 40. Lindqvist, A., Baelemans, A. & Erlanson-Albertsson, C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regulatory Peptides* (2008).
 41. Marcus, M. D., Wing, R. R. & Lamparski, D. M. Binge eating and dietary restraint in obese patients. *Addictive Behaviors* **10**, 163–168 (1985).
 42. Melis, M. *et al.* Enhanced Endocannabinoid-Mediated Modulation of Rostromedial Tegmental Nucleus Drive onto Dopamine Neurons in Sardinian Alcohol-Preferring Rats. *Journal of Neuroscience* **34**, 12716–12724 (2014).
 43. Navarrete, F., García-Gutiérrez, M. S., Aracil-Fernández, A., Lanciego, J. L. & Manzanares, J. Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors, and Monoacylglycerol Lipase Gene Expression Alterations in the Basal Ganglia of Patients with Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics* **15**, 459–469 (2018).
 44. Nguyen, M. *et al.* Sugar-sweetened beverage consumption and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies and randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* **117**, 160–174 (2023).
 45. Nieh, E. H. *et al.* Decoding Neural Circuits that Control Compulsive Sucrose Seeking. *Cell* **160**, 528–541 (2015).
 46. Nieh, E. H. *et al.* Decoding Neural Circuits that Control Compulsive Sucrose Seeking. *Cell* **160**, 528–541 (2015).
 47. Parylak, S. L., Cottone, P., Sabino, V., Rice, K. C. & Zorrilla, E. P. Effects of CB1 and CRF1 receptor antagonists on binge-like eating in rats with limited access to a sweet fat diet: Lack of withdrawal-like responses. *Physiology & Behavior* **107**, 231–242 (2012).
 48. Patkar, O. L. *et al.* A binge high sucrose diet provokes systemic and cerebral inflammation in rats without inducing obesity. *Sci Rep* **11**, 11252 (2021).
 49. Price, A. E., Stutz, S. J., Hommel, J. D., Anastasio, N. C. & Cunningham, K. A. Anterior insula activity regulates the associated behaviors of high-fat food binge intake and cue reactivity in male rats. *Appetite* **133**, 231–239 (2019).
 50. Pucci, M. *et al.* Endocannabinoid System Regulation in Female Rats with Recurrent Episodes of Binge Eating. *IJMS* **23**, 15228 (2022).
 51. Quansah Amissah, R., Basha, D., Bukhtiyarova, O., Timofeeva, E. & Timofeev, I. Neuronal activities during palatable food consumption in the reward system of binge-like eating female rats. *Physiology & Behavior* **242**, 113604 (2021).
 52. Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J. & Manzoni, O. J. Localization and Mechanisms of Action of Cannabinoid Receptors at the Glutamatergic Synapses of the Mouse Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* **21**, 109–116 (2001).
 53. Rosinger, A. & Park, S. Sugar-sweetened Beverage Consumption Among U.S. Adults, 2011–2014. (2017).
 54. Rospond, B. *et al.* Assessment of metabolic and hormonal profiles and striatal dopamine D2 receptor expression following continuous or scheduled high-fat or high-sucrose diet in

- rats. *Pharmacological Reports* **71**, 1–12 (2019).
55. Rossi, M. A. *et al.* Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding. *Science* **364**, 1271–1274 (2019).
 56. Satta, V. *et al.* Limited Access to a High Fat Diet Alters Endocannabinoid Tone in Female Rats. *Front. Neurosci.* **12**, 40 (2018).
 57. Smith, R. J., Vento, P. J., Chao, Y. S., Good, C. H. & Jhou, T. C. Gene expression and neurochemical characterization of the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) in rats and mice. *Brain Struct Funct* **224**, 219–238 (2019).
 58. Soto, M. *et al.* Intermittent access to liquid sucrose differentially modulates energy intake and related central pathways in control or high-fat fed mice. *Physiology & Behavior* **140**, 44–53 (2015).
 59. Spitzer, R. L. *et al.* Binge eating disorder: Its further validation in a multisite study. *Intl J Eating Disorders* **13**, 137–153 (1993).
 60. Succurro, E. *et al.* Obese Patients With a Binge Eating Disorder Have an Unfavorable Metabolic and Inflammatory Profile. **94**, (2015).
 61. Taylor, N. E. *et al.* The rostromedial tegmental nucleus: a key modulator of pain and opioid analgesia. *Pain* **160**, 2524–2534 (2019).
 62. Wang, G.-J. *et al.* Brain dopamine and obesity. *The Lancet* **357**, 354–357 (2001).
 63. Wojnicki, F. H. E., Babbs, R. K. & Corwin, R. L. W. Reinforcing efficacy of fat, as assessed by progressive ratio responding, depends upon availability not amount consumed. *Physiology & Behavior* **100**, 316–321 (2010).
 64. Wojnicki, F. H. E., Charny, G. & Corwin, R. L. W. Binge-type behavior in rats consuming trans-fat-free shortening. *Physiology & Behavior* **94**, 627–629 (2008).
 65. Xu, P. *et al.* Activation of Serotonin 2C Receptors in Dopamine Neurons Inhibits Binge-like Eating in Mice. *Biological Psychiatry* **81**, 737–747 (2017).

II : Analyses supplémentaires

II-A : La prise alimentaire dans les modèles d'obésité et d'hyperphagie boulimique

II-A-1 : Effet d'un accès intermittent au régime fCHFHS sur la consommation de gras et de sucre

Dans ces expériences, les rats sont séparés en deux (cohorte 1) ou trois groupes (cohorte 2 et 3). La cohorte 1 est composée d'un groupe avec un accès *ad libitum* (CA) au régime fCHFHS et un groupe avec un accès intermittent (IA) trois jours par semaine au même régime afin de modéliser l'HB. Les cohortes 2 et 3 comportent, en plus de ces deux groupes, un groupe contrôle exposé uniquement à de la nourriture standard (NA). L'analyse de la consommation hebdomadaire de nourriture palatable montre que pendant la période de l'accès intermittent (15h-17h), le groupe IA consomme plus de saccharose et de gras que le groupe CA. Cet effet est observable dans la cohorte 1 (**Fig. 39A**, Sucrose CA vs. IA, Two-WAY ANOVA, Main group effect $F(1,19)=63.97$, $p<0.0001$; Fat CA vs. IA, Two-WAY ANOVA, Main group effect, $F(1,19)=11.82$, $p=0.0028$), la cohorte 2 (**Fig. 39A**, Sucrose CA vs. IA, Two-WAY ANOVA, Main group effect $F(1,18)=28.04$, $p<0.0001$; Fat CA vs. IA, Two-WAY ANOVA, Main group effect, $F(1,18)=25.64$, $p<0.0001$) et la cohorte 3 (**Fig. 39A**, Sucrose CA vs. IA, Two-WAY ANOVA, Main group effect $F(1,19)=63.97$, $p<0.0001$; Fat CA vs. IA, Two-WAY ANOVA, Main group effect, $F(1,18)=43.98$, $p<0.0001$).

Par ailleurs, chez les rats IA des cohortes 1 et 3, la consommation de saccharose et de gras est mesurée pendant la 1^{ère} et la 2^{ème} heure d'accès intermittent, on observe dans les deux cohortes que la consommation de saccharose et de gras est plus importante pendant la 1^{ère} heure d'accès (**Fig 40A**, Cohorte 1 : Sucrose 1st hour vs. 2nd hour, $t(13)=10.66$, $p<0.0001$; Cohorte 2 : Sucrose 1st hour vs. 2nd hour, $t(9)=6.221$, $p=0.0002$; **Fig 40B**, Cohorte 1, Fat 1st hour vs. 2nd hour, $t(13)=2.643$, $p=0.0203$, Cohorte 3, Fat 1st hour vs. 2nd hour, $t(9)=4.122$, $p=0.0026$).

Une analyse montre que dans les trois cohortes, la consommation de gras chez les IA est équivalente à la consommation de gras chez les CA (**Fig. 40A/B/C**, Cohorte 1 : CA (Fat) vs IA (Fat), $t(19)=0.4044$, $p=0.6904$, Cohorte 2 : CA(Fat) vs IA (Fat), $t(18)=0.8932$, $p=0.3825$; Cohorte 3 : CA (Fat) vs IA (Fat), $t(18)=1.102$, $p=0.2850$).

Cependant, les CA consomment toujours plus de saccharose que les IA (**Fig 41**), Cohorte 1 : CA (Sucrose) vs IA (Sucrose), $t(19)=7.121$, $p<0.0001$; Cohorte 2 : CA (Sucrose) vs IA (Sucrose), $t(18)=4.543$, $p=0.0003$; Cohorte 3 : CA (Sucrose) vs IA (Sucrose), $t(18)=4.767$, $p=0.0002$). Une analyse au sein d'un même groupe de la consommation de gras et de saccharose montre que chez les IA de la cohorte 2 et 3, la consommation de gras surpasse la consommation de saccharose (Cohorte 2, IA (Sucrose), vs IA (Fat), $t(9)=3.948$, $p=0.0034$; Cohorte 3, IA (Sucrose) vs IA (Fat), $t(9)=4.025$, $p=0.0030$) tandis qu'au sein du groupe CA de la cohorte 1 et 3 (**Fig. 41**) , la consommation de saccharose surpasse la consommation de gras (Cohorte 1, CA (Sucrose) vs CA (Fat), $t(6)=3.232$, $p=0.0179$).

Les résultats obtenus valident notre protocole d'accès intermittent comme un modèle d'HB : la consommation de gras et de sucre est largement plus importante lors des deux heures d'accès intermittent chez les rats IA que chez les rats CA, cette consommation a lieu principalement pendant la 1^{ère} heure d'accès intermittent, illustrant la surconsommation d'aliments palatables pendant un temps court. De façon surprenante, les rats du groupe IA ont une consommation de gras similaire aux CA, signifiant une frénésie alimentaire plus importante pour ce macronutriment comparé au sucre.

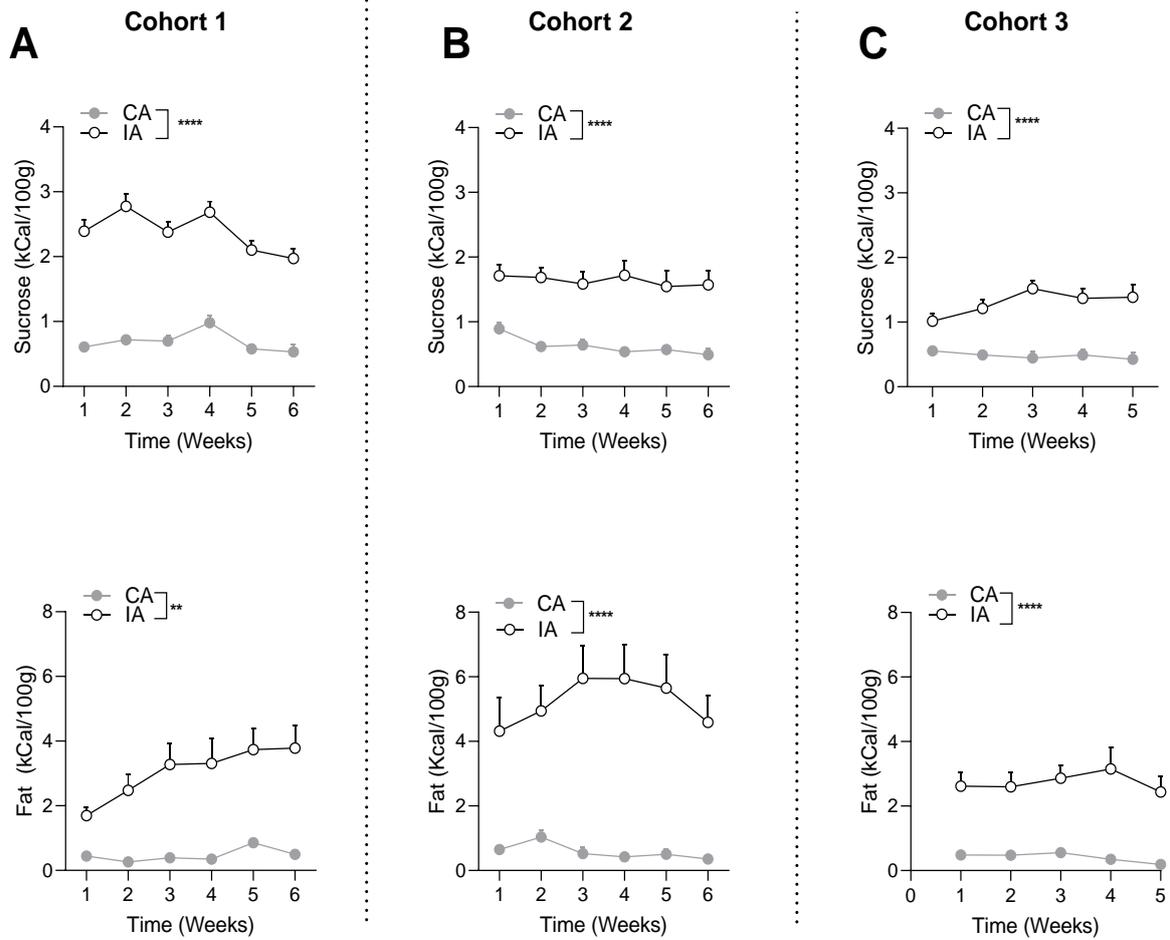


Figure 39 : Un accès intermittent au régime fCHFHS conduit à un phénotype d'hyperphagie boulimique reproductible

Pendant leur période d'accès, les rats IA des trois cohortes consomment plus de saccharose **A** et de gras **B** que les rats CA.

**** : $p < 0.0001$; Two-WAY ANOVA (Main group effect)

** : $p < 0.01$: Two-WAY ANOVA (Main Group effect)

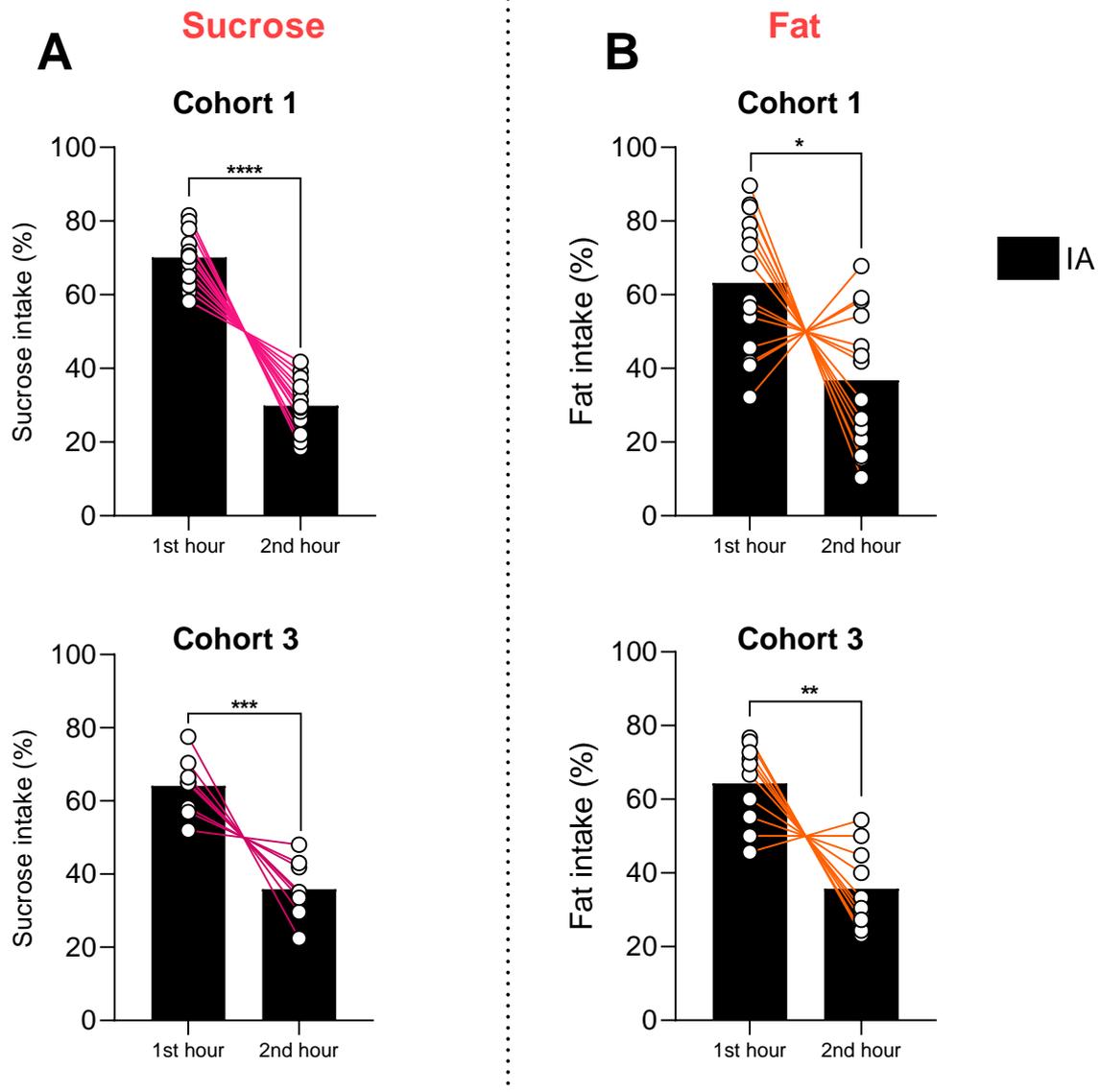


Figure 40 : La consommation de nourriture palatable a lieu préférentiellement pendant la 1ère heure d'accès intermittent

La consommation de nourriture palatable est mesurée lors de la 1ere et 2eme heure deux fois par semaines (Cohorte 1) de la semaine 3 à 5 et une fois par semaine (Cohorte 3) pendant la semaine 3 et 4. Les résultats mesurés sont les moyennes des mesures réalisées de la semaine 3 à 4. Les rats IA des cohortes 1 et 3 consomment plus de saccharose **A** et de gras **B** pendant la première heure d'accès intermittent, par rapport à la deuxième heure d'accès, illustrant un comportement hyperphagique. Ces mesures n'ont pas été réalisées pour la cohorte 2.

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$ (Test de Student apparié, 1st hour vs. 2nd hour).

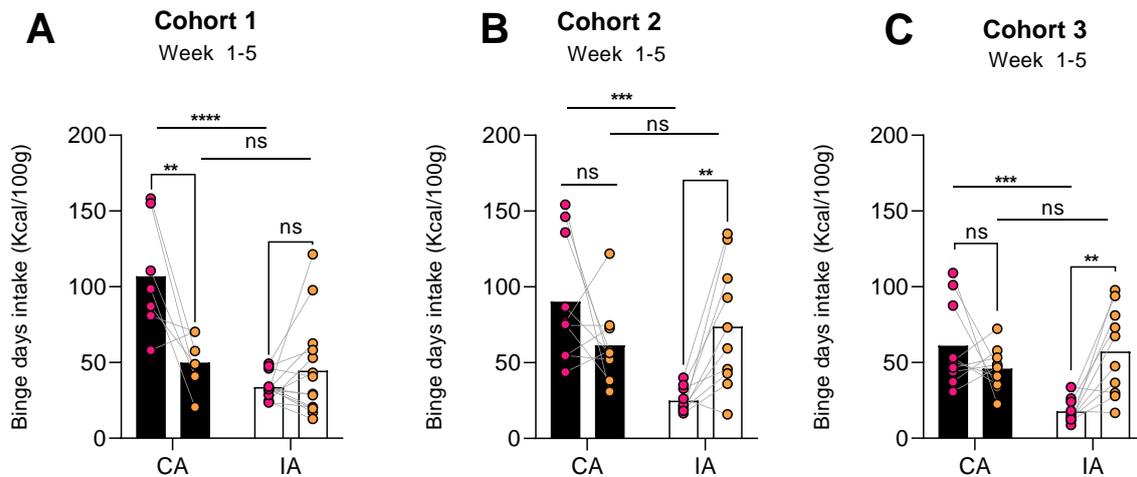


Figure 41 : Un accès intermittent au régime fchFHS conduit à une consommation excessive de gras.

Les rats du groupe CA de la cohorte 1 ont une consommation totale de saccharose plus importante que la consommation totale de gras alors que ces mesures ne sont pas différentes pour les 2 autres cohortes. La consommation de saccharose des groupes IA n'est pas différente de celle du gras dans la cohorte 1, alors qu'elle est plus faible pour les cohortes 2 et 3. Tous les rats CA consomment plus de saccharose que les rats IA, alors que la consommation de gras est semblable entre les groupes CA et les IA. (3 cohortes).

** : $p < 0.01$ (Test de student apparié, sucrose vs fat)

: $p < 0.001$; ##### : $p < 0.0001$ (Test de student non apparié, sucrose vs sucrose ; Fat vs Fat).

II-B : Comportement d'approche vers la nourriture palatable

Dans le but d'explorer un test de mesure plus fin de la consommation pendant la session de binge, nous avons essayé d'utiliser une arène pour distinguer le temps passé vers chaque item (palatable ou non). Cette manipulation pilote a été réalisée sur des animaux de la cohorte 1.

La mesure du comportement d'approche à la nourriture palatable et standard est réalisée dans l'arène « Food choice Arena » dans deux tests séparés de quelques jours chez $n=4$ rats du groupe CA et $n=8$ rats du groupe IA de la cohorte 1. L'analyse du 1^{er} test (**Fig. 42A**) montre que les rats des groupes CA et IA passent plus de temps dans la zone où se trouve la nourriture standard que les autres zones (Two-WAY ANOVA, Area effect : $F(5,35)=27.55$, $p<0.0001$; Post-Hoc de Bonferroni Chow Area Vs Sucrose Area, $t(35)=7.401$, $p<0.0001$; Chow Area Vs Fat Area, $t(35)=7.906$, $p<0.0001$; Chow Area Vs Water Area, $t(35)=9.641$, $p<0.0001$; Chow Area Vs Center Area, $t(35)=9.783$, $p<0.0001$; Chow Area Vs Periphery, $t(35)=9.177$, $p<0.0001$) mais les rats IA passent plus de temps dans la zone où se trouve le saccharose que les rats CA (Sucrose, CA vs. IA, $t(9.978)=3.303$, $p=0.0470$). Cependant, un suivi plus précis avec la tête de l'animal indique que les rats du groupe IA passent plus de temps dans la zone où se trouve la nourriture standard et l'eau (Two-WAY ANOVA, Main Group effect, $F(1,10)=11.93$, $p=0.0062$; Post-Hoc de Bonferroni CA vs IA (Chow area), $t(40)=2.766$, $p=0.0342$; CA vs IA (Sucrose Area), $t(40)=1.631$, $p=0.4426$, CA vs IA (Fat Area), $t(40)=1.367$, $p=0.7167$, CA vs IA (Water Area), $t(40)=3.403$, $p=0.0061$). Lors de la seconde session (**Fig. 42B**), les rats du groupe IA et CA passent toujours plus de temps dans la zone où se trouve la nourriture standard (Two-WAY ANOVA, Area effect : $F(5,35)=19.20$, $p<0.0001$, Post-Hoc de Bonferroni, Chow Area vs. Sucrose Area, $t(35)=7.090$, $p<0.0001$; Chow Area vs. Fat Area, $t(35)=6.580$, $p<0.0001$; Chow Area vs. Water Area, $t(35)=7.159$, $p<0.0001$, Chow Area vs. Center, $t(35)=8.962$, $p<0.0001$; Chow Area vs. Periphery, $t(35)=6.621$, $p<0.0001$) et le suivi de la tête ne montre pas de différence sur le temps passé entre les différentes zones entre le groupe CA et IA (Two-WAY ANOVA, CA vs. IA, $F(1,10)=2.975$, $p=0.1153$). De façon surprenante, les rats du groupe IA et CA passent plus de temps dans la zone où se trouve la nourriture standard ou l'eau plutôt que dans la zone où se trouve le gras ou le saccharose. Le coin de l'arène où se trouve la nourriture standard étant le

coin le plus éloigné de l'entrée de la salle, il est envisageable que les rats trouvent ce coin rassurant et par conséquent passent plus de temps dans cette zone. Nous avons constaté par vidéo tracking que les rats IA consomment toujours du gras et boivent du saccharose dans ce test mais font des aller-retour constants entre la zone « fat » ou la zone saccharose avec la zone chow. De plus, les rats ont été vus comme déplaçant le morceau de gras vers la zone chow pour le consommer, ce qui renforce l'hypothèse d'un effet anxiolytique de cette zone. Il serait intéressant de reproduire cette expérience en déplaçant la localisation des items afin de vérifier notre hypothèse, et le cas échéant de déplacer l'arène plus loin dans la salle de test afin de limiter l'effet anxiogène qu'elle peut procurer.

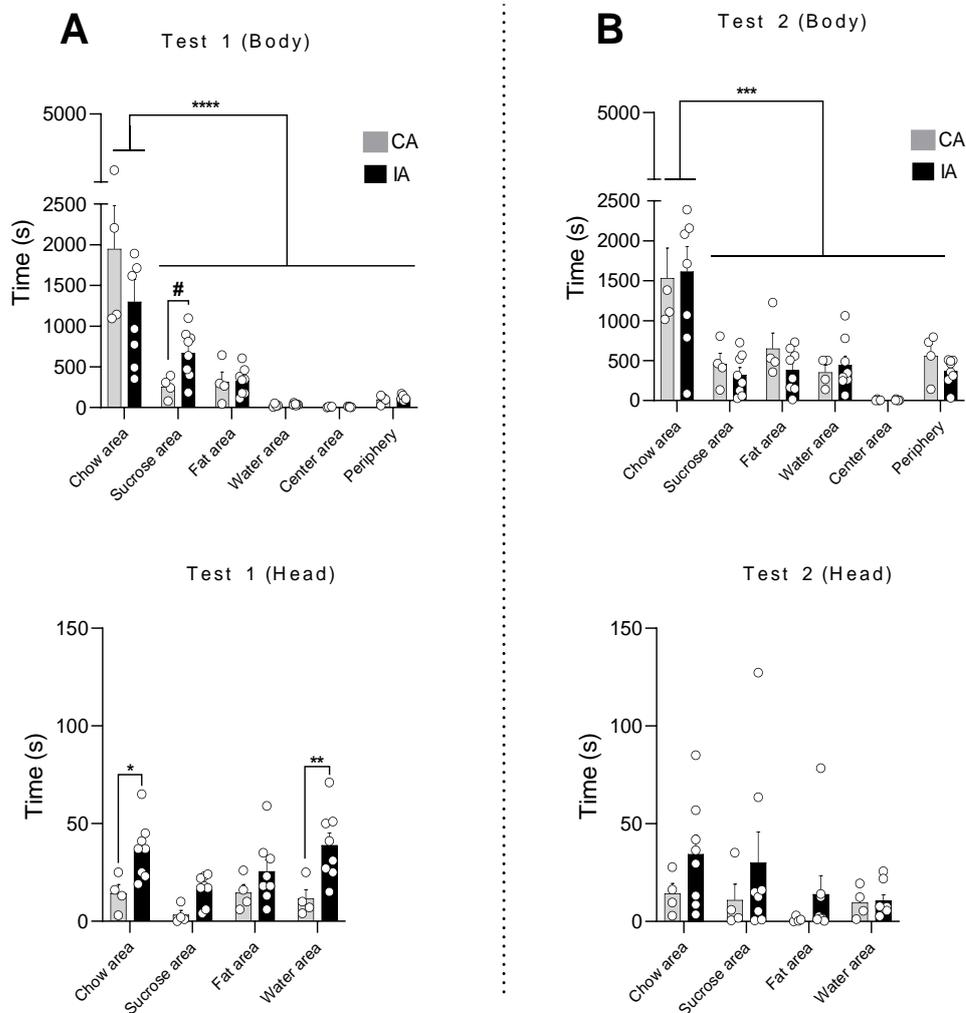


Figure 42: Un accès intermittent ou continu au régime fCHFHS n'affecte pas le comportement d'approche à la nourriture palatable

Dans ce test, 4 rats CA et 8 rats IA de la première cohorte sont placés dans une arène où dans chaque coin se trouvait un élément du régime fCHFHS. Ce test a eu pour but d'évaluer le comportement d'approche des rats CA et IA face à la nourriture standard et palatable. Le test est réalisé deux fois à quelques jours d'intervalle et le comportement d'approche est suivi par vidéo tracking réalisé au niveau du corps et tête de l'animal. **A** Lors du premier test dans l'arène, les rats des groupes CA et IA passent plus de temps dans la zone où est disposée la nourriture standard. Les rats IA passent plus de temps que les CA dans la zone où se trouve le saccharose. L'analyse du suivi de la tête montre que les rats du groupe IA passent plus de temps dans la zone où se trouve la nourriture standard et l'eau. **B** Lors du second test, les rats du groupe CA et IA passent toujours plus de temps dans la zone où se trouve la nourriture standard. L'analyse du suivi de la tête ne montre pas de différence entre les rats du groupe CA et IA en termes de temps passé dans chacune des zones.

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$ (Test de Student avec correction de Bonferroni après Two-WAY ANOVA < 0.05).

II-C : Les conséquences métaboliques de l'obésité et de l'hyperphagie boulimique

II-C-1 : Analyse sur la prise de poids et la masse de tissu adipeux blanc

Nous avons complété notre étude sur les conséquences d'un accès intermittent et continu au régime fCHFHS en mesurant divers paramètres tels que l'évolution pondérale, la masse de tissus adipeux blanc et la prise calorique totale. Dans la cohorte 1, les rats du groupe CA présentent une prise de poids plus rapide que les rats IA (**Fig. 43A**, Cohorte 1 : CA vs. IA, Two-WAY ANOVA, Group X Weeks $F(6,114) = 13.89$, $p < 0.001$). Cependant, dans la cohorte 2 et 3, la prise de poids n'est pas plus importante chez les rats du groupe CA ou IA comparé aux NA (**Fig. 43A**, Cohorte 2 : CA vs. IA Two-WAY ANOVA, Group X Weeks $F(12,186) = 0.9822$, $p = 0.4674$; Cohorte 3 : CA vs. IA Two-WAY ANOVA, Group X Weeks, $F(10,135) = 0.7782$, $p = 0.6496$). Toutefois, la mesure de la prise calorique totale indique que les rats CA de la cohorte 1 ont une prise calorique totale plus importante que les IA de cette même cohorte et les rats CA de la cohorte 2 et 3 ont une prise calorique totale plus importante que les IA et NA (**Fig. 43B**, Cohorte 1, CA vs. IA, Student T-test, $t(19) = 6.285$, $p < 0.0001$;

Cohorte 2 One-WAY ANOVA, $F(2,31)=14.64$, $p<0.0001$; Fisher LSD Post-Hoc NA vs. CA : $t(31)=5.351$, $p<0.0001$; Fisher LSD Post-Hoc NA vs. IA : $t(31)=2.966$, $p=0.0058$; Cohorte 3 One-WAY ANOVA, $F(2,27)=41.24$, $p<0.0001$; Fisher LSD Post-Hoc NA vs. CA : $t(27)=8.718$, $p<0.0001$; Fisher LSD Post-Hoc NA vs. IA : $t(27)=2.155$, $p=0.0402$). De plus, les rats CA de la cohorte 2 et 3 présentent une masse de tissu adipeux blanc plus importante que les rats du groupe NA. Également, les rats du groupe IA de la cohorte 2 ont une masse de tissu adipeux blanc plus important que les NA (**Fig. 43C**, Cohorte 2 : One-WAY ANOVA, $F(2,31)=7.997$, $p=0.0016$; Fisher LSD Post-Hoc NA vs. CA : $t(31)=3.906$, $p=0.0005$; NA vs. IA : $t(31)=2.409$, $p=0.0221$; Cohorte 3 : , One-WAY ANOVA, $F(2,27)=3.811$, $p=0.0348$; Fisher LSD Post-Hoc NA vs. CA : $t(27)=2.467$, $p=0.0203$).

De ce fait, même si nous n'observons pas de prise de poids plus importante chez les rats du groupe CA et IA de la cohorte 2 et 3, nous notons une prise calorique totale plus importante dans ces groupes et une masse de tissu adipeux blanc constamment plus importante chez les CA. Cette différence peut être envisagée comme un effet de saison puisque les trois cohortes ont été réalisées à des moments différents de l'année (printemps cohorte 1, hiver cohorte 2, été cohorte 3). Il est envisageable que les rats du groupe CA et IA de la cohorte 2 et 3 aient été plus actifs et l'hyperactivité motrice a participé à la maintenance du poids des rats. Cependant, dans ces cohortes, la masse de tissu adipeux blanc chez les CA est plus importante que les IA et les NA, ce qui est un critère souvent utilisé pour qualifier d'une obésité chez le rongeur (Martins de Carvalho *et al.*, 2019 ; Bourdy *et al.*, 2021 ; Krashes *et al.*, 2011 ; Hardaway *et al.*, 2019) et respecte la définition de l'OMS définissant la pathologie comme une « accumulation anormale et excessive de graisse. ».

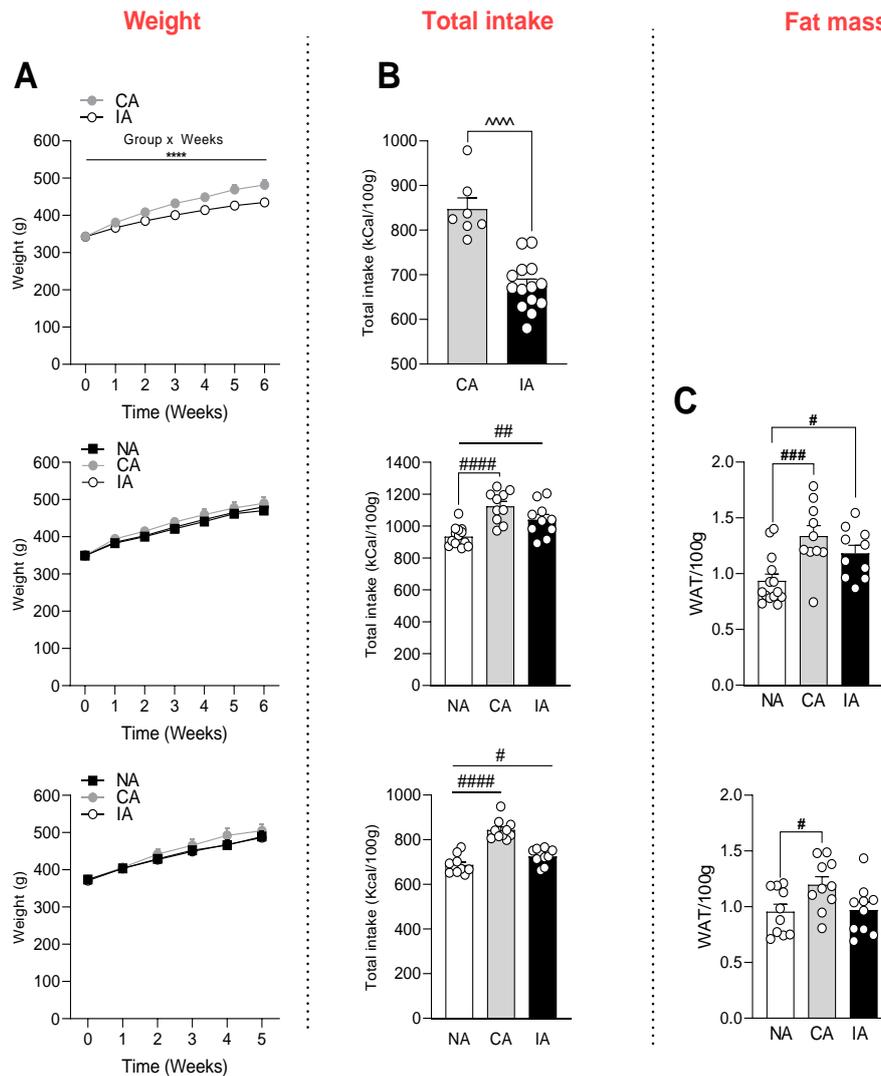


Figure 43: Un accès intermittent ou continu au régime fCHFHS modifie la prise de poids et la masse de tissu adipeux blanc.

Dans le modèle fCHFHF, trois groupes d'animaux ont été suivis, le groupe contrôle sans accès à la nourriture palatable (NA), un groupe ayant un accès continu (CA) et un groupe ayant un accès intermittent (IA). Trois cohortes distinctes ont été menées, la première en manipulation pilote sans groupe NA (n=7-14/groupe) et les deux autres avec les trois groupes (n=10-13/groupe). **A** La prise de poids augmente plus rapidement chez les rats CA de la cohorte 1 que chez les rats IA. Cette différence n'est pas retrouvée dans les deux autres cohortes. **B** Dans les trois cohortes, les rats CA ont une prise calorique plus importante que le groupe IA et NA, dans la cohorte 2 et 3, les rats IA ont également une prise calorique plus importante que les NA. **C** La masse de tissu adipeux blanc est plus importante chez les CA (cohortes 2 et 3) et les IA (cohorte 2) que chez les rats du groupe contrôle.

**** : $p < 0.0001$: Two-WAY ANOVA (Group X Weeks)

: $p < 0.05$; ## : $p < 0.01$; ### : $p < 0.001$; #### : $p < 0.0001$ (Fisher LSD Post-Hoc après ANOVA < 0.05) ; ^^^ : $p < 0.0001$: Unpaired T-test

II-C-2 : Analyse du poids du tissu hépatique et coloration Red-Oil

Une analyse de clusters réalisée sur l'ensemble des cohortes 2 et 3 (**Fig. 44A**) se basant sur la consommation totale de gras, de saccharose, de nourriture standard et la masse de tissu adipeux blanc et de tissu hépatique identifie K=2 clusters. Ces clusters, obtenus après l'analyse des K-moyens (**Fig. 44B**) et sont composés à 69% de rats CA et 31% de rats IA pour le cluster 1 et 69% de rats du groupe NA et 31% de rats du groupe IA pour le cluster 2. Une analyse en composantes principales (**Fig. 44C**) montre que la masse de tissu hépatique, la consommation totale de nourriture standard et de saccharose expliquent cette distinction en 2 clusters. Une analyse de la prise alimentaire montre que les rats du cluster 1 consomment plus de saccharose (**Fig. 44E**, Cluster 1 vs Cluster 2 $t(62)=7.913$, $p<0.0001$) et moins de nourriture standard (**Fig. 44E**, Cluster 1 vs Cluster 2, $t(62)=7.858$, $p<0.0001$). Ainsi, le cluster 1 est labélisé « High sucrose » et le cluster 2 est labélisé « Low sucrose ». Avant la séparation en clusters, nous voyons que la masse de tissu hépatique entre les rats NA, CA et IA de la cohorte 2 et 3 ne diffère pas (**Fig. 44D** One-Way ANOVA, $F(2,61)=1.274$, $p=0.2870$). Puisque l'analyse en composantes principales pointe la masse de tissu hépatique comme un facteur expliquant la séparation en cluster « High sucrose » et « Low sucrose », nous nous attendions à ce que la distinction de la masse de tissu hépatique en clusters montre une différence entre groupes. Cela n'est étonnamment pas le cas (**Fig. 44D**, Cluster 1 vs Cluster 2, $t(62)=0.6496$, $p=0.5183$) mais peut s'expliquer par la très faible variabilité de la masse de tissu hépatique à travers les groupes (Interval de confiance à 95% des données NA, CA et IA : [3 .13 ; 3.27]). De ce fait, nous avons poursuivi notre analyse avec une régression linéaire qui montre une corrélation positive entre la consommation de saccharose totale et la masse de tissu hépatique chez le cluster 1 (**Fig. 44F**, Cluster 1 « High sucrose » $R^2=0.2730$, $p=0.036$), cette corrélation est absente chez le cluster 2 (**Fig. 44F**, Cluster 2 « Low sucrose » $R^2=0.0000579$, $p=0.9942$). L'accumulation de lipide dans le foie est examinée au sein de la cohorte 2 avec une coloration en Red-Oil qui marque les triglycérides d'un tissu (**Fig. 42G**). Le marquage au Red-Oil, normalisé par rapport au marquage du groupe contrôle NA, est statistiquement plus important chez les CA et chez le cluster 1 (One-WAY ANOVA, $F(3,21)=3.949$, $p=0.022$, Fisher LSD Post-Hoc, NA vs. CA : $t(21)=2.644$, $p=0.0152$, NA vs IA : $t(21)=1.705$, $p=0.1029$, NA vs Cluster 1 : $t(3.188)$, $p=0.0044$).

L'ensemble de ces analyses met en évidence que la consommation de saccharose conduit à de sensibles modifications métaboliques, notamment en altérant l'intégrité du tissu hépatique. Les rats forts consommateurs de saccharose présentent en effet des signes de NAFLD plus importants ainsi qu'une masse de tissu hépatique positivement corrélée avec la consommation totale de saccharose. C'est possiblement la présence de fructose qui conduit à cette stéatose puisque ce monosaccharide n'est métabolisé que par le foie et conduit à une activation des voies de la lipogenèse hépatique (Lim *et al.*, 2010). Chez les IA, la quantification en Red-Oil ne permet pas de montrer un phénotype de NAFLD aussi marqué que chez les CA, ce qui est en accord avec notre hypothèse puisque la consommation de saccharose totale des IA est plus faible que celle des CA. Des résultats similaires sont visibles dans un protocole d'HB au saccharose chez la souris (Aubry *et al.*, non publié). Cependant une autre mesure réalisée chez le rat dans notre laboratoire montre qu'un accès *ad libitum* uniquement au saccharose pendant six semaines ne conduit pas à un phénotype de stéatose (Hildenbrand *et al.*, non publié). De ce fait, il est envisageable que la consommation de saccharose associée à la consommation de gras conduise au développement d'une NAFLD. Chez les IA, la forte variabilité et les résultats de la quantification tendent à montrer qu'un début de stéatose semble avoir lieu, ce qui serait lié à la forte consommation de gras observée chez ces rats. Il serait intéressant d'augmenter l'effectif des IA et procéder à une nouvelle analyse pour vérifier notre hypothèse d'un début de stéatose chez les IA. Par ailleurs, nous avons procédé à une analyse du tissu hépatique en coloration hématoxyline-éosine afin d'identifier la présence d'infiltrats inflammatoire, caractéristique de la NAFLD. Cependant, les images obtenues suite à cette coloration ne permettent pas d'identifier clairement des altérations histologiques.

Résultats

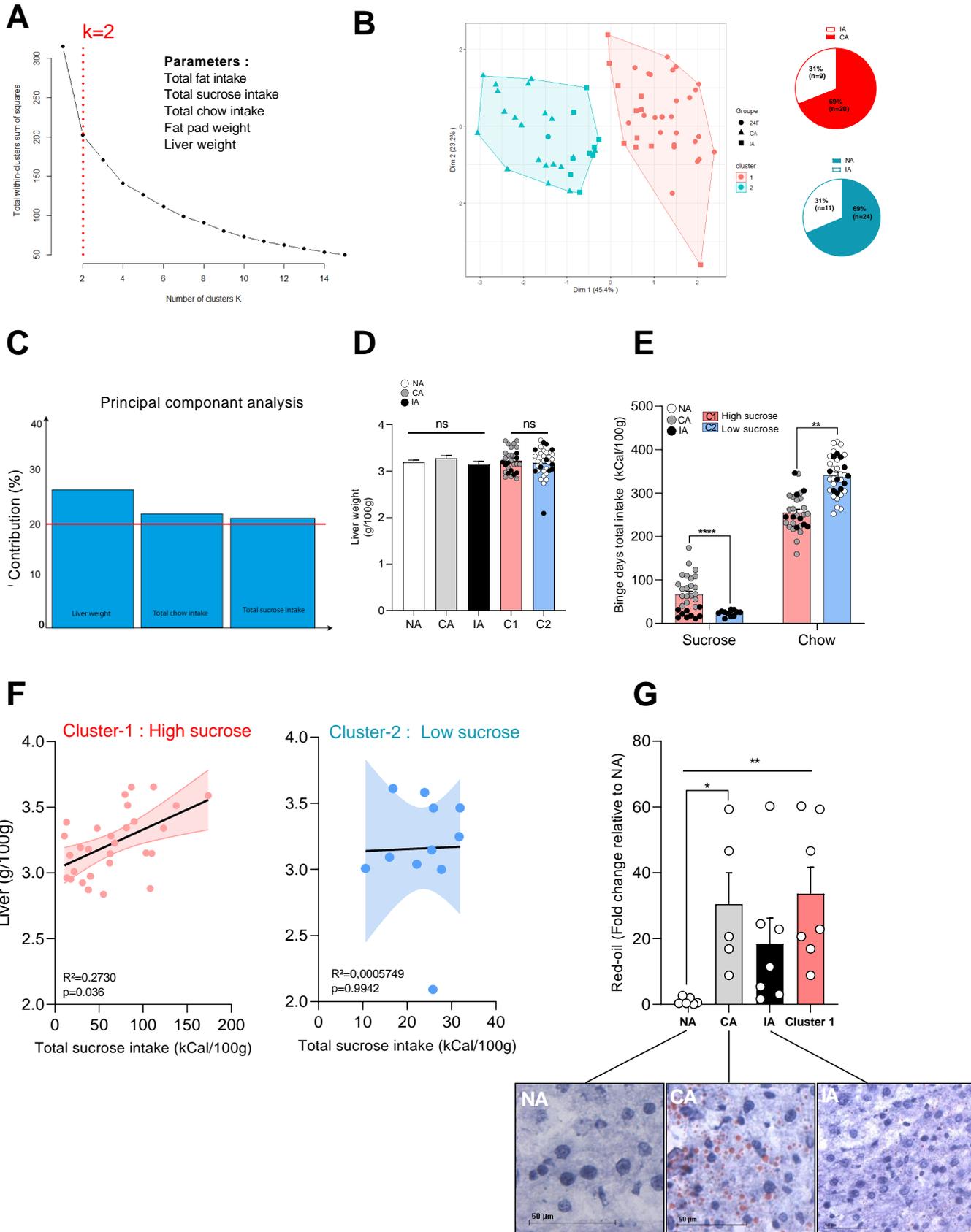


Figure 44 : Une analyse des K-moyens montre qu'une forte consommation de saccharose affecte le poids du tissu hépatique et favorise le développement d'une stéatose hépatique non alcoolique

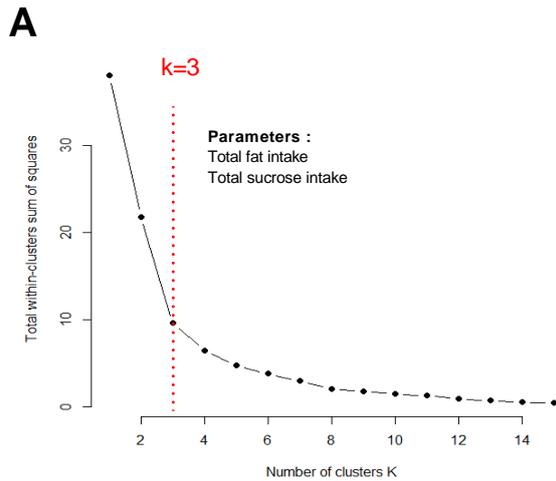
A La méthode des coudes permet de décomposer l'ensemble des rats des cohortes 2 et 3 en K=2 clusters selon la consommation totale de saccharose, de gras, nourriture standard et le poids du tissu hépatique et du tissu adipeux blanc. **B** Le cluster 1 est composé à 69% (n=20) de rats CA et 31% (n=9) de rats IA, le cluster 2 est composé à 69% (n=24) de rats du groupe NA et 31% (n=11) de rats IA. **C** La séparation en clusters est principalement expliquée par la masse de tissu hépatique, la consommation totale de nourriture standard et la consommation totale de saccharose. **D** La masse de tissu hépatique est similaire entre le cluster 1 et le cluster 2, **E** Le cluster 1, labélisé « High sucrose », affiche une consommation de saccharose plus élevée que le cluster 2 mais une moindre consommation de nourriture standard. **F** Une analyse en régression linéaire sur le cluster 1 montre une corrélation positive entre la consommation de saccharose et la masse de tissu hépatique, cette corrélation est absente sur le cluster 2. **H** Les images de la coloration en Red-Oil (Barre noire : 50µm) montrent que le tissu hépatique des CA contient plus de lipides (gouttelettes rouges) que les NA (quasi nulle) et IA (niveau intermédiaire). Une quantification de cette coloration confirme cette plus grande infiltration chez les CA et également dans le cluster 1 « High sucrose ».

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 ; **** : p<0.0001 (Test de Student avec correction de Bonferroni après Two-WAY ANOVA <0.05) ; # : p<0.05 (Post hoc de Fisher LSD après One-WAY ANOVA <0.05).

III : Analyse par clusters

La méthode des coudes (**Fig. 45A**), se basant sur la consommation totale de saccharose et de gras pendant les jours d'accès intermittent chez les rats des groupes IA et CA, permet une distinction de K=3 cluster. L'analyse des K-moyens (**Fig. 45B**) met en évidence le cluster 1, composé à 50% de rats du groupe CA et 50% de rats IA tandis que le cluster 2 est composé à 100% de rats du groupe CA et le cluster 3 est constitué à 72% de rats IA et 28% de CA. L'analyse en composantes principales (**Fig. 45C**), qui permet de déterminer les facteurs contribuant le plus à la séparation en clusters (au-dessus de la ligne rouge), indique que la consommation totale de saccharose et celle de gras contribuent de manière égale à la répartition en cluster. Le cluster 2 présente une consommation de saccharose plus importante (**Fig. 45D**, One-WAY ANOVA, $F(2,17)=29.84$, $p<0.0001$; Fisher LSD Post-Hoc Cluster 2 vs Cluster 1, $t(17)=7.034$, $p<0.0001$; Cluster 2 vs Cluster 3, $t(17)=7.333$, $p<0.0001$) et les rats du cluster 3 consomment plus de gras (**Fig. 14D**, One-WAY ANOVA, $F(2,17)=21.76$, $p<0.0001$; Fisher LSD Post-Hoc Cluster 3 vs Cluster 1, $t(17)=6.193$, $p<0.0001$; Cluster 3 vs Cluster 2, $t(17)=4.664$, $p=0.0002$). Par conséquent le cluster 1 et 3 sont respectivement labélisés « High sucrose » et « High fat » et le cluster 1 « Low Fat Low sucrose ». Nous avons utilisé ces clusters pour faire une nouvelle analyse des résultats obtenus par qPCR pour examiner l'expression de gènes de l'ECS. L'analyse du profil d'expression de l'ECS dans le striatum dorsal (DS) ne montre pas de différence entre les clusters pour l'ensemble des gènes testés (**Fig. 46**) à l'exception de NAPE (**Fig. 45E**, NAPE : One-WAY ANOVA, $F(2,17)=4.970$, $p=0.0200$, Fisher LSD Post-Hoc « High sucrose » vs. « Low fat low sucrose » : $t(17)=3.153$, $p=0.0058$; « High sucrose » vs. « High fat » : $t(17)=2.303$, $p=0.0342$) qui est plus exprimé dans le cluster « High sucrose », correspondant à uniquement des rats CA et quelques tendances sont visibles sur le profil d'expression « High fat » vs « High sucrose » ce qui suggère que l'expression de l'ECS est différemment affectée selon le type de macronutriment consommé.

Résultats



Principal component analysis

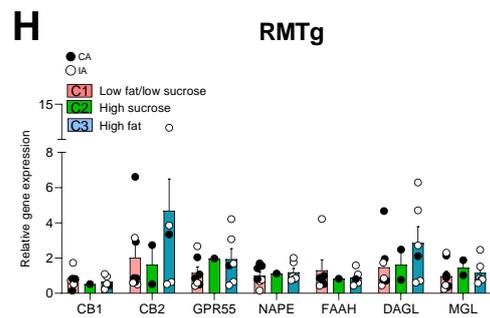
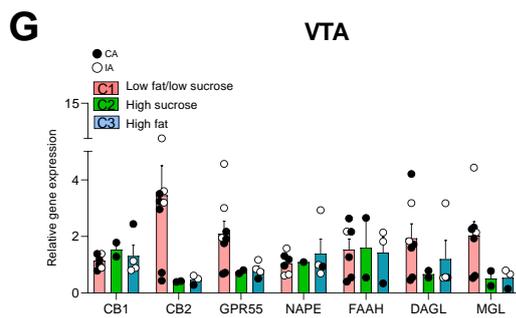
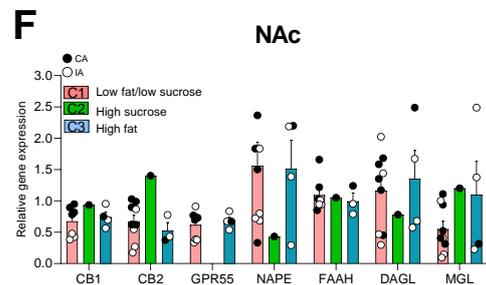
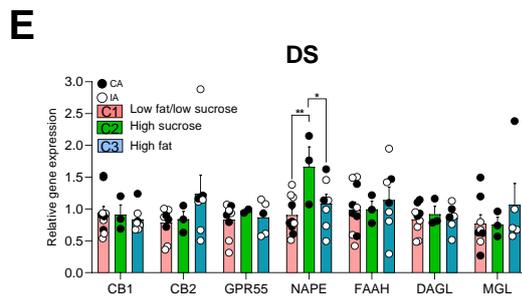
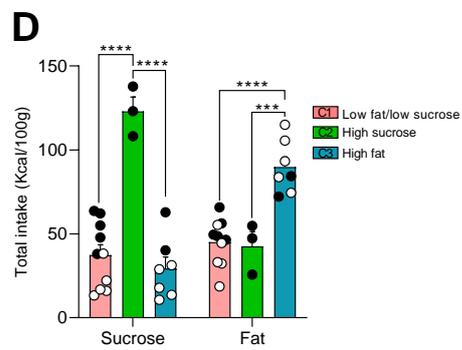
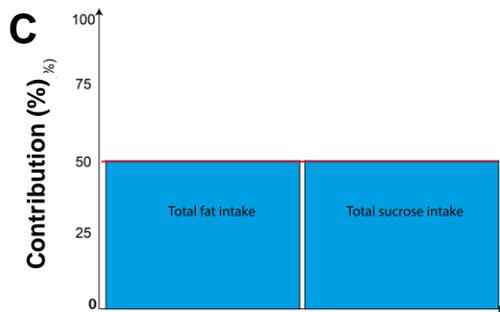
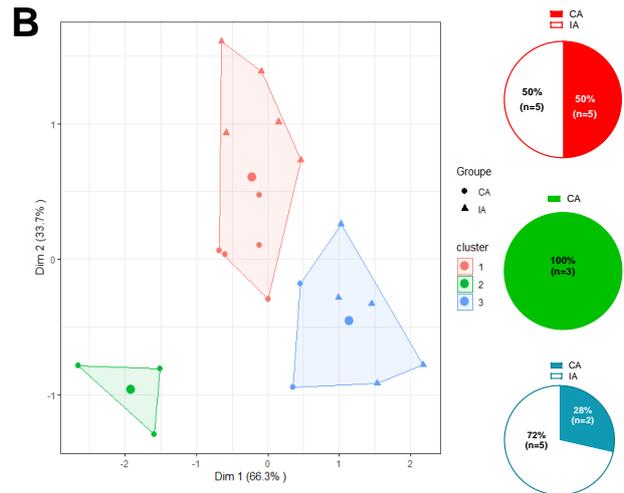


Figure 45 : Une analyse des K-moyens ne montre pas d'effets majeurs d'une forte consommation de saccharose ou de gras sur le profil d'expression du système endocannabinoïde.

A La méthode des coude, se basant sur la consommation totale de gras et de sucre permet de séparer les rats de la cohorte 2 en K=3 clusters. **B** L'analyse des K-moyens établit les clusters suivants : Le cluster 1 est composé à 50% (n=5) de rats CA et 50% (n=5) de rats IA, le cluster 2 est composé à 100% (n=3) de rats CA et le cluster 3 est composé à 28% de CA (n=2) et de 72% de rats IA (n=5). **C** La consommation totale de gras et celle de saccharose contribuent de manière égale à la séparation en clusters. **D** Les rats du cluster 2 consomment plus de saccharose que les clusters 1 et 3, le cluster 2 est labélisé « High sucrose » tandis que les rats du cluster 3 consomment plus de gras que les clusters 1 et 2, ce cluster est labélisé « High fat ». **E** L'analyse de l'expression du système endocannabinoïde dans le striatum dorsal (DS), après l'analyse en clusters, montre que les rats « High sucrose » ont une expression de NAPE plus importante. L'expression des gènes du système endocannabinoïde ne diffère pas entre les clusters que ce soit dans le nucleus accumbens (NAc) **F**, l'aire tegmentale ventrale (VTA) **G** et le noyau tegmental rostromédian (RMTg) **H**.

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$ (Test de Student avec correction de Bonferroni après Two-WAY ANOVA < 0.05).

C1 vs C2 vs C3				
Region Gene	DS	NAc	VTA	RMTg
CB1	F(2,17)=0.2345 p=0.7935	F(2,9)=0.6659 p=0.5374	F(2,10)=0.5840 p=0.5756	F(2,10)=0.5840 p=0.5756
CB2	F(2,16)=0.8886 p=0.4306	F(2,10)=3.490 p=0.0708	F(2,10)=2.326 p=0.1481	F(2,10)=2.326 p=0.1481
GPR55	F(2,13)=0.2325 p=0.7957	NA	F(2,11)=2.833 p=0.1018	F(2,11)=2.833 p=0.1018
NAPE	F(2,17)=4.970 p=0.0200 *	F(2,11)=0.5065 p=0.6160	F(2,8)=0.2845 p=0.7597	F(2,8)=0.2845 p=0.7597
FAAH	F(2,17)=0.2830 p=0.7570	F(2,8)=0.1517 p=0.8616	F(2,8)=0.01782 p=0.9824	F(2,8)=0.01782 p=0.9824
DAGL	F(2,15)=0.1508 p=0.8613	F(2,11)=0.2839 p=0.7582	F(2,10)=0.9472 p=0.4200	F(2,10)=0.9472 p=0.4200
MGL	F(2,13)=0.5813 p=0.5731	F(2,11)=1.288 p=0.3143	F(2,9)=2.800 p=0.1134	F(2,9)=2.800 p=0.1134

Figure 46 : Résultats des analyses statistiques de la comparaison de l'expression génique entre clusters

DS : Dorsal Striatum, NAc : Nucleus Accumbens, RMTg : Rostromedial Tegmental Nucleus, VTA : Ventral tegmental area. C1 : Cluster 1 « Low Fat Low Sucrose » ; C2 : Cluster 2 « High sucrose » ; C3 : Cluster 3 « High Fat ».

* : p<0.05 (One-Way ANOVA).

DISCUSSION GÉNÉRALE



I-Synthèse des résultats obtenus

I-A : Article 1 : The rostromedial tegmental nucleus gates fat overconsumption through ventral tegmental area output

Dans cette première étude, nous avons souhaité mieux caractériser les cibles neuronales des projections du RMTg vers le LH. En effet, les études neuroanatomiques précédentes ont démontré que le RMTg ciblait les neurones dopaminergiques de la VTA, mais les cibles cellulaires des projections du RMTg vers le LH restent encore mal connues. Par ailleurs, nous avons voulu déterminer si les neurones à l'origine des voies RMTg-VTA et RMTg-LH appartenaient à une seule ou à deux populations distinctes dans le but d'étudier leurs fonctions respectives. Grâce à des analyses d'immunofluorescence et l'utilisation d'un traceur antérograde, le BDA, injecté dans le RMTg, nous avons déterminé que les neurones du RMTg ciblent les neurones Orx du LH. L'injection de deux vecteurs viraux rétrogrades, l'un permettant l'expression de la protéine fluorescente mCherry dans la VTA et l'autre celle de l'eGFP, injecté dans le LH a montré que deux populations neuronales distinctes étaient à l'origine de ces deux voies et qu'il est donc possible de les étudier indépendamment. Nous avons donc étudié l'impact d'une lésion de chacune de ces voies sur la prise alimentaire, afin de pouvoir caractériser leurs rôles respectifs, par une approche de lésions projections-spécifiques. Pour cela, nous avons utilisé une combinaison de vecteurs viraux permettant ces lésions, puis exposé les animaux infectés à un régime obésogène de type « free choice high fat high sugar » (fcHFHS) suivi d'une période de 4 semaines de sevrage à la nourriture palatable, et d'une période de 24h de ré-accès. L'impact de la lésion sur la prise alimentaire a été suivi sur l'ensemble du régime. Les résultats de cette étude indiquent que la lésion de la voie RMTg-VTA induit une consommation excessive de gras lors du régime et pendant la période de ré-accès et à une hyperactivité locomotrice pendant les 4 semaines de sevrage de nourriture palatable ainsi que pendant la période de ré-accès. Ainsi, nos résultats mettent en évidence un rôle du RMTg dans la régulation de la surconsommation de gras via ses projections sur le circuit de la récompense.

I-B : Article 2 : Binge-eating and obesity induces different transcriptional regulations of the endocannabinoid system in reward-related brain regions

Discussion générale

Dans cette étude, nous avons examiné les modifications de l'ECS dans un contexte d'obésité et dans l'HB en donnant aux rats un accès continu ou intermittent trois jours par semaine pendant deux heures au régime fcHFHS. Ce type d'accès intermittent a déjà été utilisé dans des études précédentes afin de modéliser le phénotype d'HB (Corwin *et al.*, 1998). Ce protocole montre que pendant les deux heures d'accès, les rats avec un accès intermittent consomment plus de gras et de sucre que les rats avec un accès continu, montrant l'obtention d'un phénotype d'HB. De plus, on constate que les rats du groupe avec accès intermittent ont une consommation totale de gras semblable à celle des rats avec un accès continu, illustrant une perte de contrôle importante sur la consommation de gras. Au terme des six semaines de protocole, nous avons étudié les niveaux d'expression des gènes de l'ECS dans différentes structures du circuit de la récompense et impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Nous avons également étudié les adaptations de l'ECS dans le RMTg, une structure inhibitrice du circuit de la récompense qui exprime le récepteur CB1 (Lecca *et al.*, 2011 & 2012 ; Melis *et al.*, 2014). L'analyse moléculaire de l'ECS par qPCR a montré une réduction globale de l'expression de l'ECS chez les rats avec un accès intermittent, illustrée notamment par une baisse de l'expression de CB1 dans le DS et le NAc ainsi qu'une diminution d'expression de DAGL α dans le NAc. Au sein du RMTg, nous avons constaté une augmentation de l'expression des gènes codant pour DAGL α et CB2 chez les rats ayant été soumis à un accès intermittent. Une étude précédente a montré qu'une augmentation du tonus de l'ECS dans le RMTg favoriserait la préférence à l'alcool. Ainsi, il est envisageable que l'augmentation du tonus ECS dans le RMTg participe aussi à la perte de contrôle sur la nourriture palatable chez les rats avec un accès intermittent. De plus, une analyse par corrélation a montré que les modifications de l'expression de l'ECS semblent dépendantes de la quantité totale de gras et de saccharose consommées, illustrant une éventuelle dissociation des effets gras vs sucre sur les adaptations de l'ECS.

II : La voie RMTg-VTA contrôle la consommation de gras

II-A : Considérations techniques relatives à la lésion de la voie RMTg-VTA

Dans la première étude, nous avons utilisé une combinaison de vecteurs viraux afin de pouvoir léser spécifiquement la voie RMTg-VTA ou RMTg-LH, une technique innovante utilisée dans le cadre de l'étude de circuits cérébraux (Laurent *et al.*, 2017 ;

Li *et al.*, 2019a&b ; Tervo *et al.*, 2016). La mise en place de ces lésions nous est apparue comme la plus à même de pouvoir évaluer la contribution relative de chacune de ces voies dans nos protocoles de longue durée (10 semaines).

Malgré tout, l'utilisation de vecteurs viraux afin d'engendrer une lésion neuronale comporte également des limites. Dans un premier temps se pose le problème de la proximité des sites d'injections pour la lésion de la voie RMTg-VTA. En effet, le RMTg est situé juste derrière la VTA chez le rat et ces deux structures s'étendent chacune sur environ 1 millimètre sur l'axe antéro-postérieur. Cette proximité fait que le site d'injection du virus portant la Cre-recombinase dans la VTA peut éventuellement s'étendre sur le RMTg et induire une lésion plus importante qu'anticipée. Dans nos expériences ce problème a été évité en excluant les rats avec des étendues de sites d'injections trop importantes.

De la même manière, l'injection du virus portant la cassette Caspase 3 floxée dans le RMTg peut s'étendre dans la VTA. Le contrôle de l'étendue du site d'injection de ce vecteur viral dans le RMTg est difficilement réalisable puisque le vecteur viral ne contient pas de cassette permettant l'expression d'une protéine fluorescente. Cependant, une étude utilisant ce même virus dans le RMTg (Li *et al.*, 2019b) indique qu'une injection d'un AAV (0.2 µL) avec un sérotype identique et portant une cassette fluorescente s'étend à ± 1.2 mm du site d'injection. Les sites d'injections étant localisés dans la partie postérieure du RMTg (-6.8 mm), il est envisageable qu'ils puissent atteindre la partie postérieure de la VTA.

II-B : Lésion de la voie RMTg-VTA : Vers une hyperdopaminergie ?

Nos résultats obtenus sur la lésion de la voie RMTg-VTA indiquent la possibilité d'une hyperdopaminergie qui pourrait être à l'origine des comportements observés. En effet, le RMTg envoie des projections inhibitrices denses aux neurones dopaminergiques de la VTA et limite la libération de dopamine dans le circuit de la récompense (Kaufling *et al.*, 2010 ; Jhou *et al.*, 2009 ; Smith *et al.*, 2021 ; Lecca *et al.*, 2011&2012, Taylor *et al.*, 2019). Ainsi, il est envisageable que la lésion de cette voie conduise à une levée d'inhibition sur les neurones dopaminergiques et une hyperactivité du circuit de la récompense. Les rats avec une lésion pour cette voie présentent une réduction du phénotype d'anxiété qui peut être reproduite avec une stimulation pharmacologique des neurones dopaminergiques de la VTA (Zweifel *et al.*,

Discussion générale

2011) et qui rejoint les études précédentes sur le RMTg où une lésion excitotoxique de la structure conduit à une diminution du phénotype d'anxiété (Jhou *et al.*, 2009b ; Elmer *et al.*, 2019).

Cette hyperdopaminergie favoriserait ainsi la consommation de nourriture palatable, comme observé avec des études précédentes où l'activation des neurones GABAergiques du LH projetant aux interneurons GABA de la VTA conduit à une désinhibition des neurones dopaminergiques et favorise la consommation de nourriture palatable (Nieh *et al.*, 2015 & 2016). De façon surprenante, la lésion de cette voie conduit à une surconsommation de gras sans affecter la consommation de saccharose, contrastant avec des études qui ont montré qu'une lésion de la VTA conduit à une réduction drastique de la consommation de saccharose (Shibata *et al.*, 2009) tandis qu'une hyperactivation produit le contraire (Minnaard *et al.*, 2022). Une comparaison des effets gras vs sucre suggère que la consommation de gras a une capacité plus importante d'activation des structures mésolimbiques (Espitia-Bautista & Escobar, 2019 ; De la Cruz *et al.*, 2015) et ceci pourrait expliquer pourquoi la lésion de la voie RMTg-VTA conduirait à une surconsommation de ce type d'aliment.

Des études ont montré que le sevrage de nourriture palatable conduit à une hyperactivité motrice et une augmentation de la motivation pour obtenir de la nourriture palatable (Teegarden & Bale, 2007 ; Kreisler *et al.*, 2018 ; Sharma *et al.*, 2013). La consommation de ce type d'aliment ayant lieu principalement pendant la phase nocturne (**Résultats supplémentaires, Section « Effets de la lésion sur la prise alimentaire en phase diurne et nocturne »**), il est envisageable que ce soit la privation de nourriture riche en gras qui conduise à une hyperactivité locomotrice des rats pendant la phase nocturne des 4 semaines de sevrage. Cette hyperactivité pourrait être induite par une libération excessive de dopamine dans le NAc via les terminaisons dopaminergiques en provenance de la VTA et illustrer un comportement de recherche compulsive de la nourriture palatable (Berridge & Robinson, 1998 ; Berridge, 2012).

Néanmoins, les études cliniques et précliniques montrent que l'obésité semble préférentiellement conduire à une hypodopaminergie. Les premières études réalisées sur les modifications du système dopaminergique dans l'obésité ont montré une diminution de la disponibilité des récepteurs D2 dans le striatum de patients obèses, similairement à ce qui a lieu chez les consommateurs chroniques de méthamphétamine (Wang *et al.*, 2001). L'activité du circuit de la récompense semble fortement diminuée en situation basale chez les patients obèses (Wang *et al.*, 2014 ;

Discussion générale

Volkow *et al.*, 2008). De même, les résultats obtenus dans les études précliniques sur l'obésité vont dans le sens de cette diminution de l'activité du circuit de la récompense avec notamment une réduction de l'expression de gènes du système dopaminergique après un régime obésogène (Bourdy *et al.*, 2021 ; Carlin *et al.*, 2013). De plus, une lésion des afférences dopaminergiques du NAc par administration de 6OHDA conduit à une augmentation de la consommation de gras dans un protocole de type fcHFHS (Joshi *et al.*, 2021).

Le RDS stipule que la réduction de l'activité du circuit dopaminergique conduit au développement des addictions et la surconsommation d'aliments palatables (Blum *et al.*, 1996). Cependant, l'existence de ce syndrome n'a pas été clairement établie et certaines études présentent des résultats opposés à ce qui est attendu avec la théorie du RDS. Par exemple, une étude à grande échelle sur 123 individus (Van de Giessen *et al.*, 2013) n'a pas permis de répliquer la réduction de la DAT initialement observée dans le striatum de personnes avec un IMC élevé (Chen *et al.*, 2008). D'autres études ne montrent pas non plus de différences entre la capacité de liaison du récepteur D2 dans le striatum de patients obèses et non obèses (Steele *et al.*, 2010 ; Karlsson *et al.*, 2015) et d'autres montrent une corrélation positive entre la disponibilité des récepteurs D2 et l'IMC (Cosgrove *et al.*, 2015 ; Dunn *et al.*, 2012). De plus, certaines études précliniques montrent la présence d'une libération plus importante de dopamine dans le NAc après une exposition à un régime riche en gras, notamment par une diminution de l'expression de la DAT (Naneix *et al.*, 2015 ; Narayanaswami *et al.*, 2013).

Une étude évoque un changement de l'activité du tonus du système dopaminergique selon la durée d'exposition à un régime obésogène. Dans cette étude, il est montré que des rats nés de mères exposées à un régime obésogène pendant la gestation et la période périnatale présentent une consommation de gras plus importante ainsi qu'une réduction de l'expression de la DAT à six semaines dans le NAc, suggérant une hyperdopaminergie qui conduirait à une surconsommation de nourriture palatable. Cependant, si ces rats sont maintenus sous un régime obésogène jusqu'à trois mois après leur naissance, l'expression de la DAT devient plus importante dans le NAc mais les rats continuent de consommer plus de gras (Ong & Muhlhausler, 2011). Cette étude indique alors que l'exposition à un régime riche en gras pourrait conduire à une hyperdopaminergie initiale qui maintiendrait la consommation de gras. Puis, après un certain temps, des mécanismes d'adaptations se mettraient en place

Discussion générale

afin de réduire le tonus dopaminergique, conduisant à une désensibilisation du circuit de la récompense favorisant davantage la consommation de gras.

De ce fait, nous proposons que la lésion de la voie RMTg-VTA pourrait conduire à une levée de l'inhibition exercée par les neurones du RMTg sur les neurones dopaminergiques de la VTA, bloquant le système dans un état d'hyperactivité, qui expliquerait à la fois la surconsommation de gras pendant les six semaines de régime et l'hyperactivité associée au sevrage et à la rechute (**Fig.47**).

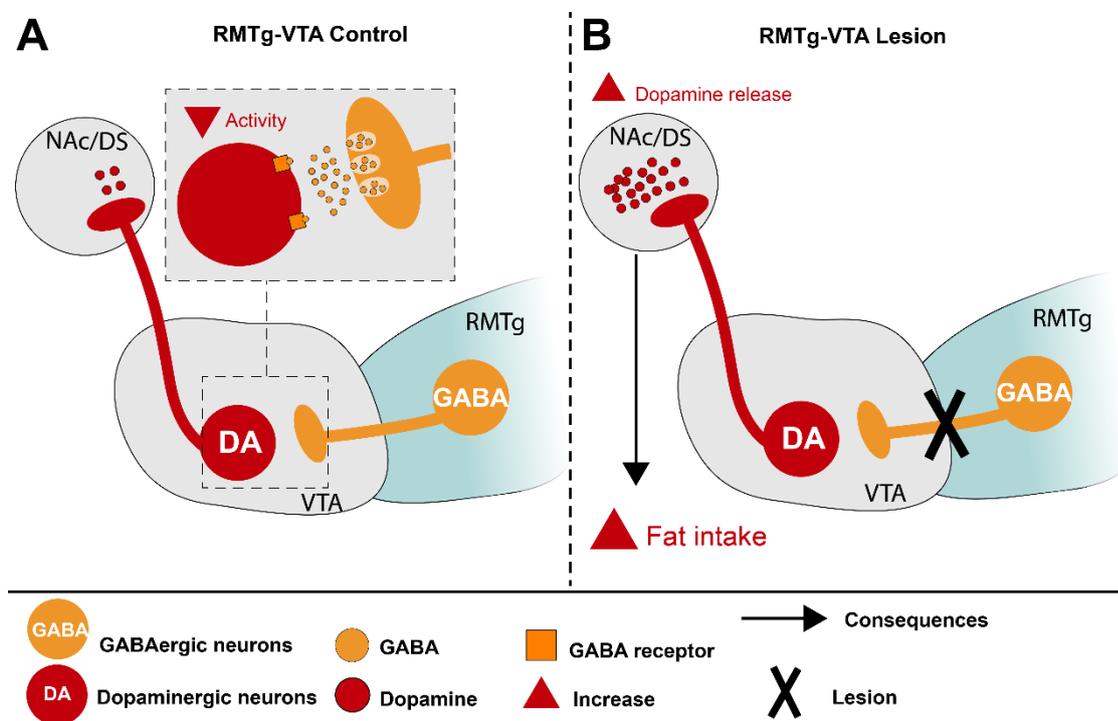


Figure 47 : La lésion de la voie RMTg-VTA conduit à une hyperdopaminergie et à une surconsommation de gras (Proposition de modèle)

A Les neurones GABAergiques du noyau tegmental rostromédian (RMTg) inhibent toniquement les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et limitent la libération de dopamine dans le nucleus accumbens (NAc) et le striatum dorsal (DS). **B** La lésion de la voie RMTg-VTA conduit à une levée de l'inhibition sur les neurones dopaminergiques, provoquant une libération continue et importante de dopamine dans le NAc et DS, ce qui entraîne une augmentation de la consommation de gras.

II-C : Rôle de l'ECS dans la voie RMTg-VTA

L'étude de Melis *et al.* est la première à montrer qu'une accentuation du tonus de l'ECS conduit à une préférence innée à l'alcool par une désinhibition plus importante des neurones dopaminergiques (Melis *et al.*, 2014). Potentiellement, une augmentation d'expression de l'ECS dans le RMTg pourrait aussi contribuer à moduler la consommation d'autres récompenses comme la consommation de gras. La réduction de l'expression de CB1 observée dans le RMTg fait écho à ce qui est observé dans le NAc où la consommation de gras conduit à une diminution de l'expression de ce récepteur (**Article 2**, Harrold *et al.*, 2002 ; Blanco-Gandia *et al.*, 2017b, Bello *et al.*, 2012). Cela pourrait avoir pour conséquence de réduire l'excitabilité du circuit de la récompense et limiter la surconsommation de gras (Anastasio *et al.*, 2019). Nous avons également pu mettre en évidence une surexpression des gènes codant pour CB2 et DAGL α dans le RMTg.

Récemment, une étude a montré que les souris KO pour le récepteur CB2 sont résistantes à « l'addiction à la nourriture » et au contraire la surexpression de CB2 rend les souris plus vulnérables (Garcia-Blanco *et al.*, 2023). Nous supposons qu'une exposition chronique au gras conduit à une augmentation de CB2 dans le RMTg qui favoriserait la perte de contrôle face à cet aliment. Une explication plausible à cette surexpression de CB2 peut être que la surconsommation de gras conduise à une neuroinflammation. En effet, le récepteur CB2 est fortement exprimé dans les cellules microgliales (Cabral *et al.*, 2008) et les souris KO pour CB2 présentent une neuroinflammation et une augmentation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Amenta *et al.*, 2014 ; Engel *et al.*, 2010 ; Komorowska-Müller & Schmöle, 2020). De plus, une exposition à un régime riche en gras conduit au développement d'une neuroinflammation dans le NAc, le cortex cérébral, le HPC et l'hypothalamus (Cavaliere *et al.*, 2019 ; Hersey *et al.*, 2021 ; Guillemot-Legrès *et al.*, 2016 ; Decarie-Spain *et al.*, 2018 ; Pistell *et al.*, 2010). Il est alors envisageable que la surconsommation de gras puisse conduire à une neuroinflammation dans le RMTg et une augmentation de l'expression de CB2 à la fois dans les neurones et les cellules microgliales.

Discussion générale

Une étude clinique a montré que des patients obèses ont un niveau d'expression de DAGL α plus important dans le tissu adipeux blanc (Engeli *et al.*, 2014). Sachant que dans nos modèles d'HB et d'obésité, la masse de tissus adipeux blanc est plus importante comparée à celle de rats exposés à un régime standard, nous pouvons envisager que l'HB et l'obésité conduisent à une surexpression de l'enzyme DAGL α dans des structures du cerveau comme le RMTg. Cette augmentation persisterait dans l'HB mais s'atténuerait dans l'obésité.

L'ensemble de nos données permet de proposer le modèle suivant : La consommation de gras conduirait à une augmentation du tonus de l'ECS dans le RMTg par augmentation de l'expression de CB2 et de DAGL α . Cette augmentation de l'expression de l'ECS conduirait à une désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA et une hyperdopaminergie ce qui favoriserait la surconsommation de gras. Dans notre modèle d'obésité, la consommation de gras ayant lieu de manière « progressive » suite à l'accès *ad libitum* pendant les six semaines, des mécanismes de neuroadaptations pourraient se mettre en place afin de réduire l'activité de l'ECS, notamment par le biais d'une réduction de CB1. La diminution du tonus de l'ECS dans le NAc et le RMTg aurait pour but de limiter le comportement de prise alimentaire excessif dans l'obésité. Cependant, cette réduction du tonus conduirait à une désensibilisation du circuit de la récompense et à une surconsommation de nourriture palatable, comme stipulé par la théorie du RDS (**Fig.48**).

Discussion générale

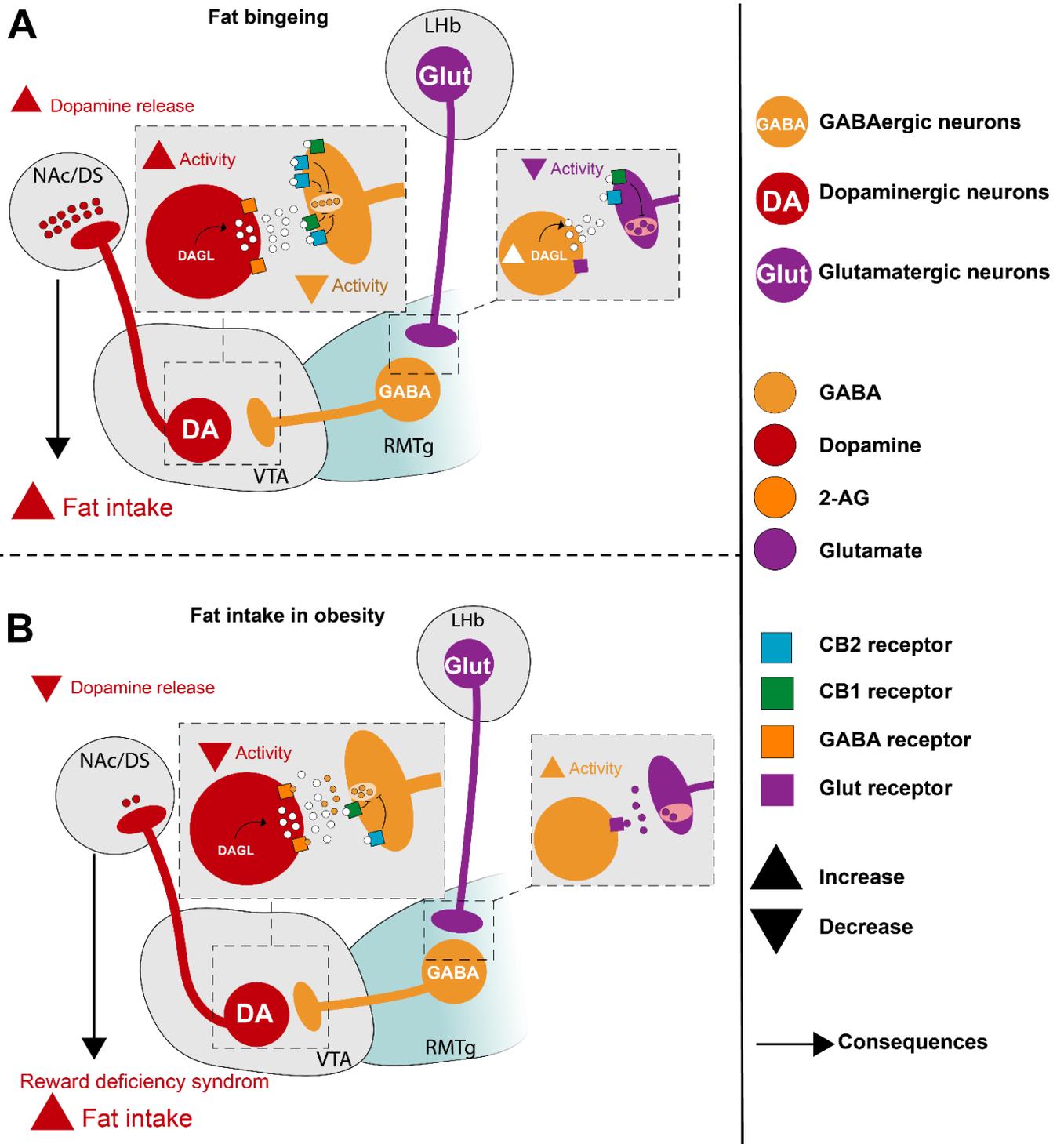


Figure 48 : Le système endocannabinoïde dans le RMTg module différemment la consommation de gras dans l'hyperphagie boulimique et l'obésité (Proposition de modèle)

A Dans l'hyperphagie boulimique, la surconsommation de gras conduit à une augmentation de l'expression du récepteur CB2 sur les terminaisons du noyau tegmental rostromédian (RMTg) ainsi qu'une augmentation de DAGL α dans les neurones du RMTg. L'augmentation de DAGL α augmente la synthèse de 2-AG qui inhibe l'activation du RMTg par l'habénula latérale (LHb). L'augmentation d'expression de CB2 sur les terminaisons conduit à une inhibition de la libération de GABA dans la voie RMTg-VTA. Ces deux mécanismes conduisent à une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA qui provoque une libération excessive de dopamine dans le Nucleus accumbens (NAc) et le striatum dorsal (DS). L'hyperdopaminergie conduit ensuite à une augmentation de la consommation de gras suite à une forte activation des structures effectrices NAc/DS. **B** Dans l'obésité, la consommation de gras conduit à des modifications similaires à celles observées dans l'HB mais la présence prolongée de 2-AG conduit à une diminution de l'expression de CB1 et CB2. Cette diminution de l'expression de l'ECS conduit à une libération plus importante de GABA par le RMTg et une inhibition des neurones dopaminergiques. L'hypoactivité du circuit de la récompense obtenue pourrait illustrer une désensibilisation du système face aux aliments palatables, conduisant à une surconsommation de gras.

II-D : Perspectives sur l'étude de la voie RMTg-VTA

II-D-1 : Études futures sur la voie RMTg-VTA

Les résultats obtenus indiquent que la lésion de la voie RMTg-VTA peut conduire à une hyperactivité du circuit de la récompense qui se traduirait par la surconsommation de gras. Ces résultats sont en accord avec les travaux de De La Cruz *et al.*, et Espitia-Bautista & Escobar qui ont montré que la surconsommation de gras conduit à une activation plus importante du circuit de la récompense que la consommation de saccharose (De la Cruz *et al.*, 2015 ; Espitia-Bautista & Escobar, 2021). Il peut être envisagé que cette hyperactivation pourrait à son tour favoriser le comportement d'hyperphagie alimentaire sur le gras et ainsi entretenir une prise alimentaire pathologique. Toutefois, dans nos expériences, nous n'avons pas mesuré l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA ou essayé de quantifier la libération de dopamine dans le NAc ou le DS afin d'étayer notre hypothèse. Une nouvelle technique innovante de photométrie de fibre (Mohammad *et al.*, 2022) pourrait servir à vérifier notre hypothèse. En effet, cette technique *in vivo* consiste à mesurer l'activité

Discussion générale

d'une population de neurones d'une structure en mesurant les variations de concentration de calcium, et pourrait être utilisée afin d'étudier l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA à différentes périodes du régime fCHFHS. Ce protocole expérimental nécessite une chirurgie supplémentaire lourde avec l'injection d'un autre virus qui permet la détection de calcium et la mise en place d'un implant dans la VTA pour y placer une fibre optique. La réalisation de cette expérience permettrait d'attester ou non d'une hyperactivité des neurones dopaminergiques par notre lésion.

Il serait également intéressant de poursuivre l'étude de la fonction de cette voie en utilisant non pas une lésion mais une activation de la voie RMTg-VTA grâce à des outils pharmacogénétiques avec la technique du DREADD (Dornellas *et al.*, 2021 ; Nentwig *et al.*, 2022). Cette technique nous permettrait de voir si l'activation de cette voie conduit à l'opposé de ce qui est observé dans la lésion. Cependant cette technique est difficilement réalisable avec notre protocole d'accès continu pendant six semaines puisqu'elle nécessite une administration chronique de CNO (Clozapine-N-Oxyde), un ligand des récepteurs DREADD. Cette administration chronique ne peut pas être réalisée par injection en i.p en raison de la faible durée d'effet du CNO (2 heures, Sharma & Pienaar, 2018 ; Jendryka *et al.*, 2019). L'alternative à l'injection i.p répétée consiste à solubiliser le CNO dans l'eau de boisson (Milosavljevic *et al.*, 2016 ; Jain *et al.*, 2013) ou bien à implanter des pompes osmotiques permettant une délivrance progressive de CNO (Donato *et al.*, 2017). Le principal problème de l'administration de CNO dans l'eau de boisson est que la molécule donne un goût amer, et potentiellement aversif et pourrait affecter les résultats observés sur la prise alimentaire. En outre, l'implantation de pompes osmotiques pour une délivrance chronique de CNO nécessite une chirurgie supplémentaire chez les rats avec des risques plus importants d'infections suite à l'implantation d'un corps étranger et nécessite un temps de récupération supplémentaire. De nouveaux ligands tels que la Deschloroclozapine (DCZ) (Nagai *et al.*, 2020) où le composé 21 (Jendryka *et al.*, 2019) ont été récemment proposés et il serait intéressant de vérifier s'ils sont plus appropriés pour notre étude.

De ce fait, il serait plus approprié d'utiliser une approche pharmacogénétique dans le contexte d'un accès intermittent où l'accès au régime fCHFHS a lieu pendant une période bien définie. Ces expériences permettront de mieux comprendre l'effet de la lésion sur l'activité des neurones dopaminergiques mais également d'avoir des

informations sur la modulation de la consommation d'aliments palatables dans un modèle d'HB par cette voie.

II-D-1 : Futures études sur l'ECS

Nos analyses sur l'ECS révèlent que son expression (au niveau des gènes) est différemment affectée dans l'obésité et l'HB, plus particulièrement au sein du RMTg où l'expression de l'ECS est augmentée dans un modèle d'HB et diminuée dans le modèle d'obésité. Ces différences indiquent la présence d'adaptations et potentiellement de mécanismes différents dans l'une et l'autre des pathologies qui participent à la perte de contrôle sur la prise alimentaire. Cependant, pour compléter la caractérisation de l'ECS, il nous est nécessaire de poursuivre nos expériences en réalisant un dosage des endocannabinoïdes endogènes dans les structures d'intérêt. Cette expérience est en cours de réalisation. En effet, le protocole a été réalisé sur une 3^e cohorte dans le but d'effectuer ces dosages. Cette expérience permettra de mieux comprendre si le tonus endogène est altéré par le type de consommation de nourriture palatable. En outre, il serait intéressant d'analyser l'expression des cannabinoïdes endogènes dans des structures afférentes au RMTg comme la LHb afin de déterminer si les modifications de l'expression de l'ECS peuvent s'étendre plus loin que le circuit de la récompense dans ces pathologies. De plus, le rôle de la LHb dans la prise alimentaire a été récemment mis en évidence par ses projections à la VTA, ces projections serviraient à moduler le comportement de prise alimentaire en situation de stress, contexte qui fait écho à ce qui est observé dans les TCAs (Ip *et al.*, 2023). De ce fait, il est envisageable que l'expression de l'ECS soit augmentée dans la LHb lors d'un protocole d'HB, ce qui provoquerait une diminution de l'activité des neurones projetant au RMTg.

Dans le RMTg, nous envisageons que l'augmentation de l'expression de CB2 lors de l'HB soit liée à un phénomène de neuroinflammation comme précédemment observé dans le NAc dans un protocole d'HB au saccharose chez le rat (Patkar *et al.*, 2021). Cependant, les études sur la neuroinflammation induite par un régime palatable utilisent des protocoles plus longs que les nôtres, allant de 10 semaines (Hersey *et al.*, 2021) à 21 semaines (Pistell *et al.*, 2010), il serait donc intéressant d'étudier d'autres gènes de la neuroinflammation tels que les gènes codant pour l'interféron gamma (IFN- γ) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α), marqueurs pro-inflammatoires augmentés dans le cerveau après un régime obésogène (Decarie-Spain *et al.*, 2018 ;

Cavalière *et al.*, 2019). Nous pourrions également vérifier si cette surexpression a lieu dans les neurones, la microglie ou les deux en séparant les populations cellulaires dans le RMTg par la technique de FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) afin de déterminer à quelle population de cellules la surexpression de CB2 est imputable (Alcalá-Vida *et al.*, 2021).

III : La voie RMTg-LH dans la prise alimentaire

III-A : Considérations techniques relatives à la lésion RMTg-LH

Contrairement à la lésion de la voie RMTg-VTA, la lésion de la voie RMTg-LH a conduit à un phénotype comportemental plus subtil sur la prise alimentaire. Une des explications relatives à ce phénotype plus discret peut être la présence d'une faible densité de neurones dans cette voie. Jusqu'à présent, aucune étude publiée sur le RMTg n'a établi de quantification du nombre de neurones présents dans la voie RMTg-LH, mais une étude de traçage antérograde (Kaufling *et al.*, 2010) indique que la densité de ces projections est faible comparée à la densité des projections du RMTg à la VTA. Cette observation est corroborée avec la quantification que nous avons réalisée qui indique que 173 ± 40 neurones sont présents dans la voie RMTg-LH contre 614 ± 91 dans la voie RMTg-VTA. Après la lésion, le nombre de neurones restant dans la voie RMTg-LH est de 74 ± 15 contre 168 ± 37 pour la lésion de la voie RMTg-VTA. Cela indique que peu de neurones du RMTg sont impliqués dans la voie RMTg-LH et que notre protocole de lésion projection-spécifique ne permet « que » de léser 99 neurones de cette voie contre 449 pour la voie RMTg-VTA. De ce fait, il est possible que trop peu de neurones aient été lésés dans la voie RMTg-LH pour conduire à un phénotype comportemental plus marqué. De plus, le lieu d'injection choisi pourrait être un facteur limitant dans nos observations, et nous discuterons ce point ci-dessous (**Cf III-C : Perspectives sur l'étude de la voie RMTg-LH**).

III-B : Rôle de cette voie dans la dévaluation de nourriture standard ?

Le rôle des neurones Orx dans la prise alimentaire fait encore débat. Il a été montré que ces neurones sont impliqués dans l'induction de la prise alimentaire dans un contexte de restriction alimentaire (Vialou *et al.*, 2011 ; Pankevich *et al.*, 2010 ;

Discussion générale

Teegala *et al.*, 2023), mais cette fonction semble surtout liée à l'éveil comportemental. Notamment, des souris avec une ablation des neurones Orx ne présentent plus d'anticipation motrice causée par une privation alimentaire (Yamanaka *et al.*, 2003), ce qui montre que ces neurones intégreraient les signaux homéostatiques de faim/satiété afin d'induire une activation motrice favorisant la prise alimentaire. Cette fonction pourrait expliquer pourquoi on observe une hyperactivité motrice seulement après une longue période de sevrage au régime fCHFHS. Les neurones Orx du LH sont principalement activés dans l'état de veille et inhibés pendant la phase de sommeil REM et NREM et l'activation de ces neurones conduit à un éveil (Lee *et al.*, 2005, Adamantidis *et al.*, 2007). Une des plus récentes fonctions étudiées avec le RMTg est justement son implication dans les cycles du sommeil et une activation pharmacogénétique du RMTg conduit notamment à un temps de sommeil NREM plus important (Yang *et al.*, 2018). Cet effet passerait notamment via une inhibition des neurones GABAergiques et glutamatergiques du LH mais le rôle des projections sur les neurones Orx dans ce comportement reste à déterminer (Zhao *et al.*, 2022). De ce fait, il est possible que la lésion de la voie RMTg-LH concernant les neurones Orx provoque des altérations de l'état de vigilance ou de la régulation du cycle veille-sommeil, paramètres non mesurés dans notre étude. Il est également possible que la régulation de la prise alimentaire provienne de l'inhibition des neurones GABAergiques et glutamatergiques du LH par le RMTg. Une des seules études relatives au rôle du RMTg dans la prise alimentaire a mis en évidence la présence de projections des neurones GABA du LH vers le RMTg, et l'activité de ces synapses est partiellement réduite après une période de jeûne (Godfrey *et al.*, 2022). Il est envisageable qu'une connexion réciproque existe entre le RMTg et les neurones GABA du LH qui régulent la consommation de nourriture palatable (Nieh *et al.*, 2015 & 2016). En raison de la fonction de ces neurones, il est possible qu'une lésion de la voie RMTg-LH conduise à un désintérêt de la nourriture standard par rapport à la nourriture palatable comme observé dans les protocoles avec un accès à un régime riche en gras (Mazzone *et al.*, 2020), expliquant la réduction de la consommation de nourriture standard lors du réaccès. Le manque d'effets sur la consommation de nourriture palatable provient peut-être de la levée d'inhibition sur les neurones glutamatergiques du LH puisqu'on sait qu'une activation de ces neurones conduit à une inhibition du comportement de prise alimentaire (Chen *et al.*, 2020) même chez des souris en restriction (Jennings *et al.*, 2013), et pourrait aussi expliquer la diminution de la prise calorique observée pendant

Discussion générale

la phase nocturne (Cf Chapitre 2, II-C : La voie RMTg-LH dans la prise alimentaire). Nous proposons ainsi que la lésion de la voie RMTg-LH conduit à un effet mixte : la levée d'inhibition sur les neurones Orx du LH favorise la recherche de nourriture, illustrée par une hyperactivité motrice lors du sevrage, tandis que la désinhibition des neurones GABAergiques et glutamatergiques participe à un désintérêt de la nourriture standard pour la nourriture palatable, provoquant une réduction de la prise de nourriture standard lors du ré-accès (Fig.49).

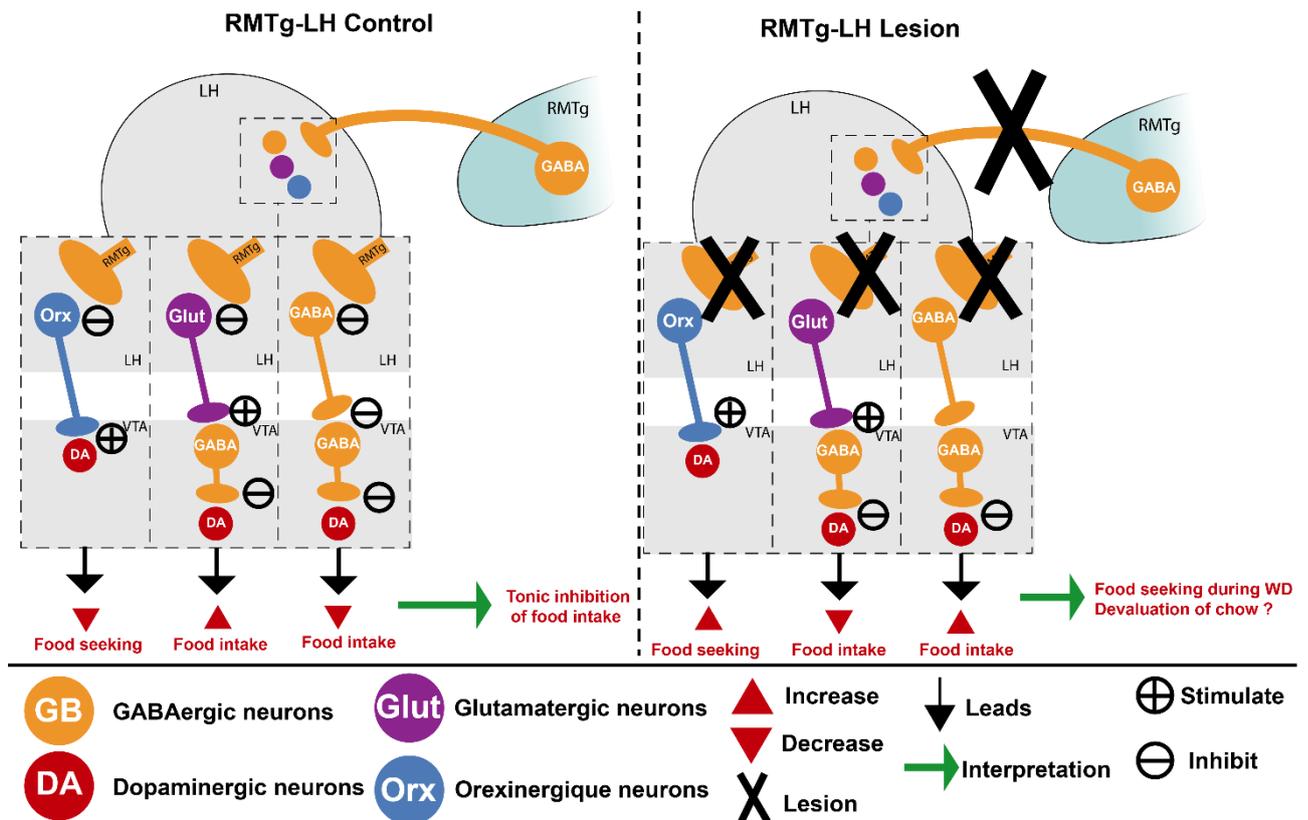


Figure 49 : Modulation de la prise alimentaire par la voie RMTg-LH (Proposition de modèle)

A Les neurones GABAergiques du noyau tegmental rostromédian (RMTg) projettent sur les neurones orexinergiques (Orx), glutamatergiques (Glut) et GABAergiques (GABA) de l'hypothalamus latéral (LH). Les projections inhibitrices sur les neurones Orx conduisent à une diminution de la recherche de nourriture en empêchant l'activation des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) tandis que l'inhibition du RMTg sur les neurones glutamatergiques et GABAergiques respectivement activent la prise alimentaire et inhibent la consommation de nourriture palatable également en modulant l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA. **B** La lésion de la voie RMTg-LH conduit à une levée d'inhibition sur ces trois populations de neurones. Elle favorise le comportement de recherche de nourriture après une longue période de sevrage de nourriture palatable et permettrait de favoriser un désintérêt pour la nourriture standard face à la nourriture palatable.

III-C : Perspectives sur l'étude de la voie RMTg-LH

L'étude sur la voie RMTg-LH a permis de mettre en évidence que les neurones du RMTg projettent sur les neurones Orx du LH. De ce fait, nous avons voulu établir une lésion spécifique de cette voie en injectant le virus exprimant la Cre rétrograde dans la région du LH où se trouvent les neurones Orx, soit à -3.15 mm du bregma. Cependant, cette zone est relativement petite par rapport à la taille du LH qui s'étend de -1.30mm à -4.50 mm du bregma chez le rat. Il serait donc intéressant de revoir notre protocole en changeant notre manière d'établir la lésion de la voie RMTg-LH, par exemple en réalisant plusieurs injections du virus eGFP-Cre sur l'axe antéro-postérieur du LH. De cette manière, nous pourrions établir une lésion plus importante de la voie RMTg-LH et il serait alors possible de mieux définir le rôle de cette voie dans la prise alimentaire. En outre, d'autres types cellulaires du LH sont impliqués dans la prise alimentaire, notamment les neurones GABA et glutamatergiques sur lesquels les neurones du RMTg semblent projeter (Zhao *et al.*, 2022). Nous avons voulu déterminer la densité des projections du RMTg aux neurones GABA et glutamatergiques du LH en utilisant une combinaison de traçage antérograde et un immunomarquage contre Vglut2 ou GAD65/67, mais le marquage très ponctiforme de Vglut2 et l'échec de l'IHC contre GAD65/67 n'a pas permis d'établir ne serait-ce qu'une visualisation des projections du RMTg aux neurones GABAergiques ou glutamatergiques du LH. Il serait nécessaire de reproduire cette expérience de traçage

avec une hybridation *in situ* contre l'ARN de Vglut2 ou de Gad pour réaliser cette caractérisation (approche RNAscope).

IV-Vers une addiction à la nourriture ?

IV-A : Le concept d'addiction à la nourriture chez l'Homme

L'association Américaine de Psychiatrie définit l'addiction comme « Une maladie cérébrale qui se manifeste par une utilisation compulsive d'une substance malgré les conséquences néfastes. Cette pathologie est caractérisée dans le DSM-5 comme étant un « trouble d'abus de substance » pour les dépendances aux drogues comme l'alcool, la cocaïne ou les opiacés et la seule addiction comportementale reconnue est celle aux jeux d'argent (DSM 5, 2013).

Le concept d'addiction à la nourriture a gagné en popularité au cours de ces 20 dernières années avec l'augmentation conséquente du nombre de publications scientifiques sur cette thématique. Une recherche sur pubmed montre qu'en 2002, 23 publications contiennent le terme « food addiction » contre 398 en 2022. Ce bond de popularité coïncide avec les premières études d'imagerie fonctionnelle qui ont montré une diminution de la disponibilité des récepteurs D2 dans le striatum de personnes dépendantes à la méthamphétamine mais également chez des patients obèses (Volkow *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2001). Ces études suggèrent la présence de mécanismes communs liés à la perte de contrôle sur la consommation de substances addictives et de nourriture. Une échelle de mesure de l'addiction à la nourriture a été développée afin de pouvoir définir des critères spécifiques de la pathologie, il s'agit de la « Yale food addiction Scale » (YFAS) (Gearhardt *et al.*, 2009, Schulte *et al.*, 2015), testée et validée chez des patients avant de subir une chirurgie bariatrique. Cette échelle correspond à un questionnaire basé sur les critères du DSM-IV et 5 du trouble de l'abus de substance (Schulte *et al.*, 2017, **Fig.50**), afin de définir si un individu présente un comportement addictif vis-à-vis de la nourriture, semblable à ce qui est observé dans l'abus de substance. L'individu est qualifié comme dépendant lorsqu'il répond à au moins 3 critères de la YFAS. Aujourd'hui cette échelle est utilisée dans des études chez l'Humain à large échelle et parfois même en clinique avant/après la chirurgie bariatrique pour évaluer les effets de l'opération sur une éventuelle

Discussion générale

récupération du contrôle de la prise alimentaire (Ivezaj *et al.*, 2017 ; Da Silva Junior *et al.*, 2021). Les études réalisées sur des populations de patients obèses avec cette échelle montrent que 25-30% des patients obèses peuvent être considérées comme dépendants à la nourriture (Clark *et al.*, 2019 ; Manzoni *et al.*, 2020 ; Koball *et al.*, 2021). Ceci montre que l'addiction à la nourriture constitue une pathologie à part entière, dissociable de l'obésité. Cependant, les mêmes mesures réalisées sur des patients atteints d'HB montrent que 42 à 92% de ces patients sont considérés comme dépendants à la nourriture (Carter *et al.* 2018, Linardon & Messer, 2019), suggérant que le phénotype d'addiction à la nourriture serait en réalité une forme sévère d'HB (Burrow *et al.*, 2017).

IN THE PAST 12 MONTHS:		Never	Less than monthly	Once a month	2-3 times a month	Once a week	2-3 times a week	4-6 times a week	Every Day
1.	I ate to the point where I felt physically ill	0	1	2	3	4	5	6	7
2.	I spent a lot of time feeling sluggish or tired from overeating.	0	1	2	3	4	5	6	7
3.	I avoided work, school or social activities because I was afraid I would overeat there.	0	1	2	3	4	5	6	7
4.	If I had emotional problems because I hadn't eaten certain foods, I would eat those foods to feel better.	0	1	2	3	4	5	6	7
5.	My eating behavior caused me a lot of distress.	0	1	2	3	4	5	6	7
6.	I had significant problems in my life because of food and eating. These may have been problems with my daily routine, work, school, friends, family, or health.	0	1	2	3	4	5	6	7
7.	My overeating got in the way of me taking care of my family or doing household chores.	0	1	2	3	4	5	6	7
8.	I kept eating in the same way even though my eating caused emotional problems.	0	1	2	3	4	5	6	7
9.	Eating the same amount of food did not give me as much enjoyment as it used to.	0	1	2	3	4	5	6	7
10.	I had such strong urges to eat certain foods that I couldn't think of anything else.	0	1	2	3	4	5	6	7
11.	I tried and failed to cut down on or stop eating certain foods.	0	1	2	3	4	5	6	7
12.	I was so distracted by eating that I could have been hurt (e.g., when driving a car, crossing the street, operating machinery).	0	1	2	3	4	5	6	7
13.	My friends or family were worried about how much I overate.	0	1	2	3	4	5	6	7

Figure 50 : Questionnaires de la « Yale food addiction scale »

Cette échelle est basée sur les critères du DSM-5 pour mesurer l'addiction à la nourriture. Extrait de Schulte *et al.*, 2015.

IV-B : Modèles précliniques d'addiction à la nourriture

Ces trois dernières années, quelques études précliniques ont été publiées avec des modèles rongeurs d'addiction à la nourriture (Martin-Garcia *et al.*, 2020 ; Domingo-Rodriguez *et al.*, 2020 ; Navandar *et al.*, 2021 ; Wei *et al.*, 2021 ; Garcia-Blanco *et al.*, 2023). Dans ces études, les animaux sont soumis à un protocole opérant pour obtenir de la nourriture palatable comme des croquettes au chocolat (Martin-Garcia *et al.*, 2020 ; Domingo-Rodriguez *et al.*, 2020 ; Navandar *et al.*, 2021 ; Ruiz de Azua *et al.*, 2021, Garcia-Blanco *et al.*, 2023) ou une solution de saccharose 5% (w/v) (Wei *et al.*, 2021). Au terme d'un protocole opérant long (jusqu'à 118 sessions), les animaux sont évalués sur trois critères pour définir la dépendance à la nourriture : 1). la persistance à appuyer sur un levier pour obtenir les croquettes de chocolat pendant une période de « time out » pendant laquelle les croquettes sont indisponibles, 2) la motivation à obtenir des croquettes de chocolats, estimée par un « breaking point » (nombre d'appuis sur le levier avant l'abandon) élevé, 3) la compulsivité, caractérisée par la poursuite de la recherche de croquettes malgré la présence d'un stimulus aversif comme un choc électrique. Un animal répondant à au moins 2 des 3 critères est défini comme dépendant à la nourriture. Ces protocoles ont permis d'étudier la neurobiologie de l'addiction à la nourriture en identifiant par exemple la voie mPFC-NAC comme contrôlant la résilience/vulnérabilité à l'addiction à la nourriture (Domingo-Rodriguez *et al.*, 2020). Une de ces études a permis d'identifier des marqueurs, notamment des micro-ARNs, associés à la vulnérabilité à l'addiction à la nourriture chez la souris et chez l'Humain (Garcia-Blanco *et al.*, 2021). De plus, ces études ont également pu mettre en évidence l'implication de l'ECS dans le phénotype d'addiction à la nourriture en montrant que des souris KO pour CB1 dans les neurones glutamatergiques (Ruiz de Azua *et al.*, 2021) et KO constitutif pour CB2 sont résistantes à l'addiction à la nourriture (Garcia-Blanco *et al.*, 2023). Cependant, ces études ne permettent pas d'identifier avec précision la nourriture ou les macronutriments addictifs, puisque les croquettes de chocolat utilisées dans ces protocoles sont composées à la fois de gras (12%) et de saccharose (50%). Cette incapacité de distinguer un aliment comme étant addictif constitue probablement l'une des raisons pour lesquelles l'addiction à la nourriture n'est pas reconnue.

Une étude réalisée sur la boulimie nerveuse montre que certains types d'aliments sont plus sujets que d'autres à entraîner une hyperphagie. Cette étude sur les aliments

Discussion générale

« addictifs », où il a été demandé à des patients répondant positivement à la YFAS d'évaluer quels aliments ils jugeaient comme ayant un fort potentiel addictif (Schulte *et al.*, 2015), montre que les aliments les plus addictifs sont les aliments transformés avec 30% de la contenance en lipides et carbohydrates (pizza, chocolat, chips). Ces données suggèrent que le potentiel addictif d'un aliment repose sur sa contenance en gras et sucre mais posent alors la question suivante : la « dépendance » aux aliments dépend-elle du sucre ? Du gras ? Ou de la combinaison des deux macronutriments ?

IV-B-1 : La dissociation des effets du gras et du sucre dans nos résultats

Lors des expériences réalisées dans cette thèse, nous n'avons pas évalué si les rats répondent aux critères de l'addiction à la nourriture. Toutefois, nous avons utilisé un protocole permettant de proposer un accès au gras et au saccharose en plus de la nourriture standard. Ceci nous a permis de constater que les modifications de l'expression de l'ECS dépendent fortement du type de macronutriment consommé en majorité. En effet, l'analyse moléculaire a mis en évidence une diminution de l'expression du récepteur CB1 dans le DS et le NAc ainsi qu'une réduction de l'expression de DAGL α dans cette dernière structure. Ces résultats s'alignent sur ceux d'études où une réduction de l'expression de CB1 est visible dans le NAc après un protocole d'HB sur du gras (Satta *et al.*, 2018 ; Bello *et al.*, 2012 ; Blanco-Gandia *et al.*, 2017). Par ailleurs, bien que nous n'ayons pas (encore) mesuré les niveaux de cannabinoïdes endogènes dans les structures étudiées, la présence d'une corrélation négative entre l'expression de NAPE dans le DS et la prise calorique totale en gras suggère que la consommation de gras conduit à une diminution de la concentration d'AEA chez les rats forts consommateurs de gras, comme observé précédemment (Satta *et al.*, 2018).

Cependant, ces résultats contredisent notre étude avec un modèle d'HB au saccharose, où nous avons observé une augmentation de l'expression de CB1 dans le NAc (De Sa Nogueira *et al.*, 2021). Nous pouvons imaginer que l'augmentation de l'expression de CB1 ne soit pas liée à la consommation intermittente de saccharose mais peut-être à la nature même du protocole pour lequel une privation alimentaire de 12h était proposée. Néanmoins, une autre étude montre également qu'un accès intermittent à une solution de saccharose sans restriction alimentaire conduit à une augmentation de l'expression de CB1 dans le NAc (Soto *et al.*, 2014). De plus, une

Discussion générale

exposition *ad libitum* à une solution riche en saccharose ou en fructose conduit à une surexpression de CB1 dans l'HPC chez des rats (Lindqvist *et al.*, 2008). Ainsi, il semblerait que ce soit spécifiquement la consommation de saccharose qui conduise à une augmentation de l'expression de CB1.

On constate que dans les deux protocoles discutés (De Sa Nogueira *et al.*, 2021, Sotto *et al.*, 2014), l'accès intermittent au saccharose ne conduit pas à une prise alimentaire excessive. Or, dans notre protocole, l'accès intermittent au régime fCHFHS conduit à une prise calorique plus importante, probablement à cause de la consommation excessive de gras. Cet effet a été observé dans les trois cohortes. De ce fait, il peut être envisagé que ce soit l'excès calorique qui conduise aux adaptations de l'ECS.

Le NAc a pour fonction, entre autres, d'encoder la valeur hédonique et l'appétence associée au saccharose (Peciña & Berridge, 2000). Cet effet passerait par le récepteur CB1 puisqu'une administration de THC (i.p 1mg/kg), agoniste CB1 conduit à une augmentation de la libération de dopamine dans l'écorce du NAc qui conduit à une augmentation de la réaction hédonique au saccharose (De Luca *et al.*, 2011). De ce fait, il est envisageable qu'une série de cycles d'accès et de sevrage au saccharose observé dans un modèle intermittent (De Sa Nogueira *et al.*, 2021 ; Awad *et al.*, 2020) conduise à un stress suite à l'imprévisibilité de la présence du saccharose et ce stress pourrait participer à augmenter l'expression de CB1R, ce qui favoriserait une consommation compulsive. Puisque les projections glutamatergiques du mPFC vers le NAc ont un rôle inhibiteur sur la prise alimentaire, notamment dans un modèle d'HB (Anastasio *et al.*, 2019 ; Bourdy and Befort, 2023), nous pouvons envisager que les consommations de saccharose et de gras modulent cette projection. En effet, le saccharose pourrait conduire à une augmentation du tonus ECS qui favoriserait la surconsommation de ce macronutriment tandis que la consommation de gras, plus dense d'un point de vue calorique, entraînerait une diminution de l'expression de ce récepteur afin de limiter la prise alimentaire. Cependant, une expérience menée au laboratoire, proposant aux rats un accès intermittent au saccharose uniquement (2h, trois jours par semaine) n'a pas conduit à une augmentation de l'expression de CB1 dans le NAc (Hildenbrand *et al.*, non publié), ce qui indique que les mécanismes sous-jacents à la consommation de gras et de sucre restent encore complexes et nécessitent des études plus poussées.

Discussion générale

Afin d'aller plus loin dans cette analyse de l'effet gras vs sucre sur l'ECS, nous avons procédé à une analyse de clusters sur les animaux des groupes CA et IA afin de les séparer selon leur profil de consommation. Un type d'analyse similaire a été réalisé dans une étude publiée par notre équipe (Bourdy *et al.*, 2021), montrant que les rats d'un cluster « High sucrose consumption » ont une expression plus importante de CB2 et de GPR55 dans le NAc contrairement à des rats du cluster « High fat consumption », qui présentent une régulation inverse. Cette analyse a permis de distinguer trois groupes de rats : un groupe « low fat/low sucrose », un groupe « High sucrose » et un groupe « High fat ». Malgré le faible effectif obtenu dans ces groupes, la nouvelle analyse des données d'expression de gènes de l'ECS après la séparation en clusters permet de montrer que les rats « forts consommateurs de saccharose » présentent une expression augmentée de NAPE dans le DS et une tendance à l'augmentation de CB2 et DAGL α dans le RMTg. L'augmentation de NAPE chez les forts consommateurs de saccharose suggère une augmentation du taux d'AEA dans le DS, ce qui contraste avec une précédente étude où le taux d'AEA dans le DS est diminué après un protocole d'accès intermittent au gras (Satta *et al.*, 2018). De nouveau, cette différence peut être liée à la différence de consommation gras/sucre. Le DS est surtout connu dans son rôle vis-à-vis de la facilitation/inhibition des comportements moteurs et la formation des habitudes (Bromberg-Martin *et al.*, 2010). Il est montré qu'une lésion bilatérale du DS chez des rats conduit à une diminution de la réactivité des rats à effectuer une tâche apprise afin d'obtenir une solution de saccharose 10% (Jurado-Paras *et al.*, 2020), soulignant l'implication de cette structure dans les comportements de routine. Ainsi, il est possible que la consommation de gras et de sucre agissent différemment sur la mise en place de ces comportements « habituels » par l'intermédiaire de l'ECS.

Par ailleurs, une exposition à un régime riche en saccharose (76% de la densité calorique) conduit à une augmentation de la densité des récepteurs D2 dans le striatum tandis qu'un accès intermittent à un régime riche en gras (86% de la densité calorique) conduit à une diminution de l'affinité des récepteurs D2 dans le DS (Rospond *et al.*, 2019). Nous pouvons alors envisager que la consommation de saccharose 10%, conduise à une activation des neurones dopaminergiques projetant vers le DS, notamment sur les neurones D2 qui synthétisent et libèrent l'AEA (Giuffrida *et al.*, 1999). La signalisation rétrograde de l'AEA pourrait ainsi diminuer le

Discussion générale

comportement de recherche de saccharose en inhibant l'activité des afférences dopaminergiques, cette diminution pouvant être un mécanisme mis en place pour tenter de rétablir un contrôle sur la prise alimentaire. Au contraire, la consommation de gras pourrait conduire à une diminution du tonus de l'ECS et de l'expression des récepteurs D2 dans le DS, favorisant le développement de « comportements habituels » relatifs à la consommation de gras. Cette hypothèse est renforcée par une étude récente qui a montré que l'administration intracarotidienne de triglycérides favorise la préférence de place conditionnée à de la nourriture riche en gras et en sucre. Cet effet passerait une inhibition des récepteurs D2 via l'action des triglycérides sur la lipoprotéine lipase qui va inhiber la voie de signalisation Gi des récepteurs (Berland *et al.*, 2020). Cette étude montre également qu'une administration prolongée (6 heures) de triglycérides conduit à une inhibition de la transmission dopaminergique à long terme, mécanisme envisagé comme un moyen de limiter la prise alimentaire en inhibant l'excitabilité du circuit de la récompense.

IV-B-2 : La combinaison gras/sucre: le substrat de l'addiction à la nourriture ?

Puisque l'essentiel de la nourriture qualifiée comme addictive est riche en gras et en sucre (Schulte *et al.*, 2015), il est possible que ce soit la combinaison de ces deux macronutriments qui conduise à une perte de contrôle sur la prise alimentaire. En effet, la consommation de ce type d'aliments conduit à des mécanismes de plasticité similaires à ce qui est observé suite à la prise de drogues. Cela a été montré chez l'Humain avec la diminution de densité de récepteurs D2 chez des patients obèses et chez des patients dépendants à la méthamphétamine (Volkow *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2001). De plus, un accès intermittent au gras et au sucre conduit à une hyperphagie chez des rats plus importante qu'un accès intermittent uniquement au gras ou au sucre (Tenk & Felfeli, 2017). De plus, une étude réalisée chez l'Homme montre que les individus sont plus enclins à dépenser leur argent pour des aliments riches en gras et en sucre, aliments qui activent plus le striatum que des aliments uniquement riches en gras ou en sucre (DiFeliceantonio *et al.*, 2018).

Les mécanismes sous-jacents qui peuvent expliquer cette surconsommation restent encore flous, mais des rats exposés à un régime riche en gras présentent une motivation accrue pour obtenir une solution de saccharose 5% dans un protocole opérant (Figlewicz *et al.*, 2013). La consommation de gras dans un régime « free

choice high fat » (fcHF) est plus importante après une consommation de saccharose et cet effet est reproduit avec une infusion de DAMGO (0.3 µg/µL) dans le NAc, ce qui suggère que la consommation de saccharose conduit à une induction de l'expression de peptides opioïdes dans le NAc, stimulant la consommation de gras (Koekkoek *et al.*, 2021). Il avait déjà été montré que la consommation de saccharose conduit à une libération d'opioïdes endogènes dans le NAc (Colantuoni *et al.*, 2002). Dans cette étude, il avait notamment été montré qu'une administration de naloxone ou une déprivation alimentaire prolongée après un accès intermittent au saccharose conduit à des manifestations de sevrage physique semblable au sevrage opiacé, ce qui n'est pas observé lors d'un accès intermittent au gras (Borcasly *et al.*, 2011). Récemment, il a été montré par une analyse en microscopie deux-photons que les neurones glutamatergiques du LH sont inhibés par la consommation d'une solution de saccharose mais activés par la consommation d'une solution de sucralose, un édulcorant non calorique, ce qui conférerait à ces neurones une capacité de détection de l'aspect calorique des aliments. Cette capacité est abolie après une exposition à un régime riche en gras, pouvant ainsi participer à une perte du contrôle de la prise alimentaire homéostatique suite à la combinaison des deux macronutriments (Koekkoek *et al.*, 2022).

IV-B-3 : Perspectives sur l'addiction au gras ou au sucre

De façon surprenante, très peu d'études réalisées ces dernières décennies se sont intéressées à comparer l'effet que pouvait avoir le gras et le sucre sur le circuit de la récompense, la plupart des études utilisent soit des régimes riches en gras, soit des régimes riches en sucre. En outre, la plupart des régimes riches en gras utilisés contiennent une proportion de saccharose non négligeable qui rend difficile la distinction entre les effets du gras et du sucre sur le circuit de la récompense. Cependant, les travaux publiés s'intéressant à cette comparaison montrent que la consommation de l'un ou l'autre des macronutriments conduit à des neuroadaptations distinctes dans le circuit de la récompense. Cela va dans le sens de nos résultats après analyse en clusters concernant les altérations de l'ECS, qui diffèrent selon le type de macronutriment consommé. Il serait nécessaire de poursuivre cette étude en réalisant une analyse plus complète afin d'évaluer les effets différentiels du gras et du sucre. Pour cela, il nous faudrait réaliser une autre expérience avec des groupes supplémentaires ayant accès à un régime fcHFHS, fcHF, et fcHS puis analyser si la

Discussion générale

surconsommation de gras, de sucre, ou la combinaison des deux conduit à des adaptations de l'ECS qui vont dans le même sens que notre analyse de clusters. Il serait également intéressant de poursuivre cette analyse de l'ECS en regardant si nos observations avec l'expression des gènes de l'ECR se manifestent également au niveau protéique. En outre, il serait également judicieux de s'intéresser plus en détail aux modulations de l'ECS dans la périphérie dans ces différents types de régimes (gras vs sucre, continu vs intermittent). En effet, de récents travaux ont mis en évidence que l'expression de l'ECS au niveau du système nerveux entérique et dans le tractus digestifs a un rôle crucial dans la régulation de la prise alimentaire (Berland *et al.*, 2020 ; Argueta & DiPatrizio, 2017). Une caractérisation du profil périphérique et central des modifications de l'ECS permettront de mieux comprendre le rôle de ce système dans la consommation des aliments palatables et dans les pathologies de l'obésité et de l'HB. Également, nous pourrions regarder et comparer les altérations du système dopaminergique dans ces régimes afin de mieux comprendre l'impact de la consommation de saccharose ou de gras sur le circuit de la récompense. Il serait intéressant de mettre en place un protocole opérant d'addiction à la nourriture avec une récompense riche en gras, riche en sucre ou riche en gras et sucre afin de vérifier quel type d'aliment palatable est le plus à même de conduire à une dépendance. Ces études permettraient de répondre à une des questions majeures relatives à l'addiction à la nourriture : quel type d'aliment conduit à une addiction ?

V : Conclusion sur la place du RMTg dans le circuit de la prise alimentaire

Les résultats obtenus au cours de cette thèse pointent le RMTg comme une nouvelle structure ayant un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire en modulant la consommation de gras et de nourriture standard par les projections vers la VTA et le LH (**Fig.51**). Nos analyses sur la voie RMTg-VTA et RMTg-LH indiquent l'existence de réseaux neuronaux complexes sous-tendant la consommation excessive de certains types d'aliments, réseaux qui devront être finement caractérisés grâce à l'apport des nouvelles techniques en neurosciences (optogénétique, traçage viral, photométrie de fibre, pharmacogénétique). De manière très intéressante, certaines de ces structures plus récemment mises en avant projettent vers le RMTg : c'est le cas de la LHb, du PBN et du DR. Cependant, la connaissance actuelle sur la

Discussion générale

fonction des afférences du RMTg reste limitée et la plupart des études concernent leurs fonctions dans les comportement d'aversion (Li *et al.*, 2019a&b ; Laurent *et al.*, 2017). Toutefois, une étude récente a pu mettre en évidence que les projections du PBN vers la CeA favorisaient le phénotype d'anorexie (Alhadeff *et al.*, 2017). Ainsi les projections PBN-RMTg pourraient potentiellement avoir la même fonction que la voie PBN-CeA en limitant la prise alimentaire. De même, les projections GABAergiques du LH vers le RMTg moduleraient le comportement de recherche de nourriture (Godfrey *et al.*, 2022) et les projections LH-LHb et DR-VTA ont un rôle inhibiteur du comportement d'HB (Stamatakis *et al.*, 2016, Xu *et al.*, 2017). De plus, il est envisagé que la projection LH-LHb module ce comportement par l'activation d'une structure GABAergique intermédiaire à la VTA qui pourrait être le RMTg.

Il est ainsi possible que les projections RMTg-VTA ou RMTg-LH ne constituent que la finalité de vastes circuits neuronaux qui mettent en jeu divers systèmes de neurotransmission, et que la régulation fine de la prise alimentaire par le RMTg provienne de ces afférences encore non caractérisés d'un point de vue fonctionnel. L'étude de ces circuits pourrait permettre d'identifier de nouveaux réseaux impliquant le RMTg dans la régulation de la prise alimentaire. Il est envisageable que ces réseaux jouent un rôle dans la perte de contrôle sur la prise alimentaire, contribuant au développement de pathologies comme l'HB, l'obésité, et l'addiction à la nourriture.

Discussion générale

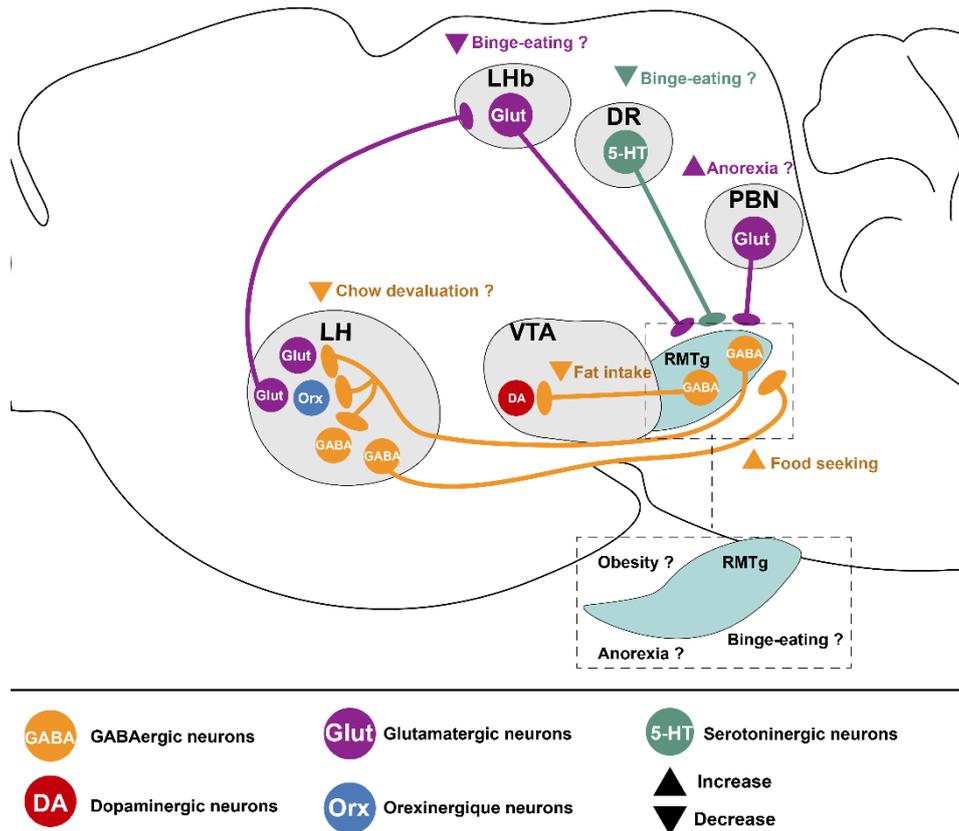


Figure 51 : Circuits neuronaux centrés sur le RMTg et impliqués dans la prise alimentaire. Proposition de modèle

Les projections GABAergiques du noyau tegmental rostromédian (RMTg) sur les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) inhibent la consommation de gras tandis que les projections sur les neurones GABAergiques, glutamatergiques et orexinergiques de l'hypothalamus latéral (LH) peuvent inhiber la dévaluation de nourriture standard par rapport à la nourriture palatable. Les neurones glutamatergiques du LH peuvent également activer les neurones glutamatergiques de l'habenula latérale (LHb) qui activent les neurones du RMTg pour limiter le phénotype d'HB (Stamatakis *et al.*, 2016). De la même manière, les projections sérotoninergiques du DR vers le RMTg peuvent également moduler le phénotype d'hyperphagie boulimique (Xu *et al.*, 2017) et il est envisageable que les projections du noyau parabrachial vers le RMTg favorisent le phénotype de type anorexie (Alhadeff *et al.*, 2017).

REFERENCES



1. Abbott, K. N., Arnott, C. K., Westbrook, R. F. & Tran, D. M. D. The effect of high fat, high sugar, and combined high fat-high sugar diets on spatial learning and memory in rodents: A meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **107**, 399–421 (2019).
2. Abush, H. & Akirav, I. Short- and Long-Term Cognitive Effects of Chronic Cannabinoids Administration in Late-Adolescence Rats. *PLoS ONE* **7**, (2012).
3. Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K. & De Lecea, L. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* **450**, 420–424 (2007).
4. Adamczyk, P., Go, A., Mccreary, A. C., Filip, M. & Przegaliński, E. ACTIVATION OF ENDOCANNABINOID TRANSMISSION INDUCES ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECTS IN RATS.
5. Ainslie, D. A., Proietto, J., Fam, B. C. & Thorburn, A. W. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* **71**, 438–442 (2000).
6. Alain, G. & Lars, S. Effects of Rimonabant on Metabolic Risk Factors in Overweight Patients with Dyslipidemia. *The New England Journal of Medicine* (2005).
7. Alcalá-Vida, R. *et al.* Age-related and disease locus-specific mechanisms contribute to early remodelling of chromatin structure in Huntington’s disease mice. *Nat Commun* **12**, 364 (2021).
8. Alhadeff, A. L. *et al.* Endogenous Glucagon-like Peptide-1 Receptor Signaling in the Nucleus Tractus Solitarius is Required for Food Intake Control. *Neuropsychopharmacol* **42**, 1471–1479 (2017).
9. Alon, T. & Friedman, J. M. Late-Onset Leanness in Mice with Targeted Ablation of Melanin Concentrating Hormone Neurons.
10. Alves, V. L., Gonçalves, J. L., Aguiar, J., Teixeira, H. M. & Câmara, J. S. The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties. A review. *Critical Reviews in Toxicology* **50**, 359–382 (2020).
11. Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. & Zaidi, N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* **63**, 895–902 (2014).
12. Amenta, P. S., Jallo, J. I., Tuma, R. F., Hooper, D. C. & Elliott, M. B. Cannabinoid receptor type-2 stimulation, blockade, and deletion alter the vascular inflammatory responses to traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* **11**, 191 (2014).
13. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5.* (American Psychiatric Association, Washington, D.C, 2013).
14. ANANDt, B. K. & Brobeck, J. R. HYPOTHALAMIC CONTROL OF FOOD INTAKE IN RATS AND CATS. *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE.*
15. Anastasio, N. C. *et al.* Convergent neural connectivity in motor impulsivity and high-fat food binge-like eating in male Sprague-Dawley rats. *Neuropsychopharmacol.* **44**, 1752–1761 (2019).
16. Argueta, D. A. & DiPatrizio, N. V. Peripheral endocannabinoid signaling controls hyperphagia in western diet-induced obesity. *Physiology & Behavior* **171**, 32–39 (2017).
17. Ashton, J. C., Friberg, D., Darlington, C. L. & Smith, P. F. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* **396**, 113–116 (2006).
18. Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H. & Sternson, S. M. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* **488**, 172–177 (2012).

19. Aubry, A.-S., Awad, G. & Befort, K. Neuro-inflammation induite par une prise alimentaire incontrôlée : risque de douleurs chroniques ? *Douleur analg* **35**, 174–179 (2022).
20. Auguet, T. *et al.* Altered Fatty Acid Metabolism-Related Gene Expression in Liver from Morbidly Obese Women with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *IJMS* **15**, 22173–22187 (2014).
21. Avena, N. M., Bocarsly, M. E., Rada, P., Kim, A. & Hoebel, B. G. After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology & Behavior* **94**, 309–315 (2008).
22. Awad, G., Roedel, L.-A., Massotte, D., Olmstead, M. C. & Befort, K. Deletion of mu opioid receptors reduces palatable solution intake in a mouse model of binge eating. *Behav Pharmacol* **31**, 249–255 (2020).
23. Azevedo, A. P. D., Santos, C. C. D. & Fonseca, D. C. D. Transtorno da compulsão alimentar periódica. *Rev. psiquiatr. clín.* **31**, 170–172 (2004).
24. Bagaric, M., Touyz, S., Heriseanu, A., Conti, J. & Hay, P. Are bulimia nervosa and binge eating disorder increasing? Results of a population-based study of lifetime prevalence and lifetime prevalence by age in South Australia. *Euro Eating Disorders Rev* **28**, 260–268 (2020).
25. Bahi, A. *et al.* β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiology & Behavior* **135**, 119–124 (2014).
26. Bailoo, J. D., Bohlen, M. O. & Wahlsten, D. The precision of video and photocell tracking systems and the elimination of tracking errors with infrared backlighting. *J Neurosci Methods* **188**, 45–52 (2010).
27. Balenga, N. A. *et al.* Heteromerization of GPR 55 and cannabinoid CB₂ receptors modulates signalling. *British J Pharmacology* **171**, 5387–5406 (2014).
28. Balodis, I. M. *et al.* A pilot study linking reduced fronto–Striatal recruitment during reward processing to persistent bingeing following treatment for binge-eating disorder. *Intl J Eating Disorders* **47**, 376–384 (2014).
29. Balodis, I. M. *et al.* Divergent neural substrates of inhibitory control in binge eating disorder relative to other manifestations of obesity. *Obesity* **21**, 367–377 (2013).
30. Bankhead, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* **7**, 16878 (2017).
31. Barnard, N. D. *et al.* D2 dopamine receptor Taq1A polymorphism, body weight, and dietary intake in type 2 diabetes. *Nutrition* **25**, 58–65 (2009).
32. Baver, S. B. *et al.* Leptin Modulates the Intrinsic Excitability of AgRP/NPY Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus.
33. Befort, K. Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward: Insights from knockout studies. *Front Pharmacol* **6**, 6 (2015).
34. Beier, K. T. *et al.* Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell* **162**, 622–634 (2015).
35. Bello, N. T. *et al.* Dietary conditions and highly palatable food access alter rat cannabinoid receptor expression and binding density. *Physiology & Behavior* **105**, 720–726 (2012).
36. Benzinou, M. *et al.* Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations. *Human Molecular Genetics* **17**, 1916–1921 (2008).
37. Berland, C. *et al.* Identification of an endocannabinoid gut-brain vagal mechanism

- controlling food reward and energy homeostasis. *Mol Psychiatry* **27**, 2340–2354 (2022).
38. Berland, C. *et al.* Circulating Triglycerides Gate Dopamine-Associated Behaviors through DRD2-Expressing Neurons. *Cell Metabolism* **31**, 773-790.e11 (2020).
 39. Bernard, Claude. Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. (1865).
 40. Berner, L. A., Avena, N. M. & Hoebel, B. G. Bingeing, self-restriction, and increased body weight in rats with limited access to a sweet-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 1998–2002 (2008).
 41. Berridge, K. C., Venier, I. L. & Robinson, T. E. Taste reactivity analysis of 6-hydroxydopamine-induced aphagia: implications for arousal and anhedonia hypotheses of dopamine function. *Behav Neurosci* **103**, 36–45 (1989).
 42. Berridge, K. C. & Robinson, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews* **28**, 309–369 (1998).
 43. Berridge, K. C., Robinson, T. E. & Aldridge, J. W. Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Current Opinion in Pharmacology* **9**, 65–73 (2009).
 44. Berridge, K. C. From prediction error to incentive salience: mesolimbic computation of reward motivation. *Eur J of Neuroscience* **35**, 1124–1143 (2012).
 45. Beyer, C. E. *et al.* Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiology of Disease* **39**, 148–155 (2010).
 46. Bilbao, A. *et al.* Endocannabinoid LTD in Accumbal D1 Neurons Mediates Reward-Seeking Behavior. *iScience* **23**, 100951 (2020).
 47. Blanco-Gandía, M. C. *et al.* Changes in gene expression and sensitivity of cocaine reward produced by a continuous fat diet. *Psychopharmacology* **234**, 2337–2352 (2017).
 48. Blanco-Gandía, M. C. *et al.* Effects of bingeing on fat during adolescence on the reinforcing effects of cocaine in adult male mice. *Neuropharmacology* **113**, 31–44 (2017).
 49. Blanco-Gandía, M. C., Miñarro, J. & Rodríguez-Arias, M. Behavioral profile of intermittent vs continuous access to a high fat diet during adolescence. *Behavioural Brain Research* **368**, 111891 (2019).
 50. Blüher, M. *et al.* Dysregulation of the Peripheral and Adipose Tissue Endocannabinoid System in Human Abdominal Obesity. *Diabetes* **55**, 3053–3060 (2006).
 51. Blum, K. *et al.* The D₂ Dopamine Receptor Gene as a Determinant of Reward Deficiency Syndrome. *J R Soc Med* **89**, 396–400 (1996).
 52. Blundell, J. E. & Halford, J. C. Regulation of nutrient supply: the brain and appetite control. *Proc Nutr Soc* **53**, 407–418 (1994).
 53. Bocarsly, M. E., Berner, L. A., Hoebel, B. G. & Avena, N. M. Rats that binge eat fat-rich food do not show somatic signs or anxiety associated with opiate-like withdrawal: Implications for nutrient-specific food addiction behaviors. *Physiology & Behavior* **104**, 865–872 (2011).
 54. Bocarsly, M. E., Powell, E. S., Avena, N. M. & Hoebel, B. G. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **97**, 101–106 (2010).
 55. Boggiano, M. M. *et al.* High intake of palatable food predicts binge-eating independent of susceptibility to obesity: an animal model of lean vs obese binge-eating and obesity with and without binge-eating. *Int J Obes* **31**, 1357–1367 (2007).
 56. Bond, C. W. *et al.* Medial Nucleus Accumbens Projections to the Ventral Tegmental Area Control Food Consumption. *J. Neurosci.* **40**, 4727–4738 (2020).
 57. Bonnavion, P., Mickelsen, L. E., Fujita, A., de Lecea, L. & Jackson, A. C. Hubs and

- spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J Physiol* **594**, 6443–6462 (2016).
58. Borgers, A. J. *et al.* Decreased serotonin transporter immunoreactivity in the human hypothalamic infundibular nucleus of overweight subjects. *Front. Neurosci.* **8**, (2014).
 59. Bortolato, M. *et al.* Antidepressant-like Activity of the Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor URB597 in a Rat Model of Chronic Mild Stress.
 60. Boughter, J. D., Lu, L., Saites, L. N. & Tokita, K. Sweet and bitter taste stimuli activate VTA projection neurons in the parabrachial nucleus. *Brain Research* **1714**, 99–110 (2019).
 61. Bourdy, R. & Barrot, M. A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends in Neurosciences* **35**, 681–690 (2012).
 62. Bourdy, R. & Befort, K. The Role of the Endocannabinoid System in Binge Eating Disorder. *IJMS* **24**, 9574 (2023).
 63. Bourdy, R. *et al.* Control of the Nigrostriatal Dopamine Neuron Activity and Motor Function by the Tail of the Ventral Tegmental Area. *Neuropsychopharmacol* **39**, 2788–2798 (2014).
 64. Bray, G. A. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* **36**, 148–153 (1977).
 65. Briand-Mésange, F. *et al.* Possible Role of Adipose Tissue and the Endocannabinoid System in Coronavirus Disease 2019 Pathogenesis: Can Rimonabant Return? *Obesity* **28**, 1580–1581 (2020).
 66. Bright, U. & Akirav, I. Modulation of Endocannabinoid System Components in Depression: Pre-Clinical and Clinical Evidence. *IJMS* **23**, 5526 (2022).
 67. Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron* **68**, 815–834 (2010).
 68. Brown, R. M. & James, M. H. Binge eating, overeating and food addiction: Approaches for examining food overconsumption in laboratory rodents. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **123**, 110717 (2023).
 69. Buczynski, M. W. & Parsons, L. H. Quantification of brain endocannabinoid levels: methods, interpretations and pitfalls. *British J Pharmacology* **160**, 423–442 (2010).
 70. Burrows, T., Skinner, J., McKenna, R. & Rollo, M. Food Addiction, Binge Eating Disorder, and Obesity: Is There a Relationship? *Behav Sci (Basel)* **7**, 54 (2017).
 71. Cabral, G. A., Raborn, E. S., Griffin, L., Dennis, J. & Marciano-Cabral, F. CB₂ receptors in the brain: role in central immune function. *British J Pharmacology* **153**, 240–251 (2008).
 72. Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V. & Di Filippo, M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci* **17**, 1022–1030 (2014).
 73. Cameron, A. J. *et al.* Health and mortality consequences of abdominal obesity: evidence from the AusDiab study. *Medical Journal of Australia* **191**, 202–208 (2009).
 74. Campos, A., Port, J. D. & Acosta, A. Integrative Hedonic and Homeostatic Food Intake Regulation by the Central Nervous System: Insights from Neuroimaging. *Brain Sci* **12**, 431 (2022).
 75. Carai, M. A. M., Colombo, G., Maccioni, P. & Gessa, G. L. Efficacy of Rimonabant and Other Cannabinoid CB₁ Receptor Antagonists in Reducing Food Intake and Body Weight: Preclinical and Clinical Data. *CNS Drug Reviews* **12**, 91–99 (2006).
 76. Cardel, M. I. *et al.* *Taq1a* polymorphism (rs1800497) is associated with obesity-related outcomes and dietary intake in a multi-ethnic sample of children. *Pediatric Obesity* **14**, e12470 (2019).

77. Carlin, J., Hill-Smith, T. E., Lucki, I. & Reyes, T. M. Reversal of dopamine system dysfunction in response to high-fat diet. *Obesity* **21**, 2513–2521 (2013).
78. Carter, J. C., Van Wijk, M. & Rowsell, M. Symptoms of ‘food addiction’ in binge eating disorder using the Yale Food Addiction Scale version 2.0. *Appetite* **133**, 362–369 (2019).
79. Carton, L. *et al.* What is the potential for abuse of lisdexamfetamine in adults? A preclinical and clinical literature review and expert opinion. *Expert Rev Clin Pharmacol* **15**, 921–925 (2022).
80. Castelhana-Carlos, M. J. & Baumans, V. The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. *Lab Anim* **43**, 311–327 (2009).
81. Castonguay-Paradis, S. *et al.* Dietary fatty acid intake and gut microbiota determine circulating endocannabinoid signaling beyond the effect of body fat. *Sci Rep* **10**, 15975 (2020).
82. Castro, D. C. & Berridge, K. C. Opioid Hedonic Hotspot in Nucleus Accumbens Shell: Mu, Delta, and Kappa Maps for Enhancement of Sweetness “Liking” and “Wanting”. *J. Neurosci.* **34**, 4239–4250 (2014).
83. Cavaliere, G. *et al.* High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 509 (2019).
84. Ceccarini, J. *et al.* Association between cerebral cannabinoid 1 receptor availability and body mass index in patients with food intake disorders and healthy subjects: a [18F]MK-9470 PET study. *Transl Psychiatry* **6**, e853–e853 (2016).
85. Chaudhri, N., Sahuque, L. L., Schairer, W. W. & Janak, P. H. Separable Roles of the Nucleus Accumbens Core and Shell in Context- and Cue-Induced Alcohol-Seeking. *Neuropsychopharmacol* **35**, 783–791 (2010).
86. Chawla, A., Corder, Z. A., Boersma, G. & Moran, T. H. Cognitive impairment and gene expression alterations in a rodent model of binge eating disorder. *Physiology & Behavior* **180**, 78–90 (2017).
87. Cheer, J. F., Kendall, D. A. & Marsden, C. A. Cannabinoid receptors and reward in the rat: a conditioned place preference study. *Psychopharmacology* **151**, 25–30 (2000).
88. Cheer, J. F., Wassum, K. M., Heien, M. L. A. V., Phillips, P. E. M. & Wightman, R. M. Cannabinoids Enhance Subsecond Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of Awake Rats. *J. Neurosci.* **24**, 4393–4400 (2004).
89. Chen, L. *et al.* Ventral tegmental area GABAergic neurons induce anxiety-like behaviors and promote palatable food intake. *Neuropharmacology* **173**, 108114 (2020).
90. Chen, P. S. *et al.* Correlation between body mass index and striatal dopamine transporter availability in healthy volunteers—A SPECT study. *NeuroImage* **40**, 275–279 (2008).
91. Chiang, K. P. Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the endocannabinoid system and problem drug use. *Human Molecular Genetics* **13**, 2113–2119 (2004).
92. Chopra, R. N., Brevet-Colonel & Chopra, G. S. PRESENT POSITION OF HEMP DRUG ADDICTION IN INDIA. *Addiction* **38**, 71–74 (1940).
93. Christensen, R., Kristensen, P. K., Bartels, E. M., Bliddal, H. & Astrup, A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* **370**, 1706–1713 (2007).
94. Cifani, C., Polidori, C., Melotto, S., Ciccocioppo, R. & Massi, M. A preclinical model of binge eating elicited by yo-yo dieting and stressful exposure to food: effect of sibutramine,

- fluoxetine, topiramate, and midazolam. *Psychopharmacology* **204**, 113–125 (2009).
95. Cifuentes, L. & Acosta, A. Homeostatic regulation of food intake. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **46**, 101794 (2022).
 96. Clark, S. M., Martens, K., Smith-Mason, C. E., Hamann, A. & Miller-Matero, L. R. Validation of the Yale Food Addiction Scale 2.0 Among a Bariatric Surgery Population. *OBES SURG* **29**, 2923–2928 (2019).
 97. Clendinning, J. CANNABIS SATIVA OF INDIA.
 98. Colantuoni, C. *et al.* Evidence That Intermittent, Excessive Sugar Intake Causes Endogenous Opioid Dependence. *Obesity Research* **10**, 478–488 (2002).
 99. Cole, S. L., Robinson, M. J. F. & Berridge, K. C. Optogenetic self-stimulation in the nucleus accumbens: D1 reward versus D2 ambivalence. *PLoS ONE* **13**, e0207694 (2018).
 100. Comings, D. E. & Blum, K. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. in *Progress in Brain Research* vol. 126 325–341 (Elsevier, 2000).
 101. Considine, R. V. *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **334**, 292–295 (1996).
 102. Corwin, R. L. *et al.* Limited access to a dietary fat option affects ingestive behavior but not body composition in male rats. *Physiol Behav* **65**, 545–553 (1998).
 103. Corwin, R. L. W. *et al.* Binge-type eating disrupts dopaminergic and GABAergic signaling in the prefrontal cortex and ventral tegmental area. *Obesity* **24**, 2118–2125 (2016).
 104. Cosgrove, K. P., Veldhuizen, M. G., Sandiego, C. M., Morris, E. D. & Small, D. M. Opposing relationships of BMI with BOLD and dopamine D2/3 receptor binding potential in the dorsal striatum: RELATIONSHIPS OF BMI, BOLD, AND D2R/D3R BP. *Synapse* **69**, 195–202 (2015).
 105. Cowley, M. A. *et al.* Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* **411**, 480–484 (2001).
 106. Cox, J. & Witten, I. B. Striatal circuits for reward learning and decision-making. *Nat Rev Neurosci* **20**, 482–494 (2019).
 107. Cristino, L., Palomba, L. & Di Marzo, V. New horizons on the role of cannabinoid CB1 receptors in palatable food intake, obesity and related dysmetabolism. *Int J Obes Supp* **4**, S26–S30 (2014).
 108. Cristino, L. *et al.* Obesity-driven synaptic remodeling affects endocannabinoid control of orexinergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, (2013).
 109. Crocq, M.-A. History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **22**, 223–228 (2020).
 110. Cruz, A. M. Prelimbic cortical projections to rostromedial tegmental nucleus play a suppressive role in cue-induced reinstatement of cocaine seeking. (2020).
 111. Da Silva Júnior, A. E. *et al.* Prevalence of food addiction and its association with anxiety, depression, and adherence to social distancing measures in Brazilian university students during the COVID-19 pandemic: a nationwide study. *Eat Weight Disord* **27**, 2027–2035 (2022).
 112. Dahlström, A. & Fuxe, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**, 398–399 (1964).
 113. Dang, L. C. *et al.* Associations between dopamine D2 receptor availability and BMI depend on age. *NeuroImage* **138**, 176–183 (2016).
 114. Daubner, S. C., Le, T. & Wang, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine

- synthesis. *Arch Biochem Biophys* **508**, 1–12 (2011).
115. De Luca, M. A., Solinas, M., Bimpisidis, Z., Goldberg, S. R. & Di Chiara, G. Cannabinoid facilitation of behavioral and biochemical hedonic taste responses. *Neuropharmacology* **63**, 161–168 (2012).
 116. De Sa Nogueira, D. *et al.* Binge sucrose-induced neuroadaptations: A focus on the endocannabinoid system. *Appetite* **164**, 105258 (2021).
 117. Décarie-Spain, L. *et al.* Prolonged saturated, but not monounsaturated, high-fat feeding provokes anxiodepressive-like behaviors in female mice despite similar metabolic consequences. *Brain, Behavior, & Immunity - Health* **16**, 100324 (2021).
 118. Décarie-Spain, L. *et al.* Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. *Mol Metab* **10**, 1–13 (2018).
 119. Deckers, K., Van Boxtel, M. P. J., Verhey, F. R. J. & Köhler, S. Obesity and cognitive decline in adults: Effect of methodological choices and confounding by age in a longitudinal study. *J Nutr Health Aging* **21**, 546–553 (2017).
 120. Dela Cruz, J. A. D. *et al.* c-Fos induction in mesotelencephalic dopamine pathway projection targets and dorsal striatum following oral intake of sugars and fats in rats. *Brain Research Bulletin* **111**, 9–19 (2015).
 121. Demeke, S. *et al.* Change in hyper-palatable food availability in the US food system over 30 years: 1988–2018. *Public Health Nutr.* **26**, 182–189 (2023).
 122. Després, J.-P., Golay, A., Sjöström, L., & Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* **353**, 2121–2134 (2005).
 123. Devane, A., Howlett, C. & Melvin, S. of a Cannabinoid Receptor in.
 124. Devane, W. A. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946–1949 (1992).
 125. Devinsky, D. O. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial.
 126. Devinsky, O. *et al.* Randomized, dose-ranging safety trial of cannabidiol in Dravet syndrome. *Neurology* **90**, e1204–e1211 (2018).
 127. Di Marzo, V. & Matias, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* **8**, 585–589 (2005).
 128. DiFeliceantonio, A. G. *et al.* Supra-Additive Effects of Combining Fat and Carbohydrate on Food Reward. *Cell Metabolism* **28**, 33-44.e3 (2018).
 129. Domingo-Rodriguez, L. *et al.* A specific prelimbic-nucleus accumbens pathway controls resilience versus vulnerability to food addiction. *Nat Commun* **11**, 782 (2020).
 130. Domschke, K. *et al.* Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: Impact on antidepressant treatment response and emotion processing in Major Depression. *European Neuropsychopharmacology* **18**, 751–759 (2008).
 131. Donato, F., Jacobsen, R. I., Moser, M.-B. & Moser, E. I. Title: Stellate cells drive maturation of the entorhinal-hippocampal circuit.
 132. Dornellas, A. P. S. *et al.* Activation of locus coeruleus to rostromedial tegmental nucleus (RMTg) noradrenergic pathway blunts binge-like ethanol drinking and induces aversive responses in mice. *Neuropharmacology* **199**, 108797 (2021).
 133. Du, M., Santiago, A., Akiz, C. & Aoki, C. GABAergic interneurons' feedback inhibition of dorsal raphe-projecting pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex suppresses

- feeding of adolescent female mice undergoing activity-based anorexia. *Brain Struct Funct* **227**, 2127–2151 (2022).
134. Duan, Z. R. S. *et al.* GABAergic Restriction of Network Dynamics Regulates Interneuron Survival in the Developing Cortex. *Neuron* **105**, 75–92.e5 (2020).
 135. Duchesne, M. *et al.* Assessment of executive functions in obese individuals with binge eating disorder. *Braz J Psychiatry* **32**, 381–388 (2010).
 136. Dunn, J. P. *et al.* Relationship of Dopamine Type 2 Receptor Binding Potential With Fasting Neuroendocrine Hormones and Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Diabetes Care* **35**, 1105–1111 (2012).
 137. Eban-Rothschild, A., Rothschild, G., Giardino, W. J., Jones, J. R. & De Lecea, L. VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep–wake behaviors. *Nat Neurosci* **19**, 1356–1366 (2016).
 138. Elias, C. F. *et al.* Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area. *Neuron* **23**, 775–786 (1999).
 139. Elmer, G. I. *et al.* The rostromedial tegmental nucleus modulates the development of stress-induced helpless behavior. *Behavioural Brain Research* **359**, 950–957 (2019).
 140. Elphick, M. R. & Egertová, M. The Phylogenetic Distribution and Evolutionary Origins of Endocannabinoid Signalling. in *Cannabinoids* (ed. Pertwee, R. G.) vol. 168 283–297 (Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2005).
 141. Elphick, M. R., Satou, Y. & Satoh, N. The invertebrate ancestry of endocannabinoid signalling: an orthologue of vertebrate cannabinoid receptors in the urochordate *Ciona intestinalis*. *Gene* **302**, 95–101 (2003).
 142. Elphick, M. R. & Egertova, M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **356**, 381–408 (2001).
 143. Eng, J. M. & Estall, J. L. Diet-Induced Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Food for Thought on Sugar, Fat, and Cholesterol. *Cells* **10**, 1805 (2021).
 144. Engel, M. A. *et al.* MICE LACKING CANNABINOID CB1-, CB2-RECEPTORS OR BOTH RECEPTORS SHOW INCREASED SUSCEPTIBILITY TO TRINITROBENZENE SULFONIC ACID (TNBS)-INDUCED COLITIS.
 145. Engeli, S. *et al.* Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in Human Obesity. *Diabetes* **54**, 2838–2843 (2005).
 146. Engeli, S. *et al.* Influence of dietary fat intake on the endocannabinoid system in lean and obese subjects. *Obesity* **22**, (2014).
 147. Eraso-Pichot, A. *et al.* Endocannabinoid signaling in astrocytes. *Glia* **71**, 44–59 (2023).
 148. Espitia-Bautista, E. & Escobar, C. Fat rather than sugar diet leads to binge-type eating, anticipation, effort behavior and activation of the corticolimbic system. *Nutritional Neuroscience* **24**, 508–519 (2021).
 149. Esposito-Zapero, C. *et al.* The rostromedial tegmental nucleus RMTg is not a critical site for ethanol-induced motor activation in rats. *Psychopharmacology* **240**, 2071–2080 (2023).
 150. Ettenberg, A., Raven, M. A., Danluck, D. A. & Necessary, B. D. Evidence for Opponent-Process Actions of Intravenous Cocaine.
 151. Every-Palmer, S. Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: An explorative study. *Drug and Alcohol Dependence* **117**, 152–157 (2011).
 152. Faivre, F. *et al.* Ablation of the tail of the ventral tegmental area compensates symptoms in an experimental model of Parkinson’s disease. *Neurobiology of Disease* **139**, 104818

- (2020).
153. Farrimond, J. A., Whalley, B. J. & Williams, C. M. Cannabinol and cannabidiol exert opposing effects on rat feeding patterns. *Psychopharmacology* **223**, 117–129 (2012).
 154. Fava, M. Weight gain and antidepressants. *J Clin Psychiatry* **61 Suppl 11**, 37–41 (2000).
 155. Fenno, L. E. *et al.* Targeting cells with single vectors using multiple-feature Boolean logic. *Nat Methods* **11**, 763–772 (2014).
 156. Fenselau, H. *et al.* A rapidly acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by α -MSH. *Nat Neurosci* **20**, 42–51 (2017).
 157. Figlewicz, D. P. *et al.* Moderate high fat diet increases sucrose self-administration in young rats. *Appetite* **61**, 19–29 (2013).
 158. Flores, A., Maldonado, R. & Berrendero, F. Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system: what we know so far. *Front Neurosci* **7**, 256 (2013).
 159. Flores-Dourojeanni, J. P. *et al.* Temporally Specific Roles of Ventral Tegmental Area Projections to the Nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex in Attention and Impulse Control. *J. Neurosci.* **41**, 4293–4304 (2021).
 160. Foltin, R. W., Brady, J. V. & Fischman, M. W. Behavioral analysis of marijuana effects on food intake in humans. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **25**, 577–582 (1986).
 161. Foltin, R. W., Fischman, M. W. & Byrne, M. F. Effects of smoked marijuana on food intake and body weight of humans living in a residential laboratory. *Appetite* **11**, 1–14 (1988).
 162. Fontbonne, A. *et al.* Prevalence of Overweight and Obesity in France: The 2020 Obepi-Roche Study by the “Ligue Contre l’Obésité”. (2023).
 163. Fordahl, S. C., Locke, J. L. & Jones, S. R. High fat diet augments amphetamine sensitization in mice: Role of feeding pattern, obesity, and dopamine terminal changes. *Neuropharmacology* **109**, 170–182 (2016).
 164. French, E. D. D9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. *Neuroscience Letters* (1997).
 165. Fried, P., Watkinson, B. & Gray, R. Neurocognitive consequences of marijuana—a comparison with pre-drug performance. *Neurotoxicology and Teratology* **27**, 231–239 (2005).
 166. Galiègue, S. *et al.* Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *European Journal of Biochemistry* **232**, 54–61 (1995).
 167. Gaoni, Y. & Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646–1647 (1964).
 168. García-Blanco, A. Role of CB2 cannabinoid receptor in the development of food addiction in male mice. *Neurobiology of Disease* (2023).
 169. García-Blanco, A. *et al.* miRNA signatures associated with vulnerability to food addiction in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation* **132**, e156281 (2022).
 170. Gawliński, D., Gawlińska, K. & Smaga, I. Maternal High-Fat Diet Modulates Cnr1 Gene Expression in Male Rat Offspring. *Nutrients* **13**, 2885 (2021).
 171. Gazzo, P. *et al.* Association between cannabinoid type-1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population. *Int J Obes* **31**, 908–912 (2007).
 172. Gearhardt, A. N., Corbin, W. R. & Brownell, K. D. Preliminary validation of the Yale Food Addiction Scale. *Appetite* **52**, 430–436 (2009).
 173. Geisler, S. *et al.* Prominent Activation of Brainstem and Pallidal Afferents of the Ventral Tegmental Area by Cocaine. *Neuropsychopharmacol* **33**, 2688–2700 (2008).

174. Geisler, S. & Zahm, D. S. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J. Comp. Neurol.* **490**, 270–294 (2005).
175. Gerfen, C. R. *et al.* D₁ and D₂ Dopamine Receptor-regulated Gene Expression of Striatonigral and Striatopallidal Neurons. *Science* **250**, 1429–1432 (1990).
176. Ghafouri, N. *et al.* Inhibition of monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase by analogues of 2-arachidonoylglycerol. *British J Pharmacology* **143**, 774–784 (2004).
177. Giel, K. E. *et al.* Binge eating disorder. *Nat Rev Dis Primers* **8**, 16 (2022).
178. Giuffrida, A. *et al.* Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *nature neuroscience* **2**, (1999).
179. Glass, M., Faull, R. L. M. & Dragunow, M. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* **77**, 299–318 (1997).
180. Glass, M. & Northup, J. K. Agonist Selective Regulation of G Proteins by Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptors. *Mol Pharmacol* **56**, 1362–1369 (1999).
181. Glover, E. J. Inhibition of the rostromedial tegmental nucleus reverses alcohol withdrawal-induced anxiety-like behavior. (2019).
182. Glover, E. J., McDougle, M. J., Siegel, G. S., Jhou, T. C. & Chandler, L. J. Role for the Rostromedial Tegmental Nucleus in Signaling the Aversive Properties of Alcohol. *Alcoholism Clin & Exp Res* **40**, 1651–1661 (2016).
183. Godfrey, N., Qiao, M. & Borgland, S. L. Activation of LH GABAergic inputs counteracts fasting-induced changes in tVTA/RMTG neurons. *J Physiol* **600**, 2203–2224 (2022).
184. Gong, J.-P. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research* **1071**, 10–23 (2006).
185. Gorbachevskaya, A. I. Organization of Projections of the Rostromedial Tegmental Nucleus to the Striatum in the Dog Brain. *Neurosci Behav Physi* **44**, 614–618 (2014).
186. Graybiel, A. M. Direct and indirect preoculomotor pathways of the brainstem: An autoradiographic study of the pontine reticular formation in the cat. *J. Comp. Neurol.* **175**, 37–78 (1977).
187. Grill, H. J. & Norgren, R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research* **143**, 263–279 (1978).
188. Guerdjikova, A. I., Mori, N., Casuto, L. S. & McElroy, S. L. Update on Binge Eating Disorder. *Medical Clinics of North America* **103**, 669–680 (2019).
189. Guillaumin, M. C. C., Viskaitis, P., Bracey, E., Burdakov, D. & Peleg-Raibstein, D. Disentangling the role of NAc D1 and D2 cells in hedonic eating. *Mol Psychiatry* **28**, 3531–3547 (2023).
190. Guillemot-Legris, O. *et al.* High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. *J Neuroinflammation* **13**, 206 (2016).
191. Haber, S. N., Fudge, J. L. & McFarland, N. R. Striatonigrostriatal Pathways in Primates Form an Ascending Spiral from the Shell to the Dorsolateral Striatum. *J. Neurosci.* **20**, 2369–2382 (2000).
192. Hagan, M. M. & Moss, D. E. Persistence of binge-eating patterns after a history of restriction with intermittent bouts of refeeding on palatable food in rats: implications for bulimia nervosa. *Int J Eat Disord* **22**, 411–420 (1997).
193. Halaas, J. L. *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**, 543–546 (1995).
194. Hampson, R. E., Zhuang, S., Weiner, J. L. & Deadwyler, S. A. Functional Significance of

- Cannabinoid-Mediated, Depolarization-Induced Suppression of Inhibition (DSI) in the Hippocampus. *Journal of Neurophysiology* **90**, 55–64 (2003).
195. Hardaway, J. A. *et al.* Central Amygdala Prepronociceptin-Expressing Neurons Mediate Palatable Food Consumption and Reward. *Neuron* **102**, 1037-1052.e7 (2019).
 196. Hariri, N. & Thibault, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Res. Rev.* **23**, 270–299 (2010).
 197. Harris, R. B. S. & Apolzan, J. W. Changes in glucose tolerance and leptin responsiveness of rats offered a choice of lard, sucrose, and chow. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **302**, R1327–R1339 (2012).
 198. Harris, R. B. S. Development of leptin resistance in sucrose drinking rats is associated with consuming carbohydrate-containing solutions and not calorie-free sweet solution. *Appetite* **132**, 114–121 (2019).
 199. Harrold, J. A., Elliott, J. C., King, P. J., Widdowson, P. S. & Williams, G. 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 Research* **952**, 232–238 (2002).
 200. Harrold, J. A., Williams, G. & Widdowson, P. S. Early Leptin Response to a Palatable Diet Predicts Dietary Obesity in Rats: Key Role of Melanocortin-4 Receptors in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus. *Journal of Neurochemistry* **74**, 1224–1228 (2000).
 201. Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T. & Kano, M. Presynaptic Monoacylglycerol Lipase Activity Determines Basal Endocannabinoid Tone and Terminates Retrograde Endocannabinoid Signaling in the Hippocampus. *J. Neurosci.* **27**, 1211–1219 (2007).
 202. Head, G. A. Cardiovascular and metabolic consequences of obesity. *Front. Physiol.* **6**, (2015).
 203. Hedges, D. M. *et al.* Methamphetamine Induces Dopamine Release in the Nucleus Accumbens Through a Sigma Receptor-Mediated Pathway. *Neuropsychopharmacol.* **43**, 1405–1414 (2018).
 204. Herkenham, M. *et al.* Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1932–1936 (1990).
 205. Herkenham, M. Cannabinoid Receptor Localization in Brain: Relationship to Motor and Reward Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences* **654**, 19–32 (1992).
 206. Herkenham, M. & Nauta, W. J. H. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **187**, 19–47 (1979).
 207. Hersey, M. *et al.* High-fat diet induces neuroinflammation and reduces the serotonergic response to escitalopram in the hippocampus of obese rats. *Brain, Behavior, and Immunity* **96**, 63–72 (2021).
 208. Hildebrandt, B. A. & Ahmari, S. E. Breaking It Down: Investigation of Binge Eating Components in Animal Models to Enhance Translation. *Front. Psychiatry* **12**, 728535 (2021).
 209. Hirvonen, J. *et al.* Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Mol Psychiatry* **17**, 642–649 (2012).
 210. Hong, S., Zhou, T. C., Smith, M., Saleem, K. S. & Hikosaka, O. Negative Reward Signals from the Lateral Habenula to Dopamine Neurons Are Mediated by Rostromedial Tegmental Nucleus in Primates. *J. Neurosci.* **31**, 11457–11471 (2011).
 211. Honma, K.-I., Honma, S. & Hiroshige, T. Activity Rhythms in the Circadian Domain

- Appear in Suprachiasmatic Nuclei Lesioned Rats Given Methamphetamine.
212. Howlett, A. C. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68–69**, 619–631 (2002).
 213. Hryhorczuk, C. *et al.* Dampened Mesolimbic Dopamine Function and Signaling by Saturated but not Monounsaturated Dietary Lipids. *Neuropsychopharmacol* **41**, 811–821 (2016).
 214. Hsu, T. M. *et al.* A hippocampus to prefrontal cortex neural pathway inhibits food motivation through glucagon-like peptide-1 signaling. *Mol Psychiatry* **23**, 1555–1565 (2018).
 215. 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.* **27**, 4870–4881 (2007).
 216. Hurst, K. *et al.* A putative lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* **27**, 985–998 (2017).
 217. Hwang, E.-S. *et al.* Antidepressant-like effects of β -caryophyllene on restraint plus stress-induced depression. *Behav Brain Res* **380**, 112439 (2020).
 218. Ibsen, M. S., Connor, M. & Glass, M. Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptor Signaling and Bias. *Cannabis and Cannabinoid Research* **2**, 48–60 (2017).
 219. Ignatowska-Jankowska, B. Cannabidiol decreases body weight gain in rats: Involvement of CB₂ receptors. *Neuroscience Letters* (2011).
 220. Ingalls, A. M., Dickie, M. M. & Snell, G. D. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* **41**, 317–318 (1950).
 221. Ip, C. K. *et al.* Critical role of lateral habenula circuits in the control of stress-induced palatable food consumption. *Neuron* **111**, 2583-2600.e6 (2023).
 222. Ishiguro, H. *et al.* Cannabinoid CB₂ Receptor Gene and Environmental Interaction in the Development of Psychiatric Disorders. *Molecules* **23**, 1836 (2018).
 223. Ivezaj, V., Wiedemann, A. A. & Grilo, C. M. Food addiction and bariatric surgery: a systematic review of the literature. *Obesity Reviews* **18**, 1386–1397 (2017).
 224. Jain, S. *et al.* Chronic activation of a designer Gq-coupled receptor improves β cell function. *J. Clin. Invest.* **123**, 1750–1762 (2013).
 225. Jais, A. *et al.* PNOCARC Neurons Promote Hyperphagia and Obesity upon High-Fat-Diet Feeding. *Neuron* **106**, 1009-1025.e10 (2020).
 226. Jalabert, M. *et al.* Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 16446–16450 (2011).
 227. Jamshidi, N. & Taylor, D. A. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British J Pharmacology* **134**, 1151–1154 (2001).
 228. Jendryka, M. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Sci Rep* **9**, 4522 (2019).
 229. Jennings, J. H., Rizzi, G., Stamatakis, A. M., Ung, R. L. & Stuber, G. D. The Inhibitory Circuit Architecture of the Lateral Hypothalamus Orchestrates Feeding. *Science* **341**, 1517–1521 (2013).
 230. Jhou, T. Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *J of Comparative Neurology* **493**, 111–114 (2005).
 231. Jhou, T. C., Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B. & Holland, P. C. The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons,

- Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron* **61**, 786–800 (2009).
232. Jhou, T. C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B. A. & Zahm, D. S. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J of Comparative Neurology* **513**, 566–596 (2009).
233. Jhou, T. C. *et al.* Cocaine Drives Aversive Conditioning via Delayed Activation of Dopamine-Responsive Habenular and Midbrain Pathways. *J. Neurosci.* **33**, 7501–7512 (2013).
234. Jo, Y.-H., Chen, Y.-J. J., Chua, S. C., Talmage, D. A. & Role, L. W. Integration of Endocannabinoid and Leptin Signaling in an Appetite-Related Neural Circuit. *Neuron* **48**, 1055–1066 (2005).
235. Johnson, J. R. *et al.* Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study of the Efficacy, Safety, and Tolerability of THC:CBD Extract and THC Extract in Patients with Intractable Cancer-Related Pain. **39**, (2010).
236. Jordan, C. J. & Xi, Z.-X. Progress in brain cannabinoid CB2 receptor research: From genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **98**, 208–220 (2019).
237. Joshi, A., Faivre, F., La Fleur, S. E. & Barrot, M. Midbrain and Lateral Nucleus Accumbens Dopamine Depletion Affects Free-choice High-fat high-sugar Diet Preference in Male Rats. *Neuroscience* **467**, 171–184 (2021).
238. Jurado-Parras, M.-T. *et al.* The Dorsal Striatum Energizes Motor Routines. *Current Biology* **30**, 4362-4372.e6 (2020).
239. Justinova, Z., Goldberg, S. R., Heishman, S. J. & Tanda, G. Self-administration of cannabinoids by experimental animals and human marijuana smokers. (2005).
240. Kales, E. F. Macronutrient analysis of binge eating in bulimia. *Physiology & Behavior* **48**, 837–840 (1990).
241. Kapoor, N., Arora, S. & Kalra, S. Gender disparities in people living with obesity - An uncharted territory. *J Mid-life Health* **12**, 103 (2021).
242. Karlsson, H. K. *et al.* Obesity Is Associated with Decreased μ -Opioid But Unaltered Dopamine D₂ Receptor Availability in the Brain. *J. Neurosci.* **35**, 3959–3965 (2015).
243. Kathuria, S. *et al.* Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* **9**, 76–81 (2003).
244. Kaufling, J. & Aston-Jones, G. Persistent Adaptations in Afferents to Ventral Tegmental Dopamine Neurons after Opiate Withdrawal. *Journal of Neuroscience* **35**, 10290–10303 (2015).
245. Kaufling, J., Veinante, P., Pawlowski, S. A., Freund-Mercier, M. & Barrot, M. Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J of Comparative Neurology* **513**, 597–621 (2009).
246. Kaufling, J., Veinante, P., Pawlowski, S. A., Freund-Mercier, M.-J. & Barrot, M. γ -Aminobutyric Acid Cells with Cocaine-Induced Δ FosB in the Ventral Tegmental Area Innervate Mesolimbic Neurons. *Biological Psychiatry* **67**, 88–92 (2010).
247. Kesner, A. J. & Lovinger, D. M. Cannabinoids, Endocannabinoids and Sleep. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, 125 (2020).
248. Kessler, R. M., Hutson, P. H., Herman, B. K. & Potenza, M. N. The neurobiological basis of binge-eating disorder. *Neurosci Biobehav Rev* **63**, 223–238 (2016).
249. Kim, J. & Alger, B. E. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* **7**, 697–698 (2004).

250. Kirjavainen, A. *et al.* Gata2, Nkx2-2 and Skor2 form a transcription factor network regulating development of a midbrain GABAergic neuron subtype with characteristics of REM-sleep regulatory neurons. *Development* **149**, dev200937 (2022).
251. Kirkham, T. C., Williams, C. M., Fezza, F. & Marzo, V. D. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *British J Pharmacology* **136**, 550–557 (2002).
252. Koball, A. M. *et al.* Validation of the Yale Food Addiction Scale 2.0 in Patients Seeking Bariatric Surgery. *OBES SURG* **31**, 1533–1540 (2021).
253. Koch, C. E. *et al.* Circadian regulation of hedonic appetite in mice by clocks in dopaminergic neurons of the VTA. *Nat Commun* **11**, 3071 (2020).
254. Koch, J. E. & Matthews, S. M. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Stimulates Palatable Food Intake in Lewis Rats: Effects of Peripheral and Central Administration. *Nutritional Neuroscience* **4**, 179–187 (2001).
255. Koekkoek, L. L. *et al.* Sucrose drinking mimics effects of nucleus accumbens μ -opioid receptor stimulation on fat intake and brain c-Fos-expression. *Nutritional Neuroscience* **25**, 2408–2420 (2022).
256. Koekkoek, L. L. *et al.* Disruption of lateral hypothalamic calorie detection by a free choice high fat diet. *The FASEB Journal* **35**, e21804 (2021).
257. Komorowska-Müller, J. A. *et al.* Chronic low-dose Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) treatment stabilizes dendritic spines in 18-month-old mice. *Sci Rep* **13**, 1390 (2023).
258. Komorowska-Müller, J. A. & Schmöle, A.-C. CB2 Receptor in Microglia: The Guardian of Self-Control. *IJMS* **22**, 19 (2020).
259. Korotkova, T. M., Sergeeva, O. A., Eriksson, K. S., Haas, H. L. & Brown, R. E. Excitation of Ventral Tegmental Area Dopaminergic and Nondopaminergic Neurons by Orexins/Hypocretins. *J. Neurosci.* **23**, 7–11 (2003).
260. Krashes, M. J. *et al.* Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest* **121**, 1424–1428 (2011).
261. Kravitz, A. V., Tye, L. D. & Kreitzer, A. C. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* **15**, 816–818 (2012).
262. Kreisler, A. D. The duration of intermittent access to preferred sucrose-rich food affects binge-like intake, fat accumulation, and fasting glucose in male rats.
263. Kreitzer, A. C. & Regehr, W. G. Retrograde Inhibition of Presynaptic Calcium Influx by Endogenous Cannabinoids at Excitatory Synapses onto Purkinje Cells. *Neuron* **29**, 717–727 (2001).
264. Kruk-Slomka, M., Dzik, A., Budzynska, B. & Biala, G. Endocannabinoid System: the Direct and Indirect Involvement in the Memory and Learning Processes—a Short Review. *Mol Neurobiol* **54**, 8332–8347 (2017).
265. Kuikka, J. *et al.* Reduced serotonin transporter binding in binge eating women. *Psychopharmacology* **155**, 310–314 (2001).
266. La Fleur, S. E., Luijendijk, M. C. M., Van Rozen, A. J., Kalsbeek, A. & Adan, R. A. H. A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. *Int J Obes* **35**, 595–604 (2011).
267. La Fleur, S. E. *et al.* A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *Int J Obes* **31**, 1286–1294 (2007).
268. Labouèbe, G. *et al.* Insulin induces long-term depression of ventral tegmental area

- dopamine neurons via endocannabinoids. *Nat Neurosci* **16**, 300–308 (2013).
269. Lafaye, G., Karila, L., Blecha, L. & Benyamina, A. Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues Clin Neurosci* **19**, 309–316 (2017).
270. Lahti, L. *et al.* Differentiation and molecular heterogeneity of inhibitory and excitatory neurons associated with midbrain dopaminergic nuclei. *Development* dev.129957 (2015) doi:10.1242/dev.129957.
271. Lau, B. K., Cota, D., Cristino, L. & Borgland, S. L. Endocannabinoid modulation of homeostatic and non-homeostatic feeding circuits. *Neuropharmacology* **124**, 38–51 (2017).
272. Lauckner, J. E. *et al.* GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 2699–2704 (2008).
273. Laurent, V., Wong, F. L. & Balleine, B. W. The Lateral Habenula and Its Input to the Rostromedial Tegmental Nucleus Mediates Outcome-Specific Conditioned Inhibition. *J Neurosci* **37**, 10932–10942 (2017).
274. Lavezzi, H. N., Parsley, K. P. & Zahm, D. S. Modulation of Locomotor Activation by the Rostromedial Tegmental Nucleus. *Neuropsychopharmacol* **40**, 676–687 (2015).
275. Le Foll, B., Trigo, J. M., Sharkey, K. A. & Strat, Y. L. Cannabis and Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) for weight loss? *Medical Hypotheses* **80**, 564–567 (2013).
276. Lecca, S. *et al.* Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* **36**, 589–602 (2011).
277. Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Muntoni, A. L. & Pistis, M. Inhibitory Inputs from Rostromedial Tegmental Neurons Regulate Spontaneous Activity of Midbrain Dopamine Cells and Their Responses to Drugs of Abuse. *Neuropsychopharmacol* **37**, 1164–1176 (2012).
278. Lee, M. G., Hassani, O. K. & Jones, B. E. Discharge of Identified Orexin/Hypocretin Neurons across the Sleep-Waking Cycle. *J. Neurosci.* **25**, 6716–6720 (2005).
279. Lemtiri-Chlieh, F. & Levine, E. S. 2-AG and anandamide enhance hippocampal long-term potentiation via suppression of inhibition. *Front. Cell. Neurosci.* **16**, 1023541 (2022).
280. Leung, J., Chan, G. C. K., Hides, L. & Hall, W. D. What is the prevalence and risk of cannabis use disorders among people who use cannabis? a systematic review and meta-analysis. *Addictive Behaviors* **109**, 106479 (2020).
281. Leweke, F. M. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Translational Psychiatry*.
282. Leweke, F. M. *et al.* Cannabidiol and Amisulpride Improve Cognition in Acute Schizophrenia in an Explorative, Double-Blind, Active-Controlled, Randomized Clinical Trial. *Front. Pharmacol.* **12**, 614811 (2021).
283. Li, H., Pullmann, D., Cho, J. Y., Eid, M. & Jhou, T. C. Generality and opponency of rostromedial tegmental (RMTg) roles in valence processing. *Elife* **8**, e41542 (2019).
284. Li, H. *et al.* Three Rostromedial Tegmental Afferents Drive Triply Dissociable Aspects of Punishment Learning and Aversive Valence Encoding. *Neuron* **104**, 987-999.e4 (2019).
285. Li, W. & Richard, D. Effects of Bariatric Surgery on Energy Homeostasis. *Canadian Journal of Diabetes* **41**, 426–431 (2017).
286. Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J.-M. & Lustig, R. H. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**, 251–264 (2010).

287. Linardon, J. & Messer, M. Assessment of food addiction using the Yale Food Addiction Scale 2.0 in individuals with binge-eating disorder symptomatology: Factor structure, psychometric properties, and clinical significance. *Psychiatry Research* **279**, 216–221 (2019).
288. Lindqvist, A., Baelemans, A. & Erlanson-Albertsson, C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regulatory Peptides* **150**, 26–32 (2008).
289. Link, J. C. & Reue, K. Genetic Basis for Sex Differences in Obesity and Lipid Metabolism. *Annu Rev Nutr* **37**, 225–245 (2017).
290. Liu, S. *et al.* Consumption of palatable food primes food approach behavior by rapidly increasing synaptic density in the VTA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 2520–2525 (2016).
291. Liu, X. *et al.* The orexinergic neural pathway from the lateral hypothalamus to the nucleus accumbens and its regulation of palatable food intake. *Neuropeptides* **80**, 102028 (2020).
292. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method.
293. Loureiro, M. *et al.* The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *Journal of Neuroscience* **32**, 9947–9959 (2012).
294. Lowe, H., Toyang, N., Steele, B., Bryant, J. & Ngwa, W. The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases. *IJMS* **22**, 9472 (2021).
295. Lu, H.-C. & Mackie, K. Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* **6**, 607–615 (2021).
296. Lupica, C. R. & Riegel, A. C. Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology* **48**, 1105–1116 (2005).
297. Lutter, M. & Nestler, E. J. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *J Nutr* **139**, 629–632 (2009).
298. Lutz, T. A. & Woods, S. C. Overview of Animal Models of Obesity. *Current Protocols in Pharmacology*.
299. MacDowell, K. S. *et al.* Effects of the antipsychotic paliperidone on stress-induced changes in the endocannabinoid system in rat prefrontal cortex. *World J Biol Psychiatry* **18**, 457–470 (2017).
300. Mahler, S. V., Smith, K. S. & Berridge, K. C. Endocannabinoid Hedonic Hotspot for Sensory Pleasure: Anandamide in Nucleus Accumbens Shell Enhances ‘Liking’ of a Sweet Reward. *Neuropsychopharmacol* **32**, 2267–2278 (2007).
301. Malone, D. T. & Taylor, D. A. Modulation by ¹¹C-¹¹R-¹¹Uoxetine of striatal dopamine release following D9-tetrahydrocannabinol: a microdialysis study in conscious rats.
302. Malvaez, M., Shieh, C., Murphy, M. D., Greenfield, V. Y. & Wassum, K. M. Distinct cortical–amygdala projections drive reward value encoding and retrieval. *Nat Neurosci* **22**, 762–769 (2019).
303. Manzoni, G. M. *et al.* Structural validity, measurement invariance, reliability and diagnostic accuracy of the Italian version of the Yale Food Addiction Scale 2.0 in patients with severe obesity and the general population. *Eat Weight Disord* **26**, 345–366 (2021).
304. Margolis, E. B., Toy, B., Himmels, P., Morales, M. & Fields, H. L. Identification of rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *PLoS One* **7**, e42365 (2012).
305. Markianos, M., Evangelopoulos, M.-E., Koutsis, G. & Sfagos, C. Elevated CSF serotonin

- and dopamine metabolite levels in overweight subjects: CSF Metabolite Levels in Overweight Subjects. *Obesity* **21**, 1139–1142 (2013).
306. Marsicano, G. & Lutz, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J of Neuroscience* **11**, 4213–4225 (1999).
307. Martín-García, E., Domingo-Rodriguez, L. & Maldonado, R. An Operant Conditioning Model Combined with a Chemogenetic Approach to Study the Neurobiology of Food Addiction in Mice. *Bio Protoc* **10**, e3777 (2020).
308. Martire, S. I., Holmes, N., Westbrook, R. F. & Morris, M. J. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *PLoS One* **8**, e60407 (2013).
309. Maryam Sorkhou *et al.* Effects of 28 days of cannabis abstinence on cognition in major depressive disorder: A pilot study.
310. Matamales, M. *et al.* Striatal Medium-Sized Spiny Neurons: Identification by Nuclear Staining and Study of Neuronal Subpopulations in BAC Transgenic Mice. *PLoS ONE* **4**, e4770 (2009).
311. Mathis, V. Implication de l'habénula latérale dans les processus mnésiques chez le rat.
312. Mathis, V., Cosquer, B., Avallone, M., Cassel, J.-C. & Lecourtier, L. Excitatory Transmission to the Lateral Habenula Is Critical for Encoding and Retrieval of Spatial Memory. *Neuropsychopharmacol* **40**, 2843–2851 (2015).
313. Matias, I., Belluomo, I. & Cota, D. The Fat Side of the Endocannabinoid System: Role of Endocannabinoids in the Adipocyte. *Cannabis and Cannabinoid Research* **1**, 176–185 (2016).
314. Matikainen-Ankney, B. A. *et al.* Nucleus Accumbens D1 Receptor–Expressing Spiny Projection Neurons Control Food Motivation and Obesity. *Biological Psychiatry* **93**, 512–523 (2023).
315. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561–564 (1990).
316. Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* **447**, 1111–1115 (2007).
317. Mayo, L. M. *et al.* Protective effects of elevated anandamide on stress and fear-related behaviors: translational evidence from humans and mice. *Mol Psychiatry* **25**, 993–1005 (2020).
318. Mazzone, C. M. *et al.* High-fat food biases hypothalamic and mesolimbic expression of consummatory drives. *Nat Neurosci* **23**, 1253–1266 (2020).
319. McElroy, S. L. *et al.* Lisdexamfetamine Dimesylate for Adults with Moderate to Severe Binge Eating Disorder: Results of Two Pivotal Phase 3 Randomized Controlled Trials. *Neuropsychopharmacol* **41**, 1251–1260 (2016).
320. McGuire, P. *et al.* Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *AJP* **175**, 225–231 (2018).
321. McLaughlin, R. J., Hill, M. N. & Gorzalka, B. B. A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **42**, 116–131 (2014).
322. Meadows, A. *et al.* Deletion of G-protein-coupled receptor 55 promotes obesity by reducing physical activity. *Int J Obes* **40**, 417–424 (2016).

323. Meier, U. A note on the power of Fisher's least significant difference procedure. *Pharmaceut. Statist.* **5**, 253–263 (2006).
324. Melis, M. *et al.* Enhanced Endocannabinoid-Mediated Modulation of Rostromedial Tegmental Nucleus Drive onto Dopamine Neurons in Sardinian Alcohol-Preferring Rats. *Journal of Neuroscience* **34**, 12716–12724 (2014).
325. Melis, M. *et al.* Electrophysiological properties of dopamine neurons in the ventral tegmental area of Sardinian alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology* **201**, 471–481 (2009).
326. Melse, M., Temel, Y., Tan, S. K. & Jahanshahi, A. Deep brain stimulation of the rostromedial tegmental nucleus: An unanticipated, selective effect on food intake. *Brain Research Bulletin* **127**, 23–28 (2016).
327. Micale, V., Di Marzo, V., Sulcova, A., Wotjak, C. T. & Drago, F. Endocannabinoid system and mood disorders: Priming a target for new therapies. *Pharmacology & Therapeutics* **138**, 18–37 (2013).
328. Mickelsen, O., Takahashi, S. & Craig, C. Experimental Obesity I. Production of Obesity in Rats by Feeding High-Fat Diets. *The Journal of Nutrition* **57**, 541–554 (1955).
329. Miller, M. L. *et al.* Adolescent exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol alters the transcriptional trajectory and dendritic architecture of prefrontal pyramidal neurons. *Mol Psychiatry* **24**, 588–600 (2019).
330. Milosavljevic, N., Cehajic-Kapetanovic, J., Procyk, C. A. & Lucas, R. J. Chemogenetic Activation of Melanopsin Retinal Ganglion Cells Induces Signatures of Arousal and/or Anxiety in Mice. *Current Biology* **26**, 2358–2363 (2016).
331. Minnaard, A. M. Increased elasticity of sucrose demand during hyperdopaminergic states in rats. (2022).
332. Mohammad, H. A neural circuit for excessive feeding driven by environmental context in mice. *Nature Neuroscience* **24**, (2021).
333. Montague, C. T. *et al.* Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* **387**, 903–908 (1997).
334. Monteleone, P. *et al.* Blood Levels of the Endocannabinoid Anandamide are Increased in Anorexia Nervosa and in Binge-Eating Disorder, but not in Bulimia Nervosa. *Neuropsychopharmacol* **30**, 1216–1221 (2005).
335. Monteleone, P., Milano, W., Petrella, C., Canestrelli, B. & Maj, M. Endocannabinoid Pro129Thr FAAH Functional Polymorphism But Not 1359G/A CNR1 Polymorphism Is Associated With Antipsychotic-Induced Weight Gain. *Journal of Clinical Psychopharmacology* **30**, 441–445 (2010).
336. Monti, J. M. Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews* (2011).
337. Morales, M. & Margolis, E. B. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* **18**, 73–85 (2017).
338. Morales, P. & Reggio, P. H. An Update on Non-CB₁, Non-CB₂ Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors. *Cannabis and Cannabinoid Research* **2**, 265–273 (2017).
339. Mullett, M. A., Billington, C. J., Levine, A. S. & Kotz, C. M. Hypocretin 1 in the lateral hypothalamus activates key feeding-regulatory brain sites.
340. Muñoz-Manchado, A. B. *et al.* Diversity of Interneurons in the Dorsal Striatum Revealed by Single-Cell RNA Sequencing and PatchSeq. *Cell Reports* **24**, 2179-2190.e7 (2018).
341. Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61–65 (1993).

342. Murillo-Rodríguez, E., Cabeza, R., Méndez-Díaz, M., Navarro, L. & Prospéro-García, O. Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport* **12**, 2131–2136 (2001).
343. Murillo-Rodríguez, E., Millán-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Mechoulam, R. & Drucker-Colín, R. Cannabidiol, a constituent of *Cannabis sativa*, modulates sleep in rats. *FEBS Letters* **580**, 4337–4345 (2006).
344. Murillo-Rodríguez, E., Palomero-Rivero, M., Millán-Aldaco, D., Arias-Carrión, O. & Drucker-Colín, R. Administration of URB597, Oleoylethanolamide or Palmitoylethanolamide Increases Waking and Dopamine in Rats. *PLoS ONE* **6**, e20766 (2011).
345. Nagai, Y. *et al.* Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nat Neurosci* **23**, 1157–1167 (2020).
346. Nair-Roberts, R. G. *et al.* Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* **152**, 1024–1031 (2008).
347. Najib, J. The efficacy and safety profile of lisdexamfetamine dimesylate, a prodrug of d-amphetamine, for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adults. *Clin Ther* **31**, 142–176 (2009).
348. Naneix, F. *et al.* Impact of Early Consumption of High-Fat Diet on the Mesolimbic Dopaminergic System. *eNeuro* **4**, ENEURO.0120-17.2017 (2017).
349. Narayanaswami, V., Thompson, A. C., Cassis, L. A., Bardo, M. T. & Dvoskin, L. P. Diet-induced obesity: dopamine transporter function, impulsivity and motivation. *Int J Obes* **37**, 1095–1103 (2013).
350. Narushima, M., Uchigashima, M., Hashimoto, K., Watanabe, M. & Kano, M. Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *Eur J of Neuroscience* **24**, 2246–2252 (2006).
351. Navandar, M. *et al.* Transcriptional signatures in prefrontal cortex confer vulnerability versus resilience to food and cocaine addiction-like behavior. *Sci Rep* **11**, 9076 (2021).
352. Nentwig, T. B. *et al.* The lateral habenula is not required for ethanol dependence-induced escalation of drinking. *Neuropsychopharmacol.* **47**, 2123–2131 (2022).
353. Nestler, E. J. Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Phil. Trans. R. Soc. B* **363**, 3245–3255 (2008).
354. Nieh, E. H. *et al.* Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron* **90**, 1286–1298 (2016).
355. Nishi, A., Kuroiwa, M. & Shuto, T. Mechanisms for the Modulation of Dopamine D1 Receptor Signaling in Striatal Neurons. *Front. Neuroanat.* **5**, (2011).
356. Noble, E. P. The D2 dopamine receptor gene: A review of association studies in alcoholism. *Behav Genet* **23**, 119–129 (1993).
357. Novelli, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* **41**, 111–119 (2007).
358. Oades, R. D. & Halliday, G. M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity.
359. Oginsky, M. F., Goforth, P. B., Nobile, C. W., Lopez-Santiago, L. F. & Ferrario, C. R.

- Eating ‘Junk-Food’ Produces Rapid and Long-Lasting Increases in NAc CP-AMPA Receptors: Implications for Enhanced Cue-Induced Motivation and Food Addiction. *Neuropsychopharmacol* **41**, 2977–2986 (2016).
360. Okere, I. C. *et al.* Low Carbohydrate/High-Fat Diet Attenuates Cardiac Hypertrophy, Remodeling, and Altered Gene Expression in Hypertension. *Hypertension* **48**, 1116–1123 (2006).
361. Ong, Z. Y. & Muhlhausler, B. S. Maternal “junk-food” feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB j.* **25**, 2167–2179 (2011).
362. Osei-Hyiaman, D. *et al.* Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **115**, 1298–1305 (2005).
363. Osei-Hyiaman, D. *et al.* 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 (2008).
364. Pang, Y., Kiba, H. & Jayaraman, A. Acute nicotine injections induce c-fos mostly in non-dopaminergic neurons of the midbrain of the rat. *Molecular Brain Research* **20**, 162–170 (1993).
365. Pankevich, D. E., Teegarden, S. L., Hedin, A. D., Jensen, C. L. & Bale, T. L. Caloric Restriction Experience Reprograms Stress and Orexigenic Pathways and Promotes Binge Eating. *J. Neurosci.* **30**, 16399–16407 (2010).
366. Papatheodorou, K., Banach, M., Edmonds, M., Papanas, N. & Papazoglou, D. Complications of Diabetes. *Journal of Diabetes Research* **2015**, 1–5 (2015).
367. Park, S., Harrold, J. A., Widdowson, P. S. & Williams, G. Increased binding at 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats. *Brain Research* **847**, 90–97 (1999).
368. Parrilla-Carrero, J., Eid, M., Li, H., Chao, Y. S. & Jhou, T. C. Synaptic Adaptations at the Rostromedial Tegmental Nucleus Underlie Individual Differences in Cocaine Avoidance Behavior. *J. Neurosci.* **41**, 4620–4630 (2021).
369. Pataky, Z. *et al.* Efficacy of rimonabant in obese patients with binge eating disorder. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **121**, 20–26 (2012).
370. Patkar, O. L. *et al.* A binge high sucrose diet provokes systemic and cerebral inflammation in rats without inducing obesity. *Sci Rep* **11**, 11252 (2021).
371. Paxinos & Watson. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Third Edition.*
372. Peciña, S. & Berridge, K. C. Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic ‘liking’ for food: map based on microinjection Fos plumes. *Brain Research* **863**, 71–86 (2000).
373. Peciña, S. & Berridge, K. C. Hedonic Hot Spot in Nucleus Accumbens Shell: Where Do μ -Opioids Cause Increased Hedonic Impact of Sweetness? *J. Neurosci.* **25**, 11777–11786 (2005).
374. Peleg-Raibstein, D. *et al.* Enhanced sensitivity to drugs of abuse and palatable foods following maternal overnutrition. *Transl Psychiatry* **6**, e911–e911 (2016).
375. Peng, J. *et al.* A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic Clin Pharma Tox* **130**, 439–456 (2022).
376. Pérez-Morales, M. 2-AG into the lateral hypothalamus increases REM sleep and cFos expression in melanin concentrating hormone neurons in rats. (2013).

377. Perrotti, L. I., Wallace, D. L., Self, D. W., Nestler, E. J. & Barrot, M. FosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *European Journal of Neuroscience* (2005).
378. Pertwee, R. Receptors and Channels Targeted by Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists and Antagonists. *CMC* **17**, 1360–1381 (2010).
379. Picciolo, G. *et al.* β -Caryophyllene Reduces the Inflammatory Phenotype of Periodontal Cells by Targeting CB2 Receptors. *Biomedicines* **8**, 164 (2020).
380. Pinto, S. *et al.* Rapid Rewiring of Arcuate Nucleus Feeding Circuits by Leptin. *Science* **304**, 110–115 (2004).
381. Piper, B. J. *et al.* Substitution of medical cannabis for pharmaceutical agents for pain, anxiety, and sleep. *J Psychopharmacol* **31**, 569–575 (2017).
382. Pistell, P. J. *et al.* Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of Neuroimmunology* **219**, 25–32 (2010).
383. Poleszak, E. *et al.* Ligands of the CB2 cannabinoid receptors augment activity of the conventional antidepressant drugs in the behavioural tests in mice. *Behavioural Brain Research* **378**, 112297 (2020).
384. Porcella, A., Maxia, C., Gessa, G. L. & Pani, L. The synthetic cannabinoid WIN55212-2 decreases the intraocular pressure in human glaucoma resistant to conventional therapies. *Eur J of Neuroscience* **13**, 409–412 (2001).
385. Pucci, M. *et al.* Endocannabinoid System Regulation in Female Rats with Recurrent Episodes of Binge Eating. *IJMS* **23**, 15228 (2022).
386. Quina, L. A. *et al.* Efferent Pathways of the Mouse Lateral Habenula. *J of Comparative Neurology* **523**, 32–60 (2015).
387. Rajaraman, G., Simcocks, A., Hryciw, D. H., Hutchinson, D. S. & McAinch, A. J. G protein coupled receptor 18: A potential role for endocannabinoid signaling in metabolic dysfunction. *Molecular Nutrition Food Res* **60**, 92–102 (2016).
388. Rezende, B. & Alencar, A. K. N. Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. (2023).
389. Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J. & Manzoni, O. J. Localization and Mechanisms of Action of Cannabinoid Receptors at the Glutamatergic Synapses of the Mouse Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* **21**, 109–116 (2001).
390. Roehrs, T. A. & Roth, T. Sleep Disturbance in Substance Use Disorders. *Psychiatric Clinics of North America* **38**, 793–803 (2015).
391. Rolls, E. T. *et al.* The relative attenuation of self-stimulation, eating and drinking produced by dopamine-receptor blockade. *Psychopharmacologia* **38**, 219–230 (1974).
392. Roshan, M. H. K., Tambo, A. & Pace, N. P. Potential Role of Caffeine in the Treatment of Parkinson's Disease. *TONEUJ* **10**, 42–58 (2016).
393. Rospond, B. Assessment of metabolic and hormonal profiles and striatal dopamine D2 receptor expression following continuous or scheduled high-fat or high-sucrose diet in rats.
394. Roth, B. Multiple Serotonin Receptors: Clinical and Experimental Aspects. *Ann. of Clinical Psychiatry* **6**, 67–78 (1994).
395. Rothman, D. L., Magnusson, I., Katz, L. D., Shulman, R. G. & Shulman, G. I. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ^{13}C NMR. *Science* **254**, 573–576 (1991).
396. Routh, V. H., Stern, J. S. & Horwitz, B. A. Serotonergic activity is depressed in the

- ventromedial hypothalamic nucleus of 12-day-old obese Zucker rats. *Am J Physiol* **267**, R712-719 (1994).
397. Rubino, T. *et al.* The Depressive Phenotype Induced in Adult Female Rats by Adolescent Exposure to THC is Associated with Cognitive Impairment and Altered Neuroplasticity in the Prefrontal Cortex. *Neurotox Res* **15**, 291–302 (2009).
 398. Ruff, R. R., Akhund, A., Adjoian, T. & Kansagra, S. M. Calorie Intake, Sugar-Sweetened Beverage Consumption, and Obesity Among New York City Adults: Findings from a 2013 Population Study Using Dietary Recalls. *J Community Health* **39**, 1117–1123 (2014).
 399. Ruiz de Azua, I. *et al.* Cannabinoid CB1 receptor in dorsal telencephalic glutamatergic neurons drives overconsumption of palatable food and obesity. *Neuropsychopharmacology* **46**, 982–991 (2021).
 400. Ryberg, E. *et al.* The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British J Pharmacology* **152**, 1092–1101 (2007).
 401. Sackett, D. A., Saddoris, M. P. & Carelli, R. M. Nucleus Accumbens Shell Dopamine Preferentially Tracks Information Related to Outcome Value of Reward. *eNeuro* **4**, ENEURO.0058-17.2017 (2017).
 402. Sakurai, T. *et al.* Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell* **92**, 573–585 (1998).
 403. Sánchez-Catalán, M.-J. & Barrot, M. Fos response of the tail of the ventral tegmental area to food restriction entails a prediction error processing. *Behavioural Brain Research* **425**, 113826 (2022).
 404. Satta, V. *et al.* Limited Access to a High Fat Diet Alters Endocannabinoid Tone in Female Rats. *Front. Neurosci.* **12**, 40 (2018).
 405. Scammell, T. E. *et al.* Hypothalamic Arousal Regions Are Activated during Modafinil-Induced Wakefulness. *J. Neurosci.* **20**, 8620–8628 (2000).
 406. Schneider, E. *et al.* The effects of lisdexamfetamine dimesylate on eating behaviour and homeostatic, reward and cognitive processes in women with binge-eating symptoms: an experimental medicine study. *Transl Psychiatry* **12**, 9 (2022).
 407. Schulte, E. M., Avena, N. M. & Gearhardt, A. N. Which Foods May Be Addictive? The Roles of Processing, Fat Content, and Glycemic Load. *PLoS ONE* **10**, e0117959 (2015).
 408. Schulte, E. M. & Gearhardt, A. N. Development of the Modified Yale Food Addiction Scale Version 2.0. *Euro Eating Disorders Rev* **25**, 302–308 (2017).
 409. Schultz, W., Dayan, P. & Montague, P. R. A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science* **275**, 1593–1599 (1997).
 410. Schurman, L. D. *et al.* Diacylglycerol Lipase-Alpha Regulates Hippocampal-Dependent Learning and Memory Processes in Mice. *J. Neurosci.* **39**, 5949–5965 (2019).
 411. Sciolino, N. R., Zhou, W. & Hohmann, A. G. Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats. *Pharmacological Research* **64**, 226–234 (2011).
 412. Seo, D. *et al.* A GABAergic Projection from the Centromedial Nuclei of the Amygdala to Ventromedial Prefrontal Cortex Modulates Reward Behavior. *J. Neurosci.* **36**, 10831–10842 (2016).
 413. Seo, S. *et al.* A schizophrenia risk factor induces marked anatomical deficits at GABAERGIC -dopaminergic synapses in the rat ventral tegmental area: Essential

- evidence for new targeted therapies. *J of Comparative Neurology* **529**, 3946–3973 (2021).
414. Sharma, P. & Pienaar, I. S. The Use of DREADDs for Dissecting the Contribution of Cellular and Neural Circuit Mechanisms in Models of Neurodegenerative Disease. in *Molecular-Genetic and Statistical Techniques for Behavioral and Neural Research* 565–596 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-804078-2.00024-6.
 415. Sharma, S., Fernandes, M. F. & Fulton, S. Adaptations in brain reward circuitry underlie palatable food cravings and anxiety induced by high-fat diet withdrawal. *Int J Obes* **37**, 1183–1191 (2013).
 416. Sheng, Z., Santiago, A. M., Thomas, M. P. & Routh, V. H. Metabolic regulation of lateral hypothalamic glucose-inhibited orexin neurons may influence midbrain reward neurocircuitry. *Molecular and Cellular Neuroscience* **62**, 30–41 (2014).
 417. Sheth, C., Furlong, T. M., Keefe, K. A. & Taha, S. A. Lesion of the rostromedial tegmental nucleus increases voluntary ethanol consumption and accelerates extinction of ethanol-induced conditioned taste aversion. *Psychopharmacology* **233**, 3737–3749 (2016).
 418. Shibata, R., Kameishi, M., Kondoh, T. & Torii, K. Bilateral dopaminergic lesions in the ventral tegmental area of rats influence sucrose intake, but not umami and amino acid intake. *Physiology & Behavior* **96**, 667–674 (2009).
 419. Shrestha, R., Dixon, R. A. & Chapman, K. D. Molecular Identification of a Functional Homologue of the Mammalian Fatty Acid Amide Hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 34990–34997 (2003).
 420. Sidlo, J., Zaviacic, M. & Kvasnicka, P. Night and day differences in the food-intake of laboratory rats Wistar and Koletsky strains. *Bratisl Lek Listy* **96**, 655–657 (1995).
 421. Siegal, P. S. Food intake in the rat in relation to the dark-light cycle. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **54**, 294–301 (1961).
 422. Siemian, J. N. *et al.* Lateral hypothalamic LEPR neurons drive appetitive but not consummatory behaviors. *Cell Reports* **36**, 109615 (2021).
 423. Silva, B. A. D., Bjørnb, C., Uotani, S. & Flier, J. S. Functional Properties of Leptin Receptor Isoforms Containing the Gln→Pro Extracellular Domain Mutation of the Fatty Rat. **139**, (1998).
 424. Singh, U. *et al.* Collateralizing ventral subiculum melanocortin 4 receptor circuits regulate energy balance and food motivation. *Physiology & Behavior* **262**, 114105 (2023).
 425. Sink, K. S., Vemuri, V. K., Wood, J., Makriyannis, A. & Salamone, J. D. Oral bioavailability of the novel cannabinoid CB1 antagonist AM6527: effects on food-reinforced behavior and comparisons with AM4113. *Pharmacol Biochem Behav* **91**, 303–306 (2009).
 426. Slomp, M. *et al.* Stressing the importance of choice: Validity of a preclinical free-choice high-caloric diet paradigm to model behavioural, physiological and molecular adaptations during human diet-induced obesity and metabolic dysfunction. *J Neuroendocrinol* **31**, e12718 (2019).
 427. Smith, R. J., Vento, P. J., Chao, Y. S., Good, C. H. & Jhou, T. C. Gene expression and neurochemical characterization of the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) in rats and mice. *Brain Struct Funct* **224**, 219–238 (2019).
 428. Smoker, M. P., Mackie, K., Lapish, C. C. & Boehm, S. L. Self-administration of edible Δ9-tetrahydrocannabinol and associated behavioral effects in mice. *Drug and Alcohol Dependence* **199**, 106–115 (2019).
 429. Soares-Cunha, C. *et al.* Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both

- reward and aversion. *Mol Psychiatry* **25**, 3241–3255 (2020).
430. Soares-Cunha, C. *et al.* Distinct role of nucleus accumbens D2-MSN projections to ventral pallidum in different phases of motivated behavior. *Cell Reports* **38**, 110380 (2022).
431. Sofia, R. D. & Knobloch, L. C. Comparative effects of various naturally occurring cannabinoids on food, sucrose and water consumption by rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **4**, 591–599 (1976).
432. Soria-Gómez, E. *et al.* Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *British J Pharmacology* **151**, 1109–1116 (2007).
433. Soto, M. *et al.* Intermittent access to liquid sucrose differentially modulates energy intake and related central pathways in control or high-fat fed mice. *Physiology & Behavior* **140**, 44–53 (2015).
434. Spector, A. C. & Smith, J. C. A detailed analysis of sucrose drinking in the rat. *Physiol Behav* **33**, 127–136 (1984).
435. Spitzer, R. L. *et al.* Binge eating disorder: Its further validation in a multisite study. *Intl J Eating Disorders* **13**, 137–153 (1993).
436. Stamatakis, A. M. *et al.* Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward. *J Neurosci* **36**, 302–311 (2016).
437. Steele, K. E. *et al.* Alterations of Central Dopamine Receptors Before and After Gastric Bypass Surgery. *OBES SURG* **20**, 369–374 (2010).
438. Steffensen, S. C. *et al.* Cocaine disinhibits dopamine neurons in the ventral tegmental area via use-dependent blockade of GABA neuron voltage-sensitive sodium channels. *Eur J of Neuroscience* **28**, 2028–2040 (2008).
439. Stella, N., Schweitzer, P. & Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773–778 (1997).
440. Stice, E., Spoor, S., Bohon, C. & Small, D. M. Relation Between Obesity and Blunted Striatal Response to Food Is Moderated by *Taq IA A1* Allele. *Science* **322**, 449–452 (2008).
441. Stringfield, S. J. Intravenous self-administration of delta-9-THC in adolescent rats produces long-lasting alterations in behavior and receptor protein expression.
442. Suárez-Ortiz, J. O. *et al.* Intra-accumbens Raclopride Administration Prevents Behavioral Changes Induced by Intermittent Access to Sucrose Solution. *Front. Neurosci.* **12**, 74 (2018).
443. Sugiura, T. & Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chemistry and Physics of Lipids* **108**, 89–106 (2000).
444. Suleiman, J., Mohamed, M. & Bakar, A. A systematic review on different models of inducing obesity in animals: Advantages and limitations. *J Adv Vet Anim Res* **7**, 103 (2020).
445. Sun, Y. *et al.* Rostromedial tegmental nucleus-substantia nigra pars compacta circuit mediates aversive and despair behavior in mice. *Experimental Neurology* **333**, 113433 (2020).
446. Szutorisz, H., Egervári, G., Sperry, J., Carter, J. M. & Hurd, Y. L. Cross-generational THC exposure alters the developmental sensitivity of ventral and dorsal striatal gene expression in male and female offspring. *Neurotoxicology and Teratology* **58**, 107–114

- (2016).
447. Takeuchi, Y., Satoda, T., Tashiro, T., Matsushima, R. & Uemura-Sumi, M. Amygdaloid pathway to the trigeminal motor nucleus via the pontine reticular formation in the rat. *Brain Research Bulletin* **21**, 829–833 (1988).
 448. Taylor, N. E. *et al.* The rostromedial tegmental nucleus: a key modulator of pain and opioid analgesia. *Pain* **160**, 2524–2534 (2019).
 449. Teegala, S. B. *et al.* Lateral hypothalamus hypocretin/orexin glucose-inhibited neurons promote food seeking after calorie restriction. *Molecular Metabolism* **76**, 101788 (2023).
 450. Teegarden, S. L. & Bale, T. L. Decreases in Dietary Preference Produce Increased Emotionality and Risk for Dietary Relapse. *Biological Psychiatry* **61**, 1021–1029 (2007).
 451. Tenk, C. M. & Felfeli, T. Sucrose and fat content significantly affects palatable food consumption in adolescent male and female rats. *Appetite* **118**, 49–59 (2017).
 452. Terrill, S. J. *et al.* Nucleus accumbens melanin-concentrating hormone signaling promotes feeding in a sex-specific manner. *Neuropharmacology* **178**, 108270 (2020).
 453. Tervo, D. G. R. *et al.* A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron* **92**, 372–382 (2016).
 454. Thomas, C. S. *et al.* Optogenetic stimulation of lateral hypothalamic orexin/dynorphin inputs in the ventral tegmental area potentiates mesolimbic dopamine neurotransmission and promotes reward-seeking behaviours. *Neuropsychopharmacol.* **47**, 728–740 (2022).
 455. Thornton-Jones, Z. D. *et al.* The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist, rimonabant, modifies body weight and adiponectin function in diet-induced obese rats as a consequence of reduced food intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **84**, 353–359 (2006).
 456. Treit, D. & Berridge, K. C. A comparison of benzodiazepine, serotonin, and dopamine agents in the taste-reactivity paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **37**, 451–456 (1990).
 457. Tsai, C. The optic tracts and centers of the opossum. *Didelphis virginiana*. *J. Comp. Neurol.* **39**, 173–216 (1925).
 458. Tudurí, E. *et al.* GPR55: a new promising target for metabolism? *Journal of Molecular Endocrinology* **58**, R191–R202 (2017).
 459. Tunisi, L. *et al.* Orexin-A/Hypocretin-1 Controls the VTA-NAc Mesolimbic Pathway via Endocannabinoid-Mediated Disinhibition of Dopaminergic Neurons in Obese Mice. *Front. Synaptic Neurosci.* **13**, 622405 (2021).
 460. Van De Giessen, E. *et al.* No association between striatal dopamine transporter binding and body mass index: A multi-center European study in healthy volunteers. *NeuroImage* **64**, 61–67 (2013).
 461. Van Egroo, M., Koshmanova, E., Vandewalle, G. & Jacobs, H. I. L. Importance of the locus coeruleus-norepinephrine system in sleep-wake regulation: Implications for aging and Alzheimer's disease. *Sleep Medicine Reviews* **62**, 101592 (2022).
 462. Vetter, T. R. *Fundamentals of Research Data and Variables: The Devil Is in the Details.* (2017).
 463. Vialou, V. *et al.* A role for Δ FosB in calorie restriction-induced metabolic changes. *Biol Psychiatry* **70**, 204–207 (2011).
 464. Vianna, C. R. *et al.* Cannabinoid Receptor 1 in the Vagus Nerve Is Dispensable for Body Weight Homeostasis But Required for Normal Gastrointestinal Motility. *Journal of Neuroscience* **32**, 10331–10337 (2012).

465. Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Baler, R. & Telang, F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology* **56**, 3–8 (2009).
466. Volkow, N. D. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. **15**, (2011).
467. Volkow, N. D. & Boyle, M. Neuroscience of Addiction: Relevance to Prevention and Treatment. *AJP* **175**, 729–740 (2018).
468. Volkow, N. D. *et al.* Loss of Dopamine Transporters in Methamphetamine Abusers Recovers with Protracted Abstinence. *J. Neurosci.* **21**, 9414–9418 (2001).
469. Wang, G.-J. *et al.* BMI Modulates Calorie-Dependent Dopamine Changes in Accumbens from Glucose Intake. *PLoS ONE* **9**, e101585 (2014).
470. Wang, G.-J. *et al.* Brain dopamine and obesity. *The Lancet* **357**, 354–357 (2001).
471. Wang, G. *et al.* Enhanced Striatal Dopamine Release During Food Stimulation in Binge Eating Disorder. *Obesity* **19**, 1601–1608 (2011).
472. Wang, S. *et al.* Cannabinoid receptor 1 signaling in hepatocytes and stellate cells does not contribute to NAFLD. *Journal of Clinical Investigation* **131**, e152242 (2021).
473. Wang, X.-F. *et al.* Endogenous Glucagon-like peptide-1 suppresses high-fat food intake by reducing synaptic drive onto mesolimbic dopamine neurons. (2016).
474. Watanabe, S., Doshi, M. & Hamazaki, T. n-3 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **69**, 51–59 (2003).
475. Wei, D. *et al.* A role for the endocannabinoid 2-arachidonoyl-sn-glycerol for social and high-fat food reward in male mice. *Psychopharmacology* **233**, 1911–1919 (2016).
476. Wei, S., Hertle, S., Spanagel, R. & Bilbao, A. Female mice are more prone to develop an addictive-like phenotype for sugar consumption. *Sci Rep* **11**, 7364 (2021).
477. Weitz, M., Khayat, A. & Yaka, R. GABAergic projections to the ventral tegmental area govern cocaine-conditioned reward. *Addiction Biology* **26**, e13026 (2021).
478. Willford, J. A., Goldschmidt, L., De Genna, N. M., Day, N. L. & Richardson, G. A. A longitudinal study of the impact of marijuana on adult memory function: Prenatal, adolescent, and young adult exposures. *Neurotoxicology and Teratology* **84**, 106958 (2021).
479. Wu, C., Garamszegi, S. P., Xie, X. & Mash, D. C. Altered Dopamine Synaptic Markers in Postmortem Brain of Obese Subjects. *Front. Hum. Neurosci.* **11**, 386 (2017).
480. Xu, P. *et al.* Activation of Serotonin 2C Receptors in Dopamine Neurons Inhibits Binge-like Eating in Mice. *Biol Psychiatry* **81**, 737–747 (2017).
481. Yamanaka, A. *et al.* Hypothalamic Orexin Neurons Regulate Arousal According to Energy Balance in Mice. *Neuron* **38**, 701–713 (2003).
482. Yamashita, T. & Yamanaka, A. Lateral hypothalamic circuits for sleep–wake control. *Current Opinion in Neurobiology* **44**, 94–100 (2017).
483. Yang, C. F. *et al.* Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. *Cell* **153**, 896–909 (2013).
484. Yang, H., Zhou, J. & Lehmann, C. GPR55 – a putative “type 3” cannabinoid receptor in inflammation. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* **27**, 297–302 (2016).
485. Yang, S.-R. *et al.* The rostromedial tegmental nucleus is essential for non-rapid eye movement sleep. *PLoS Biol* **16**, e2002909 (2018).
486. Ye, Q., Nunez, J. & Zhang, X. Raphe serotonin projections dynamically regulate feeding

- behavior through targeting inhibitory circuits from rostral zona incerta to paraventricular thalamus. *Molecular Metabolism* **66**, 101634 (2022).
487. Yin, H. H., Knowlton, B. J. & Balleine, B. W. Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur J of Neuroscience* **19**, 181–189 (2004).
488. Yin, H. H., Ostlund, S. B., Knowlton, B. J. & Balleine, B. W. The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur J of Neuroscience* **22**, 513–523 (2005).
489. Youssef, D. A., El-Fayoumi, H. M. & Mahmoud, M. F. Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR- γ receptors. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **110**, 145–154 (2019).
490. Yu, Y., Miller, R. & Groth, S. W. A literature review of dopamine in binge eating. *J Eat Disord* **10**, 11 (2022).
491. Zetterström, T., Sharp, T. & Ungerstedt, U. Effect of neuroleptic drugs on striatal dopamine release and metabolism in the awake rat studied by intracerebral dialysis. *European Journal of Pharmacology* **106**, 27–37 (1984).
492. Zhan, C. *et al.* Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively. *J. Neurosci.* **33**, 3624–3632 (2013).
493. Zhang, H.-Y. *et al.* Cannabinoid CB₂ receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, (2014).
494. Zhang, H. *et al.* Expression of functional cannabinoid CB₂ receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addiction Biology* **22**, 752–765 (2017).
495. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
496. Zhao, Y.-N. *et al.* GABAergic neurons in the rostromedial tegmental nucleus are essential for rapid eye movement sleep suppression. *Nat Commun* **13**, 7552 (2022).
497. Zhu, C. *et al.* Somatostatin Neurons in the Basal Forebrain Promote High-Calorie Food Intake. *Cell Reports* **20**, 112–123 (2017).
498. Zweifel, L. S. *et al.* Activation of dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety. *Nat Neurosci* **14**, 620–626 (2011).
499. WHO European Regional Obesity: Report 2022. (World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen, 2022).

Annexe Nouveau Chapitre de la thèse (NCT)

ANNEXE : Nouveau chapitre de la thèse (NCT)



Cette section de la thèse est un rapport que j'ai réalisé lors d'une formation « Nouveau Chapitre de la thèse » dont le but était de prendre un point de vue d'ensemble sur son travail de thèse afin d'y dégager les compétences acquises et identifier les pistes professionnelles post-thèses les plus adéquates à notre profil.

	 Espace Avenir		
Service	orientation stage emploi		Direction
	Université de Strasbourg	de la recherche et de la valorisation	

Programme Valorisation des compétences, Un nouveau Chapitre de la Thèse / NCT 2023

Nom et prénom : SCHOUKROUN Florian

École doctorale : ED414 / **Unité de recherche :** UMR 7364

Intitulé du Rapport NCT : Identification d'une nouvelle région du cerveau dans l'obésité et les troubles du comportement alimentaire

Mentor : Jean-Jacques HINCKER

L'intitulé académique du sujet de thèse : Rôles du noyau tegmental rostromédian dans la prise alimentaire hédonique : implications du système endocannabinoïde

Le nom du directeur/directrice de la thèse : Katia BEFORT

Sommaire

I : Cadre général et enjeux de recherche	287
A : Les enjeux du projet de recherche	287
B : Résumé succinct de la thèse	287
C : Ma thèse dans son contexte	288
D : Ma place dans cette thèse	288
II : Déroulement et coût du projet	289
A : Déroulement du projet de recherche	289
1-La préparation du projet de thèse (Septembre-Décembre 2019)	289
Compétence 1 : Capacité a faire le bilan actuelles sur un sujet	289
2-Le stage de M2 et la crise sanitaire (Janvier-Juin 2020)	290
Compétence 2 : Répond de manière efficace et appropriée au changement et à l'inattendu	290
3-Le premier sous-projet de la thèse (Octobre 2020-Février 2022)	290
Compétence 3 : Planifie les projets pour atteindre les objectifs en intégrant la stratégie, les priorités et les contraintes de qualité, de délai et de budget	290
Compétence 4 : S'approprie de nouvelles méthodes d'analyse	291
4-Le deuxième sous-projet de thèse (Mai 2021 ; Février 2022-Juin 2023)	291
Compétence 5 : Formule de nouveaux projets pour répondre à des questions clés	291
B : Les coûts du projet de recherche	292
5-Allocation des ressources (%)	292
6-Estimation détaillée du coût de la thèse	293

I : Cadre général et enjeux de recherche

A : Les enjeux du projet de recherche

Le nombre de personnes en surpoids ou en obésité dans le monde a dramatiquement augmenté depuis 1975. En France, la proportion d'adultes en situation d'obésité est passée de 6 à 18%, soit près d'une personne sur cinq. L'obésité s'accompagne de conséquences médicales à long terme (diabète de type 2, troubles cardiovasculaires, troubles du comportement alimentaire) qui ont un coût sur la société : selon l'étude d'IMS Health, l'obésité coûterait chaque année 5 milliards d'euros à l'assurance maladie.

Selon l'OMS (Organisation mondiale de la Santé), c'est la surconsommation d'aliments riches en gras et en sucre qui est responsable de cette soudaine augmentation. En effet, ces aliments sont devenus très faciles d'accès avec la grande distribution et les chaînes de restaurations rapides, et de récentes études en neurosciences ont montré que la surconsommation de ce type d'aliments induit des effets similaires à la prise de drogue sur notre cerveau.

Au sein de notre cerveau se trouve un ensemble de structures en interactions qui forment « le circuit de la récompense ». Ce circuit est très fortement activé dans l'abus de drogues (cocaïne, héroïne, THC...) et contribue au développement des addictions. Les aliments riches en gras et/ou en sucre activent également ce circuit et peuvent ainsi conduire à une perte du contrôle de l'individu sur la prise alimentaire.

B : Résumé succinct de la thèse

Mon projet de thèse s'intéresse au rôle d'une structure cérébrale, le noyau tegmental rostromédian (RMTg), sur la régulation du comportement alimentaire. Cette structure est identifiée comme un frein sur le circuit de la récompense et communicant

avec d'autres structures cérébrales liées aux contrôles de la prise alimentaire. Le RMTg reste une région relativement peu connue dans le monde scientifique : elle n'a été que clairement identifiée en 2009, en parallèle par une équipe de scientifiques américains et une équipe de neuroscientifiques de Strasbourg à l'INCI (Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives). Jusqu'à présent cette structure a été étudiée dans l'abus de substance (morphine, cocaïne) et une seule étude a envisagé son rôle dans la prise alimentaire. Mon projet de thèse s'est articulé autour de deux objectifs principaux. Le premier objectif a été de mieux caractériser le rôle des réseaux neuronaux du RMTg dans la surconsommation de nourriture grasse et sucrée, le second grand objectif a été d'analyser comment au sein du RMTg la surconsommation de ce type d'aliments module des systèmes moléculaires impliqués dans les mécanismes de l'addiction.

C : Ma thèse dans son contexte

Ma thèse est réalisée au sein de l'équipe 3 du LNCA (Laboratoire des neurosciences cognitives et adaptatives) sous la direction du Dr Katia Befort. Ce laboratoire est situé au sein de la faculté de psychologie de Strasbourg. Les quatre équipes du LNCA travaillent sur diverses thématiques telles que le vieillissement cognitif, la maladie d'Alzheimer, le stress ou l'addiction. L'équipe 3 du LNCA est composée d'une chargée de recherche, un maître de conférences, un ingénieur de recherche, trois doctorants et un étudiant de Master 2. Cette équipe s'intéresse à la neurobiologie commune derrière l'abus de substance tel que la cocaïne et la surconsommation de nourriture grasse et sucrée.

J'ai intégré le laboratoire au terme de mon Master 2 de Neurosciences Cellulaires et Intégrées (NCI). J'ai obtenu ce Master après avoir réalisé une licence de biologie à l'Université de Montpellier en parcours « Physiologie Animale et Neurosciences ».

D : Ma place dans cette thèse

J'ai décidé de faire une thèse parce que le travail de recherche scientifique me passionne réellement. Pour moi, la recherche consiste à faire face à une question que personne ne s'est jamais posée et travailler dessus intensément pour en trouver la réponse, et c'est cet aspect qui m'a intrigué dès le début de mes stages en master.

J'ai choisi ce sujet de thèse parce que l'étude des pathologies mentales, tel que l'addiction ou les troubles du comportement alimentaire m'intéressent tout particulièrement, les troubles de la santé mentale est un sujet qui me touche particulièrement vis-à-vis de mon histoire personnelle face à ce genre de troubles. D'autant plus qu'il s'agit d'un domaine encore très mystérieux des neurosciences et qui malheureusement n'est pas très étudié ni très considéré.

En entrant en thèse, je n'avais pas un projet professionnel bien dessiné, mais l'amour de la recherche scientifique, faire des expériences, trouver des solutions a des problèmes, être face à une question et devoir trouver un moyen de répondre. Peut-être un peu naïvement, je trouvais l'idée assez belle de me dire que je participais à élargir la connaissance humaine. Ce qui me plaît particulièrement en recherche c'est la grande autonomie qu'on a d'expérimenter de nouvelles choses, de se gérer soit même en terme d'horaires et que chaque jour soit un peu différent du précédent.

Grâce à mes encadrants de thèse, Katia BEFORT et Romain BOURDY, avec qui j'ai de la chance de très bien m'entendre, mon travail de recherche a été le fruit d'une très étroite collaboration et non pas un travail seulement solitaire.

II : Déroulement et coût du projet

A : Déroulement du projet de recherche

La préparation du projet de thèse (Septembre-Décembre 2019)

La préparation de mon projet de recherche a commencé en septembre 2019 lorsqu'il y a été décidé avec Katia BEFORT et Romain BOURDY que j'intégrerais l'équipe en janvier au cours de mon stage de M2. Nous avons eu plusieurs réunions au cours de la période septembre-décembre 2019 pour bien poser un cadre sur mon travail de M2. Au cours de ces réunions, nous avons décidé que mon stage de M2 consisterait en deux principales études : une étude neuroanatomique et une étude comportementale.

Compétence 1 : Capacité à faire le bilan actuel sur un sujet

Afin de pouvoir aborder mon stage de M2 de manière efficace, il me fallait acquérir un certain socle de connaissance bibliographique liée à mon sujet. De ce fait, il m'a fallu prendre connaissance des précédentes études scientifiques liées à mon sujet. J'ai commencé à établir un tableau de bibliographie dans lequel j'ai archivé les articles que j'ai lus au fur et à mesure. Ce tableau contient un résumé des articles, des techniques employées et des modèles utilisés. La mise en place de ce tableau, que j'utilise encore aujourd'hui, m'a permis d'acquérir une connaissance solide de mon sujet et d'être constamment à jour sur la littérature scientifique reliée. J'ai pu également développer un regard critique sur les études publiées.

Le stage de M2 et la crise sanitaire (Janvier-Juin 2020)

Compétence 2 : *Réponds de manière efficace et appropriée au changement et à l'inattendu*

Mon travail de M2 a été fortement impacté par la crise sanitaire liée à la pandémie de COVID-19. En effet, le confinement à la mi-mars 2020 a mis fin à mon stage en présentiel au laboratoire et a brutalement interrompu les expériences du laboratoire. Malgré cette crise sanitaire, j'ai dû continuer à travailler sur mon mémoire de master afin de pouvoir valider mon master. Pour se faire, nous avons mis en place avec mes encadrants des réunions hebdomadaires en visioconférence afin de pouvoir finaliser l'étude commencée en laboratoire. En nous adaptant à la visioconférence, j'ai pu finaliser une grande partie de l'étude neuroanatomique et obtenir mon master avec mention bien.

Le premier sous-projet de la thèse (Octobre 2020-Février 2022)

Compétence 3 : *Planifie les projets pour atteindre les objectifs en intégrant la stratégie, les priorités et les contraintes de qualité, de délai et de budget*

Mon premier projet de recherche a consisté à réaliser une étude comportementale pour identifier le rôle de la structure cérébrale que j'étudie dans la prise alimentaire. Ces études comportementales se voulant longues et difficiles à mettre en place, il m'a fallu prévoir largement la chronologie de ces expériences afin de ne pas perdre de temps. Pour ce faire, j'ai établi un calendrier d'échéances vis-à-vis des expériences programmées, j'ai également réservé les salles, le matériel et les outils nécessaires (matériel de chirurgie, chariot, cages) afin que les expériences se déroulent sereinement. Au final, l'ensemble des expériences réalisées pendant ce projet a pu être mis en place et nous n'avons jamais eu de problèmes liés à un manque d'organisation de l'expérience.

Compétence 4 : S'approprient de nouvelles méthodes d'analyse

Cette première étude nous a permis d'obtenir des résultats intéressants sur la prise alimentaire, mais que j'ai dû analyser afin de pouvoir en tirer une ou des conclusions vis-à-vis de notre étude. Malgré que l'école doctorale dispense régulièrement des formations d'analyse statistique sur le logiciel R, je n'ai jamais pu y assister par manque de place. De ce fait, j'ai dû apprendre l'analyse statistique en autodidacte en m'aidant de sites internet spécialisés sur l'analyse statistique. Après quelques mois de pratique régulière, j'ai pu acquérir une connaissance solide des analyses statistiques à mettre en place dans mon étude, savoir les utiliser avec pertinence et j'ai également pu découvrir de nouveaux outils d'analyses qui ont permis d'avoir un autre point de vue sur les données que nous avons acquis.

Le deuxième sous-projet de thèse (Mai 2021 ; Février 2022-juin 2023)

La seconde partie de mon projet de recherche a consisté à étudier plus en détails la neurobiologie liée à un trouble du comportement alimentaire : l'hyperphagie boulimique. Ce trouble est caractérisé par une surconsommation de nourriture, généralement riche en graisse et en sucre, pendant un temps limité et ceci plusieurs fois par semaine. Il est le trouble du comportement alimentaire le plus fréquent.

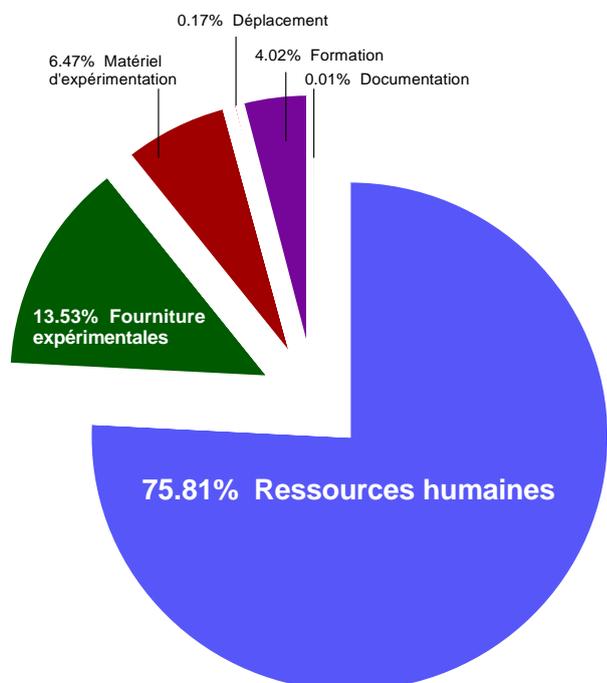
Compétence 5 : Formule de nouveaux projets pour répondre à des questions clés

Dans un premier temps, afin de pouvoir étudier la neurobiologie de ce trouble, il m'a fallu développer un protocole afin de modéliser la pathologie. En me basant sur la littérature scientifique récente, j'ai essayé de mettre en place un modèle de l'hyperphagie boulimique. La première modélisation a échoué, possiblement parce que les études sur lesquelles je l'avais basé ne semblaient pas des plus robustes. En faisant un nouveau tour de la littérature sur des modèles plus anciens qui étudiaient la pathologie, j'ai pu améliorer le protocole de modélisation et tenter une seconde fois d'établir un protocole d'hyperphagie boulimique.

Cette seconde tentative fut un succès et j'ai ainsi réussi à mimer une pathologie de type trouble du comportement alimentaire chez des rats. Ainsi, j'ai pu débiter l'analyse biomoléculaire sur les cerveaux de ces rats.

B : Les coûts du projet de recherche

Allocation des ressources (%)



Estimation détaillée du coût de la thèse

Estimation des coûts : Thèse en neurosciences ; Doctorant : Florian SCHOUKROUN						
	détail		nombre d'unité	coût moyen unitaire	quote part utilisation	total
Ressources humaines						
	Salaire brut	Charges				
Doctorant salaire année 1 2	2030,77	1,3	24	2640,001	1	63360
Doctorant salaire année 3	2300	1,3	12	2990	1	35880
Encadrant 1	3478,26087	1,15	36	4000	0,3	43200
Encadrant 2	2869,565217	1,15	36	3300	0,7	83160
Autre personnel (ou sous-traitant)						0
Sous-total						225600
Consommables						
Fournitures expérimentales	Détail	Unité	Coût moyen unitaire			Total
Rat Wistar	Rats 5 semaines	215	20,05			4310
Boîte de gant	100 gants/boite	780	14,6			11388
Plaque PCR	Plaque 96 puits	55	100			5500
Anticorps-Anti FoxP1	Tube (100µg)	3	585			1755
Anticorps Anti-NeuN	Tube (100µg)	2	516			1032
Anticorps Anti-TH	Tube (100µL)	1	392			392
Anticorps Anti-VGlu2	Tube (100µL)	1	352			352
Anticorps antic-Neun Mouse	Tube (500 µg)	1	610			610
Anticorps Anti c-Fos Mouse	Tube (100µL)	1	470			470
Anticorps Anti c-Fos GP	Tube (50 µg)	1	355			355
SYBR Green	10 Tubes de 5 mL	1	3336			3336
Trizol	Bouteille de 1L	2	310			620
Chloroforme	Bouteille 1L	1	107			107
RNAze-Zap	Bouteille 250 mL	2	75			150
Isopropanol	Bouteille 2L	1	70			70
Éthanol 75%	Bouteille 1L	2	64,9			129,8
Séquences d'amorces	Couples d'amorces	7	10			70
Plaque 48 puits	Lots de 50	4	52,66			210,64
Plaque 24 puits	Lots de 50	2	48,61			97,22
Kétamine	Flacon de 10mL	9	12,01			108,09
Xylazine	Flacon de 25mL	3	55,23			165,69
Isoflurane	Flacon de 250 mL	6	540			3240
Nacl	Lot 10 ampoules (10ml)	22	10			220
Euthasol	Flacon de 250 mL	1	25,49			25,49
Sécure	20 (pour 10kg)	3	50			150
Sucrose	1 kg	1	47			47
Blouse		3	50			150
PFA 32%		2	44			88
Seringue Hamilton	Seringue de 10 µL	3	100			300

PBS 10x	Lot de 4 Litres	1	163		163
Matrice cerveau de rat	Matrice métal	1	350		350
Lames d'histologie	Boîte de 50 Starfrost	20	10		200
Lamelle	Boîte de 100	10	7,99		79,9
Lames de rasoir (Cryostats)	Boîte de 50	1	111		111
Lame de rasoir (dissection)	Gillette, boîte de 50	2	9,9		19,8
Punch de prélèvement de tissus	Boîte complète	1	140		140
AAV-Retrograde mCherry	Échantillon 100µL	1	405		405
AAV-Retrograde eGFP	Échantillon 100µL	2	405		810
AAV-Caspase3	Échantillon 100µL	2	405		810
Tube eppendorf 1.5mL	Lot de 500	2	18,6		37,2
Streptavidin Alexa Fluor 594	Tube de 50 µg	1	205		205
Kit Vectastain	Lot de 1	1	320		320
Tube de 0.2 mL	Lot de 1000	1	81,75		81,75
TIPS 1000 µL RNASE Free Filtré	Lot the 10X96 tips	2	106		212
TIPS 200 µL RNASE Free Filtré	Lot the 10X96 tips	3	106		318
TIPS 10 µL RNASE Free filter	Lot the 10X96 tips	3	106		318
Syringe 1 mL	Lot de 100	2	26,55		53,1
Seringue 5 mL	Lot de 100	2	26,42		52,84
Aiguille 26G	Lot de 100	2	3,29		6,58
Reverse Transcriptase	4 tubes de 25 µL	6	218		1308
Autres achats					0
Sous-total					41451
<i>Infrastructures</i>					
Entretien, gardiennage, secrétariat					0
Loyers des locaux		Loyer brut		Charges locatives	
Électricité eau chauffage					
Sous-total					0
Matériel d'expérimentation					
Ordinateur personnel		1200	1		1200
Ordinateur de bureau		800	1		800
Logiciel de bureau	Licence GraphPad 1 an	126	2		252
Autre	Machine biorad	17000	1		17000
Sous-total					19252
Déplacements		Transport		Inscription	
Logement					
Neurofrance 2021 (En ligne)	0	80	0		80
FENS 2022	40	180	150		370
Inscription à la société des neurosciences		60			60
					0
Sous-total					510
Formations					
Formations	Formation ED414	100	100		10000
Formation concepteur et chirurgie du rongeur		600	1		600
Frais d'inscriptions à l'université	Une année	452	3		1356
Sous-total					11956

Documentation et communication						
Affranchissements, internet, téléphone						
Publicité, communication, impressions						
Documentation (périodiques, livres, bases de données)						
Autre (publications)	Poster	15	1			15
Sous-total						15
Charges financières (intérêt des emprunts)						0
TOTAL						298784

C : Les pistes professionnelles

Dans l'optique de trouver des pistes professionnelles au terme de mon travail de thèse, j'ai réalisé deux entretiens par internet grâce à LinkedIn avec deux anciens doctorants de l'Université de Strasbourg. L'un travaillant actuellement dans le privé à l'ICR (Institute for Cancer Research) à Londres en tant que scientifique en DMPK (Drug Metabolism and Pharmaceutiks) et l'autre est actuellement chercheur en contrat post-doctoral à Lausanne, cette personne travaille dans un laboratoire public pour une entreprise privée. Les deux entretiens m'ont permis d'avoir un point de vue de la vie post-thèse dans le privé et dans le public.

J'ai appris que la recherche dans l'industrie pharmaceutique n'est pas aussi idéale qu'on peut le croire pendant la thèse : le travail de chercheur dans l'industrie permet, certes, d'avoir des horaires de travail plus cadrés (9h-17h) et un salaire intéressant mais il n'octroie que peu de liberté de manœuvre sur les expériences à mener. D'un autre côté, le travail dans la recherche publique est très demandant, le salaire est peu valorisant et il n'y a que peu d'équilibre entre le travail et la vie personnelle, de plus les perspectives d'évolution dans le public sont très restreintes. Le manque de moyens dans la recherche publique et devoir souvent rédiger des demandes de financements très souvent refusées est également un aspect rébarbatif.

Aujourd'hui, la perspective de continuer de travailler dans la recherche publique m'intéresse toujours mais j'ai pu apprendre au travers de mon travail pendant la thèse et pendant cette formation que l'un des aspects que je recherchais le plus dans mes pistes professionnelles consiste en la gestion d'un projet, son financement, les

moyens matériels et humains nécessaires pour le mettre en place, l'analyse de résultats, la mise au point de techniques. Ces aspects, je les retrouve dans le poste d'Ingénieur en recherche et développement. Des entreprises en Alsace telles que **AlsaChim** sont en recherche d'un profil similaire au mien, le travail consistant au développement de kits de dosage de médicaments enquière la gestion d'un projet de A à Z, la gestion d'une équipe, la mise en place de troubleshooting, le travail d'analyse et tout ceci dans un laboratoire. J'ai trouvé cette offre sur LinkedIn et sur Indeed en recherchant des offres d'emplois dans le secteur de la science qui permettrait de diriger un projet de A à Z. L'offre d'emploi m'a plu parce qu'elle permet de se détacher du domaine de la recherche publique tout en restant dans le domaine scientifique et en gardant l'aspect du travail à la paillasse qui me plaît beaucoup en thèse.

Description de l'offre :

Au sein du Département R&D de la Reagent Kit Business Unit, et sous la responsabilité du Manager R&D, vous participez au développement de kits pour le dosage de médicaments ou biomarqueurs par LC/MS/MS à destination des hôpitaux.

- *Gérer vos projets de développement de nouveaux kits en collaboration avec le personnel technique et les autres services de la société,*
- *Former et encadrer le personnel technique,*
- *développer des méthodes quantitatives d'analyse dans les milieux biologiques par LC/MS/MS,*
- *développer, tester et améliorer des prototypes de produits,*
- *générer des protocoles de test, examiner et analyser les résultats, et générer des rapports de validation conformément aux directives techniques applicables en vigueur et aux exigences du système de gestion de la qualité,*
- *planifier et effectuer des études de vérification de la conception et de validation analytique en laboratoire pour les produits de diagnostic in vitro.*
- *Planifier les activités quotidiennes, assurer un approvisionnement suffisant en matériel pour effectuer les tâches, etc., et organiser tous les tests au sein du laboratoire,*
- *exécuter les travaux conformément aux processus définis et aux procédures de laboratoire,*
- *assurez-vous que tous les travaux sont conformes aux processus de qualité existants,*
- *tenir à jour des dossiers expérimentaux détaillés,*
- *assurer un haut niveau de qualité en termes de résultats scientifiques rendus,*
- *contribuer à l'amélioration de la productivité du laboratoire en optimisant les outils ou les processus existants,*
- *rapporter périodiquement au Responsable R&D sur la progression de vos projets.*

Également le travail de Chef de projet scientifique, recherché par des entreprises telles

que **Novalac**, m'intéresse également puisqu'il consiste à conserver l'aspect de veille scientifique que j'ai apprécié pendant ma thèse, élaborer des objectifs dans nos études, mettre en place des protocoles et d'analyses innovantes ainsi que la communication à la fois en interne au sein de l'entreprise mais aussi en externe. J'ai trouvé cette offre en regardant les offres d'emplois pour BioRad, une entreprise de fourniture de matériel de laboratoire pour l'analyse biomoléculaire. J'ai été intéressé par un poste de chef de projet marqué comme disponible sur leur site, cependant cette offre a été postée sur LinkedIn puis retirée quelques jours plus tard, mais une suggestion d'offre pour Novalac m'a été proposée.

Description de l'offre :

- Définir les objectifs des études,
- Identifier et collaborer avec les leaders d'opinion,
- Rédiger ou participer à la rédaction des documents de l'étude (notamment protocole, CRF, plan de monitoring, plan d'analyse statistique, rapport de sécurité, rapport clinique...),
- La communication des résultats en interne et en externe.

Par ailleurs, vous êtes un support scientifique auprès de différents services de l'entreprise (marketing, R&D, réglementaire) et notamment :

- Vous assurez la veille scientifique dans les domaines d'intérêt de l'entreprise,
- Vous participez au développement des nouveaux produits,
- Vous aidez le service marketing à élaborer les messages scientifiques,
- Vous rédigez les dossiers réglementaires,
- Vous répondez aux questions des chefs de produits, délégués, médecins, etc. sur les différents marchés.

Profil recherché :

- Formation
- Formation supérieure (bac + 4/5) médicale ou scientifique (nutrition, agroalimentaire, biologie, biochimie ...)
- Une formation complémentaire (DIU) en gestion de projet clinique serait un plus
- Compétences requises
- Motivation, ouverture d'esprit et dynamisme
- Rigueur, esprit d'analyse et de synthèse
- Capacité d'adaptation
- Bon relationnel, capacité à travailler avec des experts internationaux
- Très bonne maîtrise de l'anglais
- Expérience
- 5 ans d'expérience minimum en tant que chef de projet scientifique
- Expérience dans la conception d'études cliniques, de préférence interventionnelles et horsproduit de santé

- Une expérience dans le domaine de la nutrition serait un plus

En parallèle, j'ai soumis ma candidature à une offre de postdoc dans le laboratoire d'Alexxai Kravitz dans le Missouri, qui travaille sur une thématique proche de ce que j'ai abordé pendant ma thèse.

Description de l'offre : « *A postdoctoral position is available to investigate neural mechanisms underlying decision making, feeding, and obesity in the Kravitz Laboratory at Washington University in St. Louis School of Medicine, Department of Psychiatry. Techniques include in vivo electrophysiology, optogenetics, fiber photometry, calcium imaging, and behavioral analysis. The PI is committed to mentorship best practices and fosters a small but collaborative lab culture. The Washington University in St. Louis research community is highly collegial, including neuroscientists across many departments. The School of Medicine has many amenities in the form of core facilities and other research infrastructure. It is consistently ranked among the top medical schools in the nation. The community of postdoctoral trainees is supported through a dedicated Office of Postdoctoral Affairs and an active Postdoc Society to foster the social and career development of trainees. St. Louis is high livable, with many low-cost, high-quality cultural amenities. Projects will include studying neural processes that control decision making, feeding, and body weight regulation* »

Qualifications nécessaires

« *Ph.D., M.D. or similar degree in neuroscience, physiology, pharmacology or related discipline. Experience in cellular or in vivo electrophysiology, calcium imaging, and/or behavioral analysis is strongly preferred. Ability to work both independently and collaboratively and show excellent critical thinking. Strong published scholarly work. Good communication skills.* »

Après avoir postulé à cette offre dans le courant du mois de juin 2023, j'ai obtenu une réponse de la part du Dr Alexxai KRAVITZ me proposant un entretien en visioconférence pour le début du mois de juillet 2023. À la suite de cet entretien, le Dr

Kravitz m'a proposé de venir dans son laboratoire dans le courant du mois de novembre 2023 afin d'y présenter mon travail de thèse. Lors de ma visite, le Dr Kravitz m'a proposé le poste de chercheur postdoctoral dans son laboratoire que j'ai accepté.

Résumé

Le noyau tegmental rostromédian (RMTg) est une structure cérébrale projetant l'aire tegmentale ventrale (VTA) et l'hypothalamus latéral (LH), centres régulateurs de la prise alimentaire. Le RMTg est encore peu étudié et il est envisageable qu'il participe à la dérégulation de la prise alimentaire observée dans l'obésité et l'hyperphagie boulimique. Nous avons d'abord étudié le rôle des voies RMTg-VTA et RMTg-LH dans la régulation de la prise alimentaire chez le rat grâce à une approche innovante de lésion projections-spécifiques, suivie d'une exposition à un régime obésogène (modèle d'obésité). Nous avons ensuite étudié les adaptations du système endocannabinoïde (ECS) dans les régions du circuit de la récompense dans des modèles d'obésité et d'hyperphagie boulimique. La voie RMTg-VTA et RMTg-LH module respectivement la consommation d'aliments gras et standard. L'analyse moléculaire a révélé une dérégulation distincte de l'expression de l'ECS dans les modèles d'obésité et d'hyperphagie boulimique, notamment au sein du RMTg. Ces résultats soulignent le rôle du RMTg et de l'ECS dans les pathologies associées à une dérégulation de la prise alimentaire.

Mots clefs : Noyau tegmental rostromédian, aire tegmentale ventrale, hypothalamus latéral, lésion projection-spécifique, obésité, hyperphagie boulimique, système endocannabinoïde

Résumé en anglais

The rostromedial tegmental nucleus (RMTg) is a brain structure projecting to the ventral tegmental area (VTA) and the lateral hypothalamus (LH), two key regulatory centers for feeding behavior. The function of the RMTg remains mostly unknown, and it is plausible that this region plays a role in food intake dysregulation as observed in obesity and binge-eating disorders. We firstly studied the role of the RMTg-VTA and RMTg-LH pathways in food intake regulation through a projection-specific lesional approach followed by a 6-week exposure to an obesogenic diet. Then, we analyzed and compared the adaptations of the endocannabinoid system (ECS), an endogenous system regulating food intake, within reward-related brain regions in obesity and binge-eating disorder models. Our results indicate that the RMTg-VTA and RMTg-LH pathways respectively modulate high-fat and standard food consumption. The molecular analysis revealed distinct dysregulation of ECS expression in obesity and binge-eating disorder, particularly within the RMTg. These findings underscore the involvement of the RMTg and the ECS in pathologies characterized by dysregulated food intake.

Key words : Rostromedial tegmental nucleus, ventral tegmental area, lateral hypothalamus, projection-specific lesion, obesity, binge eating, endocannabinoid system