



**HAL**  
open science

# Dissection du rôle de la voie intracellulaire de mTORC1 dans les circuits hypothalamiques à la mélanocortine régulant la prise alimentaire

Nicolas Saucisse

► **To cite this version:**

Nicolas Saucisse. Dissection du rôle de la voie intracellulaire de mTORC1 dans les circuits hypothalamiques à la mélanocortine régulant la prise alimentaire. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0151 . tel-01498462

**HAL Id: tel-01498462**

**<https://theses.hal.science/tel-01498462v1>**

Submitted on 30 Mar 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2016

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité : Neurosciences

---

Soutenue publiquement le 6 décembre 2016

**Par Nicolas Saucisse**

Né le 29/11/1989 à Châteaubriant

**Dissection du rôle de la voie intracellulaire de mTORC1 dans les circuits  
hypothalamiques à la mélanocortine régulant la prise alimentaire**

Sous la direction du Dr Daniela Cota

---

**Membres du Jury**

Mr Guillaume Ferreira, Directeur de recherche, INRA UMR 1286, Université de Bordeaux, France

*Président*

Mr Alexandre Benani, Chargé de recherche, CNRS-INRA UMR 6265, Université de Bourgogne, France

*Rapporteur*

Mr Serge Luquet, Directeur de recherche, CNRS UMR 8251, Université Paris Diderot-Paris 7, France

*Rapporteur*

Mr Philippe Ciofi, Chargé de recherche, INSERM U1215, Université de Bordeaux, France

*Examineur*

Mr Uberto Pagotto, Professeur des universités, Université de Bologne, Italie

*Examineur*

Mme Daniela Cota, Chargée de recherche, INSERM U1215, Université de Bordeaux, France

*Directeur de thèse*







THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité : Neurosciences

---

Soutenue publiquement le 6 décembre 2016

**Par Nicolas Saucisse**

Né le 29/11/1989 à Châteaubriant

**Dissection du rôle de la voie intracellulaire de mTORC1 dans les circuits  
hypothalamiques à la mélanocortine régulant la prise alimentaire**

Sous la direction du Dr Daniela Cota

---

**Membres du Jury**

Mr Guillaume Ferreira, Directeur de recherche, INRA UMR 1286, Université de Bordeaux,  
France

*Président*

Mr Alexandre Benani, Chargé de recherche, CNRS-INRA UMR 6265, Université de  
Bourgogne, France

*Rapporteur*

Mr Serge Luquet, Directeur de recherche, CNRS UMR 8251, Université Paris Diderot-Paris 7,  
France

*Rapporteur*

Mr Philippe Ciofi, Chargé de recherche, INSERM U1215, Université de Bordeaux, France

*Examineur*

Mr Uberto Pagotto, Professeur des universités, Université de Bologne, Italie

*Examineur*

Mme Daniela Cota, Chargée de recherche, INSERM U1215, Université de Bordeaux, France

*Directeur de thèse*

## **UNITE DE RECHERCHE**

Neurocentre Magendie - INSERM U1215

« Physiopathologie de la plasticité neuronale »

Equipe du Dr Daniela COTA

Groupe « Physiopathologie de l'équilibre énergétique et obésité »

146, rue Léo Saignat

33077 Bordeaux Cedex

*A mes amis,  
A ma sœur et mes parents.*

*“There is a hell, believe me I've seen it.  
There is a heaven, let's keep it a secret.”  
Oliver Sykes (BMTF)*





## Remerciements

J'aimerais tout d'abord avoir une pensée particulière pour les personnes qui n'auront pas eu la chance de voir l'aboutissement de ces années bordelaises, notamment mes deux grands-mères, mes deux oncles et mon cousin. Peut-être que de là-haut, vous serez fiers de moi.

J'aimerais ensuite remercier tous mes amis, présents et lointains pour lesquels la distance ne compte pas. C'est agréable d'avoir des gens avec qui pouvoir discuter et s'amuser sans limite, ne serait-ce que quelques fois par an, et sur qui on peut compter sans problème. Ils se reconnaîtront sans soucis.

J'aimerais dire un grand bravo à Mélissa, qui a su m'aider à terminer cette thèse dans la joie et la bonne humeur et a su gérer mes coups de stress ou de colère pendant cette période indescriptible qu'est la rédaction. A charge de revanche l'année prochaine !

J'aimerais également remercier ma sœur, Emilie, et mes parents, Martine et André, sans qui tout cela n'aurait jamais pu être possible. Merci de m'avoir soutenu, aussi bien intellectuellement que financièrement, tout au long de mes études malgré mes envies de distance (Ecosse, Bordeaux). C'est sûr que ce ne sont pas les destinations les plus à proximité. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous aime fort ! Et pour toi la sis', fais de ton mieux et, surtout, fais ce qu'il te plaît et ce qui te rend heureuse. Bisous à vous trois et à bientôt !

Enfin, je remercie également tous les membres de ma famille, pour qui une thèse est peut-être quelque peu obscure, mais qui seront quand même fiers de cet accomplissement personnel et professionnel. A bientôt pour fêter ça !

Après l'heure des remerciements pour les amis et la famille, voici l'heure de ceux pour les gens avec qui j'ai pu travailler. Pour commencer, j'aimerais remercier ceux avec qui j'ai travaillé directement. Et oui, je parle de vous trois !

Tout d'abord, merci à toi Wil, travailler à tes côtés fut un énorme plaisir. Déjà, tu as permis de doubler le nombre de personnes de la gente masculine. Je commençais à me sentir un peu

seul entouré de toutes ces filles. Mais surtout, j'ai adoré ta convivialité, le fait de pouvoir associer travail et bonne humeur, discuter de tout et de rien avec notre confrère le Dr Terral, aussi bien au labo qu'autour d'une bière au QG ou au PQ. Merci encore pour tout Dr Mazier.

Alors mon petit Vincent, j'espère ne pas t'avoir mis la (dé)pression lors de ce passage difficile de l'écriture. T'inquiète, tu t'en sortiras comme un chef. En tout cas, un grand merci à toi pour tout ce que tu as fait durant ces deux dernières années. Ce fut une vraie expérience de pouvoir travailler avec toi, mon premier étudiant. Ca m'a fait remonter le temps à mes débuts, insouciant, curieux, et ayant une envie de connaissance. J'espère en tout cas t'avoir inculqué le maximum de choses pour que tu puisses également atteindre tes objectifs. Bon courage par la suite et surtout, prends des vacances !

Your turn, Sammy! It's been with a great pleasure I've worked by your side. Thanks a lot for everything. You're the McGyver of the lab, working on all aspects even with us taking over your children during the day. We are the don't bring your children at work, unless they're already there. Thank you also to make us practice our English, or my Scottish in my case, and to make us laugh when you say some French's not so nice expressions and make them look actually funny. But, you've been also a good listener and worked all our issues efficiently, (you!).

Merci, à tous les autres membres, passés et présents, d'avoir contribué de près ou de loin à mon intégration lors de mon passage au sein du laboratoire. Merci à toi Caro, pour tout ce que tu m'as appris et pour ton écoute. C'est dommage que tu sois partie avant la fin... mais bon le gouvernement en a voulu autrement. Merci à toi Philippe, le nouveau venu, qui m'aura permis de gagner énormément de temps pour les manips lors de l'écriture de ma thèse, ainsi que pour ta gentillesse, tes connaissances et tes compétences. C'est bien dommage que tu ne sois pas arrivé plus tôt. On se serait bien entendu. Merci aux compères Magalie, Cécile, Ashley et Amandine pour leur bonne humeur, leur gentillesse et tous les bons moments passés ensemble. Grâce à vous, les bureaux étaient toujours joyeux et vivants ! Merci à Valérie, que j'ai pu retrouver au sein du laboratoire il y a peu, de m'avoir donné des cours en Master et d'avoir en partie contribué à ce que je continue par la suite. Merci pour tes quelques conseils pour l'écriture de la thèse. Merci également aux cliniciens ainsi qu'à Pierre, Méliissa et Nathalie.

Finally, I would like to thank Daniela. It's been a great honor to work with you and to be your PhD student. It was a very rewarding experience during this 4 years. Thank you for sharing all your knowledge with me and being there throughout the whole process to build these beautiful studies. It was overall a very nice adventure with ups and downs but I made it thanks to you and would learn and grow from this experience. Grazie mille per tutto. Ti ringrazio vivamente per tutta la fiducia che mi hai dato.

I also would like to thank Pier Vincenzo Piazza for welcoming me in his institute. It has been a great pleasure to work in Magendie.

Enfin, un grand merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

J'aimerais également remercier les personnes de mon laboratoire de Master, notamment JC et Chacha, Agnès bien sûr ainsi que Guillaume et Sophie, qui m'ont donné l'envie de continuer vers une thèse et sans qui je ne l'aurais sans doute jamais réalisée.

Pour finir, je voudrais bien évidemment remercier tous les membres du jury. C'est pour moi un grand honneur de vous voir siéger dans mon jury. Je vous suis très reconnaissant de la spontanéité et de l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté de juger mon travail, voire, pour certains, une deuxième fois après l'évaluation de ma mi-thèse. Veuillez trouver, chers Messieurs, le témoignage de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.



Résumés  
Liste des publications  
Liste des abréviations  
Sommaire



## Résumé

L'hypothalamus est une structure cérébrale ayant un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire. Parmi les différentes populations neuronales qui le composent, les neurones produisant la pro-opiomélanocortine (POMC) sont classiquement connus pour diminuer la prise alimentaire et le poids corporel via la libération de neuropeptides produits par le clivage de POMC. Notre étude, grâce à l'utilisation d'approches génétiques, pharmacologiques, électrophysiologiques et moléculaires, remet en question les notions classiques sur la fonction des neurones à POMC dans la balance énergétique, en démontrant qu'il existe deux sous-populations fonctionnellement distinctes de neurones à POMC, qui augmentent ou diminuent la prise alimentaire en fonction du neurotransmetteur qu'elles libèrent, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) ou le glutamate. Une troisième population capable de produire aussi bien du GABA que du glutamate a également été identifiée. La régulation des neurones à POMC GABAergiques et glutamatergiques dépend de la voie de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTORC1), qui fonctionne comme un détecteur d'énergie cellulaire, et du système endocannabinoïde (ECS), qui régule la libération de neurotransmetteurs. De plus, nous avons également démontré, via l'utilisation de souris mutantes conditionnelles, l'importance de la protéine p62 ou séquestrome 1 (p62/SQSTM1), qui régule l'activité de mTORC1 et l'autophagie, dans les neurones à POMC dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Nos données offrent un nouvel aperçu sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la balance énergétique.

**Mots clés :** neurones à POMC, mTORC1, ECS, neurotransmetteurs, prise alimentaire, « refeeding », p62/SQSTM1, métabolisme, hypothalamus, obésité



## Abstract

The hypothalamus is a brain structure with a key role in the regulation of food intake. Among the different neuronal populations of which it is composed, pro-opiomelanocortin (POMC) neurons are classically known to decrease food intake and body weight through the release of neuropeptides produced by the cleavage of POMC. Our study, through the use of genetic, pharmacological, electrophysiological and molecular approaches, challenges conventional notions about POMC neuron function in energy balance by showing that there are two functionally distinct POMC neuronal sub-populations, which increase or decrease food intake depending on which neurotransmitter they release,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) or glutamate. A third population capable of producing both GABA and glutamate has also been identified. The regulation of POMC GABAergic and glutamatergic neurons depends on the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway, which functions as a cellular energy sensor, and the endocannabinoid system (ECS), which regulates neurotransmitters release. In addition, we have also demonstrated through the use of a conditional knockout mice, the importance of the protein p62 or sequestrome 1 (p62/SQSTM1), which regulates mTORC1 activity and autophagy, in POMC neurons for the regulation of energy homeostasis. Our data provide new insights on the molecular mechanisms involved in the regulation of energy balance.

**Key words:** POMC neurons, mTORC1, ECS, neurotransmitters, food intake, refeeding, p62/SQSTM1, metabolism, hypothalamus, obesity

# Liste des publications et communications scientifiques

## Publications

- Delpech JC, SAUCISSE N, Parkes SL, Lacabanne C, Aubert A, Casenave F, Coutureau E, Sans N, Layé S, Ferreira G & Nadjar A. Microglial activation enhances associative taste memory through purinergic modulation of glutamatergic neurotransmission. *The Journal of Neuroscience*, 2015 Feb; 35(7):3022-3033.
- Haissaguerre M\*, SAUCISSE N\* & Cota D. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014 Nov; 397(1-2):67-77. \*Equally contributing (revue).
- Mazier W\*, SAUCISSE N\*, Gatta-Cherifi B & Cota D. The Endocannabinoid System: Pivotal Orchestrator of Obesity and Metabolic Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015 Oct; 26(10):524-37. \*Equally contributing (revue).

## Publications en préparation

- SAUCISSE N\*, Mazier W\*, Catania C, Binder E, Bellocchio L, Romanov RA, Cannich A, Simon V, Matias I, Meece K, Gonzales D, Clark S, Wardlaw SL, Harkany T, Massa F, Marsicano G & Cota D. mTORC1 and CB1R signaling control two POMC neurons subpopulations that oppositely drive feeding. \*Equally contributing.
- SAUCISSE N\*, Simon V\*, Gonzales D, Clark S, Moscat, J & Cota D. Disruption of autophagy in POMC neurons alters energy balance and impairs both mTOR/STAT3 signaling pathways and POMC neuronal morphology. \*Equally contributing.

## Communications orales

- SAUCISSE N, Simon V, Gonzales D, James, S & Cota D. “Dissecting the role of autophagy in energy balance regulation.” 8<sup>ème</sup> meeting Nutrition-Neuroscience à Bordeaux (France), en Mars 2015.
- SAUCISSE N, Mazier W, Bellocchio L, Clark S, Matias I, Massa F, Marsicano G & Cota D. “mTORC1 links hypothalamic melanocortins and endocannabinoids to regulate food intake”. Symposium de l’Institut F. Magendie à Bordeaux (France), en Novembre 2015.

## Communications affichées (posters)

- SAUCISSE N, Clark S, Bellocchio L, Marsicano G, Cota D. “Use of DREADD technology to study the relationship between the mTORC1 pathway and POMC neuron activity in the regulation of food intake”. Symposium de l’Institut F. Magendie à Bordeaux (France), en Octobre 2013.
- SAUCISSE N, Clark S, Bellocchio L, Marsicano G, Cota D. “Use of DREADD technology to study the relationship between the mTORC1 pathway and POMC neuron activity in the regulation of food intake”. Journée de l’école doctorale à Arcachon (France), en Avril 2014.

- SAUCISSE N, Clark S, Bellocchio L, Marsicano G & Cota D. “mTORC1 modulates food intake by acting onto POMC neurons: evidence using DREADD technology”. Conférence internationale “All roads take to the brain: neural control of human energy homeostasis in health and disease” à Ascona (Suisse), 21-26 Septembre 2014.

- SAUCISSE N\*, Mazier W\*, Bellocchio L, Clark S, Matias I, Massa F, Marsicano G & Cota D. “mTORC1 modulates food intake by acting onto POMC neurons: evidence using DREADD technology”. Journée de l'école doctorale à Arcachon (France), en Avril 2015.

- SAUCISSE N\*, Mazier W\*, Bellocchio L, Clark S, Matias I, Massa F, Marsicano G & Cota D. “mTORC1 modulates food intake by acting onto POMC neurons: evidence using DREADD technology”. Journée Bordeaux Neurocampus/LabEx BRAIN à Bordeaux (France), en Mai 2015.

- SAUCISSE N\*, Mazier W\*, Bellocchio L, Clark S, Matias I, Massa F, Marsicano G & Cota D. “mTORC1 modulates food intake by acting onto POMC neurons: evidence using DREADD technology”. Conférence nationale Société des Neurosciences à Montpellier (France), 19-22 Mai 2015. \*Equally contributing.

- SAUCISSE N\*, Simon V\*, Gonzales D, Clark S & Cota D. “Role of p62 in POMC neurons in the regulation of energy balance”. Symposium de l'Institut F. Magendie à Bordeaux (France), en Novembre 2015. \*Equally contributing.

- SAUCISSE N\*, Simon V\*, Gonzales D, Clark S & Cota D. « Role of p62 in POMC neurons in the regulation of energy balance ». Journée de l'école doctorale à Arcachon (France), en Avril 2016. \*Equally contributing.

- SAUCISSE N\*, Mazier W\*, Bellocchio L, Clark S, Matias I, Massa F, Marsicano G & Cota D. “Two functionally distinct POMC neuron subpopulations oppositely drive feeding”. Journée Bordeaux Neurocampus/LabEx BRAIN à Bordeaux (France), en Juin 2016. \*Equally contributing.

### **Actions de promotion des métiers de la recherche**

- Salons Aquitec 2013, 2014 & 2015. Parc des expositions - Hall 1 - Bordeaux Lac. Présentation des métiers de la recherche et de l'INSERM.

## Liste des principales abréviations

- 2-AG** : 2-arachidonyleglycérol
- 4E-BP1** : protéine se liant au facteur d'initiation eucaryote 4E
- $\alpha$ -MSH** : hormone stimulant l' $\alpha$ -mélanocyte
- AA** : acide arachidonique
- AAA ATPases** : ATPases associées à diverses activités cellulaires
- ACC** : acétyl-coenzyme A carboxylase
- ACTH** : hormone adrénocorticotrope
- AEA** : anandamide
- AgRP** : agouti-related peptide
- AHN** : noyau hypothalamique antérieur
- Akt** : protéine kinase B
- Ambra-1** : activating molecule in Beclin-1 regulating autophagy (Ambra-1)
- AMPA** : acide aminométhylphosphonique
- AMPK** : 5' adenosine monophosphatase
- aPKC** : protéines kinases C atypiques
- ARC** : noyau arqué
- Atg** : protéines liées à l'autophagie
- ATGL** : triglycéride lipase
- ATP** : adénosine-5'-triphosphate
- BAT** : tissu adipeux brun
- BHE** : barrière hématoencéphalique
- cAMP** : adénosine monophosphate cyclique
- CART** : cocaine and amphetamine related transcript
- CB1R** : récepteurs aux cannabinoïdes CB1
- CB2R** : récepteurs aux cannabinoïdes CB2
- CCK** : cholécystokinine
- CNS** : système nerveux central
- CVD** : complexe vagal dorsal
- DAG** : diacylglycérol (DAG)
- DAGL** : diacylglycérol lipase

## Liste des principales abréviations

**Deptor** : DEP domain containing mTOR interacting protein

**DFCP1** : protéine contenant un double domaine FYVE

**DIO** : obésité induite par l'alimentation

**DMN** : noyau dorsomédian

**ECS** : système endocannabinoïde

**eIF4E** : facteur d'initiation eucaryote 4E

**ER** : réticulum endoplasmique

**ERK** : kinase régulée par un signal extracellulaire

**ESCRT** : complexes de tri endosomal requis pour le transport

**FAAH** : fatty acid amid hydrolase

**FAK** : focal adhesion kinases

**FAT** : FKBP12-rapamycin-associated protein, ataxia telangiectasia mutated, transformation/transcription domain associated protein

**FATC** : FAT C-terminal

**FIP200** : focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa

**FKBP12** : FK506-binding protein of 12 kDa

**FoxO1** : Forkhead box O1

**FRB** : FKBP12-Rapamycin binding domain

**FYCO1** : FYVE and coiled to coil domain containing protein

**GABA** : acide  $\gamma$ -aminobutyrique

**GAP** : protéine activant la GTPase

**GHSR** : growth hormone secretagogue receptor

**GPCR** : récepteurs couplés à la protéine G

**GSK3** : glycogène synthase kinase 3

**GTP** : guanosine triphosphate

**HDL** : lipoprotéines de haute densité

**HEAT** : huntingtine, facteur d'élongation 3, protéine phosphatase 2A et TOR1

**HFD** : régime riche en graisses

**HIF1 $\alpha$**  : facteur induit par l'hypoxie

**HPA** : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

**HSL** : lipase hormono-sensible

**icv** : intra cérébroventriculaire

## Liste des principales abréviations

**IGF-1** : facteur de croissance apparenté à l'insuline 1

**ip** : intrapéritonéale

**IR** : récepteurs à l'insuline

**IRS** : récepteurs envers des substrats

**Jak2/STAT3** : Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3

**KEAP1** : Kelch-like ECH-associated protein 1

**LAMP** : protéines de membranes associées au lysosome

**LC3** : protéine associée aux microtubules 1A/1B, chaîne légère 3

**LHA** : aire hypothalamique latérale

**LIR** : domaine d'interaction avec LC3

**LTP** : potentialisation à long terme

**MAGL** : monoacylglycérol lipase

**manoyl-CoA** : manoyl-coenzyme A

**MAPK** : protéine kinase activée par les agents mitogènes

**MB** : corps mamillaires

**MCH** : hormone de concentration de la mélanine

**MCn** : neurones magnocellulaires

**MCR** : récepteurs à la mélanocortine

**mLST8** : mammalian lethal with Sec13 protein 8

**mSin1** : protéine kinase activée par le stress

**mTOR** : cible de la rapamycine chez les mammifères

**mTORC1** : complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères

**mTORC2** : complexe 2 de la cible de la rapamycine chez les mammifères

**NAc** : *nucleus accumbens*

**NAPE** : N-acyl phosphatidylethanolamine

**NAPE-PLD** : N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D

**NF- $\kappa$ B** : facteur nucléaire  $\kappa$ -chaîne légère-activateur de cellules activées B

**NMDA** : N-méthyl-D-aspartate

**NPY** : neuropeptide Y

**NRF2** : facteur nucléaire 2 similaire au dérivé d'érythroïde 2

**NTS** : noyau du tractus solitaire

## Liste des principales abréviations

**OVL**T : *organum vasculosum*

**p62/SQSTM1** : p62 ou séquestrome 1

**PBN** : noyau parabrachial

**PDK1** : phosphatidylinositol 3 dependent kinase 1

**PE** : phosphatidyléthanolamine

**PEVN** : noyau périventriculaire

**PGC1 $\alpha$**  : coactivateur 1 $\alpha$  du récepteur  $\gamma$  activé par les proliférateurs de peroxyosomes

**PHN** : noyau hypothalamique postérieur

**PI3K** : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

**PI(3)P** : phosphatidylinositol-3-phosphate

**PIK** : phosphatidylinositol 3-kinase

**PIKK** : PIK-related protein kinases

**PIP2** : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

**PIP3** : phosphatidylinositol-3-phosphate

**POA** : aire préoptique

**POMC** : pro-opiomélanocortine

**PPAR $\gamma$**  : récepteurs  $\gamma$  activés par les proliférateurs de peroxyosomes

**PRAS40** : prolin-rich Akt/PKB substrate 40 kDa

**Protor-1** : proteins observed with Rictor 1

**Protor-2** : proteins observed with Rictor 2

**PTEN** : phosphatase et homologue de la tensine

**PVN** : noyau paraventriculaire

**PYY** : peptide YY

**RAPA** : rapamycine

**Raptor** : protéine de régulation associée à mTOR

**REDD1** : regulated in development and DNA damage responses 1

**RER** : quotient respiratoire

**Rheb** : protéine homologue Ras enrichie dans le cerveau

**Rictor** : compagnon de mTOR insensible à la RAPA

**S6K1** : protéine ribosomale S6 kinase 1

**SCN** : noyau suprachiasmatique

## Liste des principales abréviations

**SFO** : organe sous-fornical

**SNARE** : protéine d'attachement au facteur soluble sensible au N-éthylmaléimide

**SNS** : système nerveux sympathique

**SOCS3** : suppresseur de la signalisation des cytokines 3

**SON** : noyau supraoptique

**SREBP-1** : protéines de liaison régulées par les stérols

**TC** : *tuber cinereum*

**TFEB** : facteur de transcription EB

**THC** :  $\Delta$ -9-tétrahydrocannabinol

**TRAF6** : facteur associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale

**TSC1** : tuberous sclerosis complex 1

**TSC2** : tuberous sclerosis complex 2

**UBD** : domaine d'interaction avec l'ubiquitine

**ULK1** : kinase pro-autophagique de type unc-51

**VMN** : noyau ventromédian de l'hypothalamus

**Vps34** : protéine de tri vacuolaire 34

**VTA** : aire tegmentale ventrale

**WAT** : tissu adipeux blanc

**WIPI-1** : protéines contenant un motif WD40 interagissant avec les phosphoinositides 1

**WIPI-2** : protéines contenant un motif WD40 interagissant avec les phosphoinositides 2

**YY1** : facteur de transcription yin-yang 1





# SOMMAIRE

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Les concepts de balance énergétique et de métabolisme</b>	<b>1</b>
<b>L'hypothalamus</b>	<b>6</b>
Anatomie générale	6
Le noyau arqué et le système mélanocortine	9
Les autres noyaux hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie énergétique	12
Le noyau paraventriculaire	12
Le noyau ventromédian	14
Le noyau dorsomédian	15
L'aire hypothalamique latérale	15
Le noyau suprachiasmatique	16
Action des hormones et des nutriments sur les circuits hypothalamiques	16
Signaux anorexigènes	17
La leptine	17
L'insuline	18
Le glucose	20
Les acides gras	20
Les acides aminés	21
Une hormone orexigène : la ghréline	22
<b>La voie de signalisation de mTOR</b>	<b>23</b>
Vue d'ensemble	23
Régulation de la voie de mTORC1	27
Régulateurs en amont de mTORC1	27
Effecteurs de mTORC1	29
Le rôle de mTORC1 dans la régulation de la balance énergétique	30
<b>L'autophagie</b>	<b>36</b>
Déroulement du flux autophagique	38
Régulation de l'autophagie	40
La régulation de l'autophagie par la protéine p62/SQSTM1	43

<b>Le système endocannabinoïde</b>	<b>46</b>
Vue d'ensemble	46
Le rôle de l'ECS dans la régulation de la balance énergétique	50
Le rôle de l'ECS dans les tissus périphériques	50
Le rôle de l'ECS dans le système nerveux central	55
<b>Problématiques et objectifs</b>	<b>60</b>
<b>Etude I</b>	<b>63</b>
<b>mTORC1 et l'ECS contrôlent deux sous-populations de neurones à POMC, régulant la prise alimentaire de façon opposée</b>	<b>63</b>
Contexte de l'étude	63
But de l'étude et approches	64
Résultats	65
Article I	67-138
Discussion et perspectives	139
<b>Etude II</b>	<b>143</b>
<b>Le dérèglement de l'autophagie au sein des neurones à POMC altère la balance énergétique et perturbe les voies de signalisation de mTORC1 et de STAT3, ainsi que la morphologie des neurones à POMC</b>	<b>143</b>
Contexte de l'étude	143
But de l'étude et approches	144
Résultats	145
Article II	147-182
Discussion et perspectives	183
<b>Discussion générale</b>	<b>187</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>197</b>

# Introduction générale



## Les concepts de balance énergétique et de métabolisme

L'énergie est le fondement de toute vie. Sans elle, nous ne serions que de la matière inerte, incapables de nous mouvoir, nous reproduire, et nous alimenter. Ces trois grandes fonctions de la physiologie, humaine et des autres organismes vivants, respectent le premier principe de la thermodynamique, exposé par Lavoisier au XVIII<sup>ème</sup> siècle, qui dit que l'énergie peut se transformer d'une forme à une autre mais ne peut être ni créée ni détruite. Ce principe est généralement formulé comme suit : le taux de conversion et de stockage de l'énergie  $E_s$  est égal à la différence entre les apports énergétiques  $E_i$  et l'utilisation de l'énergie  $E_o$  ( $E_s = E_i - E_o$ ).  $E_i$  est composé essentiellement de l'énergie chimique provenant de la nourriture et des fluides que nous consommons.  $E_o$  comprend la production de chaleur et l'activité physique.  $E_s$  est le taux de conversion des stocks de macronutriments du corps. La vie repose donc sur la capacité à détecter des sources d'énergie dans le milieu extérieur afin de les transformer en énergie utilisable pour l'organisme, et à les stocker. Cette homéostasie ou balance énergétique est essentielle à la survie des organismes, car elle nous permet de connaître nos besoins énergétiques et nos réserves, et ainsi de pouvoir engager l'un ou l'autre afin d'assurer le bon fonctionnement de nos différentes fonctions physiologiques.

Chez les espèces primitives unicellulaires, la régulation de cette balance énergétique s'appuie sur leur capacité à capter, transformer, stocker et utiliser les nutriments présents dans leur environnement. Des espèces qui seraient dotées de mécanismes de détection du glucose, des lipides ou d'acides aminés possèderaient un avantage certain de survie par rapport à d'autres qui en sont dépourvus (Herman and Kahn, 2006 ; Efeyan et al., 2015). Cependant, au cours de l'évolution, ces mécanismes se sont complexifiés. Les espèces plus évoluées, telles que l'homme, bien que toujours dirigées par leurs besoins endogènes, sont également soumises à des facteurs exogènes pouvant influencer la prise alimentaire et qui, par conséquent, participent à l'épidémie mondiale d'obésité (Hill and Peters, 1998; Bauman et al., 2012 ; Lucassen et al., 2012), qui touche actuellement plus de 600 millions d'adultes et représente 6% des dépenses de santé en Europe selon l'OMS ([http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/98243/E89858.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/98243/E89858.pdf)).

Les premières hypothèses stipulaient que le siège du contrôle de la régulation de la faim se situait dans la cavité abdominale, et plus particulièrement au niveau de l'estomac (Mayer and Thomas, 1967). Mais depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle, grâce notamment aux travaux de Magendie, Bernard et Mohr, un éventuel lien entre le comportement alimentaire et le système nerveux central (CNS) est mis en lumière (Mayer and Thomas, 1967). Certaines études sont venues par

la suite corroborer cette hypothèse d'un contrôle central de la prise alimentaire, notamment lorsqu'un individu continuait d'observer une sensation de faim après une gastrectomie (Wangensteen and Carlson, 1931). Les difficultés méthodologiques associés à l'investigation sur le CNS ont quelque peu retardé le développement des théories centrales de régulation. Cependant, l'arrivée des premières études lésionnelles dirigées au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle a permis d'entrevoir un rôle d'une première structure cérébrale, l'hypothalamus, dans la régulation du comportement alimentaire et de la balance énergétique. Ces études ont permis d'identifier un centre de la satiété au niveau du noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMN) et un centre de la faim au niveau de l'aire hypothalamique latérale (LHA) (Hetherington and Ranson, 1942 ; Anand and Brobeck, 1951). De nombreuses études ont par la suite permis l'identification de nouveaux noyaux hypothalamiques, tels que le noyau arqué (ARC), le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau dorsomédian (DMN) et le noyau suprachiasmatique (SCN), ainsi que des régions extra-hypothalamiques, telles que des structures du lobe temporal, le noyau du tractus solitaire (NTS), le noyau parabrachial (PBN), le thalamus et le système limbique, coordonnant également la régulation de la balance énergétique (Belgardt and Bruning, 2010). Ces différents travaux de recherches ont permis de souligner l'hétérogénéité structurale de l'hypothalamus, et ainsi de mettre en évidence des populations de neurones spécifiques au sein des différents noyaux de l'hypothalamus mais également de structures et de circuits neuronaux au niveau central communiquant entre eux et avec la périphérie afin de réguler la prise alimentaire.

La régulation de la prise alimentaire fait donc intervenir différents types neuronaux caractérisés par l'expression de différents récepteurs et par la production de différents neuromédiateurs au niveau hypothalamique. Ces neurones sont capables d'intégrer de nombreux signaux afférents provenant essentiellement de l'alimentation et renseignant de l'état énergétique de l'organisme. L'énergie dérive donc du métabolisme des aliments, aboutissant à la synthèse d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) via le cycle de Krebs, qui est le point final du catabolisme des trois principales sources de macronutriments - glucides (glycolyse), lipides ( $\beta$ -oxydation) et protéines (transamination). Cependant, l'ATP ne constitue pas une forme d'énergie pouvant être stockée, car il est très vite dégradé. Afin de se perpétuer, les organismes ont alors dû s'appuyer sur d'autres mécanismes susceptibles de leur fournir l'énergie nécessaire, notamment en développant la capacité à stocker les macronutriments au vu d'une utilisation ultérieure. Cette capacité de stockage des macronutriments permet également d'informer directement ou indirectement, notamment via la libération de signaux hormonaux spécifiques, les régions responsables de la régulation de la balance énergétique sur la quantité et la

disponibilité des sources énergétiques. Plusieurs théories de l'action des macronutriments directement sur l'activité des centres de la faim et de la satiété au niveau hypothalamique ont alors émergées (Seeley and Woods, 2003).

La théorie glucostatique propose que le métabolisme des glucides au niveau de l'hypothalamus produit la sensation de satiété (Mayer, 1955; Woods, 2013). Cette sensation de satiété est favorisée par l'augmentation de la concentration plasmatique de glucose comme cela se produit au cours d'un repas. A l'inverse, une fois l'absorption terminée, la réduction du glucose plasmatique serait à l'origine de la sensation de faim. Cette hypothèse est notamment appuyée par le fait qu'une injection intra-péritonéale de 2-déoxy-D-glucose, un analogue non métabolisable du glucose, stimule la prise alimentaire (Houpt and Hance, 1971). L'augmentation de la concentration plasmatique de glucose stimule la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. L'injection intra cérébroventriculaire (icv) de cette hormone, via l'activation des récepteurs à l'insuline au niveau neuronal, plus particulièrement au niveau de l'hypothalamus, diminue la prise alimentaire et entraîne une perte de poids corporel (King, 2006; Woods, 2013). Cependant, ses effets sur la satiété sont difficiles à mettre en évidence en raison de l'hypoglycémie qui survient lorsque l'insuline est injectée en périphérie (Gregory et al., 2015). D'autre part, elle stimule la lipogenèse au niveau du foie et réduit en parallèle la lipolyse au niveau du tissu adipeux blanc (WAT) (Samuel and Shulman, 2012), ce qui fait également d'elle un signal étayant la théorie lipostatique.

La théorie lipostatique, quant à elle, repose sur l'action de signaux humoraux reflétant les stocks énergétiques sous forme lipidique, sur l'hypothalamus, qui, en réponse, modulera la prise alimentaire et la dépense énergétique. L'un de ces signaux humoraux le plus étudié est la leptine. Cette hormone, produit du gène *ob* (Zhang et al., 1994), est principalement sécrétée par les adipocytes du WAT (Gautron and Elmquist, 2011). La concentration plasmatique de leptine augmente avec les réserves lipidiques du WAT, elle diminue lors du jeûne et s'élève après le repas. Après avoir traversé la barrière hématoencéphalique (BHE) et en se fixant sur ses récepteurs au niveau de l'hypothalamus, la leptine entraîne une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (Friedman, 2010). En résumé, le WAT est donc la réserve énergétique de l'organisme et la leptine un signal d'adiposité qui permet de réguler la prise alimentaire.

Enfin, une troisième et dernière théorie selon laquelle la présence de nourriture dans le tube digestif entraîne la libération de plusieurs peptides intestinaux agissant sur l'hypothalamus afin d'inhiber la prise alimentaire voit le jour, notamment suite à la découverte de la cholécystokinine (CCK) en 1928. La CCK est une hormone sécrétée par les cellules endocrines



du duodénum en réponse à l'arrivée de protéines et également de lipides dans le lumen. Elle est considérée comme un facteur de satiété car son administration intrapéritonéale (ip) ou directement dans l'hypothalamus a un effet anorexigène (Perry and Wang, 2012). Quelques années plus tard, deux nouveaux peptides, tous deux sécrétés par l'appareil digestif et ayant des actions antagonistes sur la prise alimentaire, ont été découverts : la ghréline et le peptide YY (PYY) qui signalent respectivement la faim et la satiété au niveau de l'hypothalamus (Perry and Wang, 2012).

Ces différentes théories détaillant comment le cerveau est capable d'intégrer les informations sur la quantité et la disponibilité des sources énergétiques de l'organisme ont évoluées au rythme des recherches neuro-anatomiques, qui ont également permis de mettre en lumière de nombreux acteurs associés à la régulation de la balance énergétique, et notamment certaines cascades intracellulaires recrutées par l'action de ces hormones sur leurs récepteurs spécifiques (Wadikar and Premavalli, 2012).

Parmi ces cascades intracellulaires, la voie de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR) revêt, depuis peu, un tout autre rôle que celui qu'on lui connaissait. En effet, cette voie de signalisation est décrite jusqu'alors comme un carrefour des grandes fonctions cellulaires indispensables à la survie de la cellule incluant la croissance et la prolifération cellulaire, l'expression génique (biogenèse des ribosomes et synthèse protéique), la biogenèse des lysosomes et l'autophagie, la morphologie et l'activité neuronale (Laplante and Sabatini, 2012 ; Costa-Mattioli and Monteggia, 2013). Mais de nombreux travaux récents témoignent de l'importance de la voie de mTOR dans le maintien de l'homéostasie énergétique et de son rôle au niveau du CNS sur le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel. Une dérégulation de cette voie de signalisation est d'ailleurs décrite en cas d'obésité ou de diabète de type 2 (Laplante and Sabatini, 2012 ; Costa-Mattioli and Monteggia, 2013). mTOR est une sérine-thréonine kinase qui agit comme un 'senseur' du niveau énergétique de la cellule. En effet, lors d'un jeûne où la disponibilité des sources énergétiques est faible, l'activité de mTOR au niveau hypothalamique est diminuée, tandis que lors d'un paradigme de réexposition à la nourriture après un jeûne dit de « refeeding », qui augmente donc la disponibilité des sources énergétiques, la voie de mTOR est activée (Minokoshi et al., 2004 ; Cota et al., 2006 ; Blouet et al., 2008 ; Dagon et al., 2012). De même, mTOR est également activé en présence d'hormones impliquées dans la régulation de la balance énergétique et du métabolisme, dont l'insuline et la leptine (Cota et al., 2006 ; Muta et al., 2015), ainsi qu'en présence de nutriments, tels que la leucine (Cota et al., 2006). Cette activation de la voie de mTOR induite par la leucine entraînait d'ailleurs une réduction de la prise alimentaire (Cota et al., 2006 ; Ropelle et al., 2008;

Blouet et al., 2009). Ainsi, mTOR est localisé dans les populations neuronales hypothalamiques régulant la prise alimentaire, faisant de lui une cible thérapeutique potentielle pour lutter contre l'obésité.

Un autre acteur qui s'est récemment vu attribuer un rôle important dans la régulation de la balance énergétique est le système endocannabinoïde (ECS). Des sources historiques, datant de 300 ans avant J.-C., rapportaient déjà des propriétés psychotropes et orexigènes de la plante *Cannabis sativa* (également connue sous le nom de marijuana), et notaient que sa consommation était accompagnée d'une très forte envie de nourriture sucrée et palatable (Abel, 1975). Mais c'est seulement après la découverte de récepteurs spécifiques couplés à la protéine G, les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 (CB1R) et CB2 (CB2R), l'identification de leurs ligands exogènes, tel le  $\Delta$ -9-tétrahydrocannabinol (THC) que l'on retrouve dans la plante *Cannabis sativa*, et endogènes, tels l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonyleglycérol (2-AG) ainsi que l'élucidation progressive de leurs voies de biosynthèse et de dégradation (Piomelli, 2003), que nous fûmes en mesure de commencer à comprendre les mécanismes propres à l'ECS qui sous-tendent cette sensation de faim, voire même de fringale, qui accompagne la consommation de marijuana, et de considérer le rôle de l'ECS dans la régulation de la balance énergétique. En effet, les CB1Rs sont abondamment exprimés dans le CNS ; c'est notamment le cas dans des régions contrôlant la prise alimentaire et la dépense énergétique, telles que l'hypothalamus et le tronc cérébral (Cota, 2008; Quarta et al., 2010 ; Bajzer et al., 2011) et celles impliquées dans le circuit de la récompense, telles que le *nucleus accumbens* (NAc) (Parsons and Hurd, 2015) ; mais également dans le système nerveux périphérique et dans les organes impliqués dans l'homéostasie énergétique, tels que le système digestif, le tissu adipeux, le foie et les muscles (Cota, 2007; Quarta et al., 2011 ; Bermudez-Silva et al., 2012). De plus, l'inhibition de l'ECS est bénéfique dans le traitement de l'obésité et d'autres troubles métaboliques (Bermudez-Silva et al., 2012 ; Silvestri and Di Marzo, 2013). Le rimonabant, un médicament anorexigène agissant comme un agoniste inverse des CB1Rs développé et commercialisé par le groupe pharmaceutique Sanofi-Aventis, a obtenu une lettre d'admissibilité à l'approbation en Europe en 2006 comme agent anti-obésité. Cependant, il a été retiré du marché peu de temps après, fin 2008, à cause de troubles psychiatriques graves (dépression, envie de suicide), ce qui a eu pour effet de profondément affecter la poursuite des efforts de développement médicamenteux de l'industrie pharmaceutique, entraînant l'arrêt de tous les programmes de recherche clinique en cours sur les antagonistes des CB1Rs semblables au rimonabant. Néanmoins, les études des dix dernières années n'ont pas seulement apporté des informations sur de nouveaux rôles physiologiques joués par l'ECS dans le contexte de la

balance énergétique mais elles ont également permis d'identifier de nouveaux mécanismes d'action, faisant de l'ECS une cible encore plus attractive qu'auparavant pour le traitement de l'obésité.

Mon projet de thèse a eu pour objectif de disséquer les mécanismes hypothalamiques impliqués dans la détection du statut nutritionnel et de la régulation de la prise alimentaire chez la souris. En introduction, je vous décrirai donc l'organisation générale de l'hypothalamus et du système mélanocortine impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Je décrirai ensuite plus en détail la voie de mTOR, impliquée dans la détection du statut nutritionnel au niveau de l'hypothalamus. Je développerai son organisation fonctionnelle, ses différentes voies et facteurs d'activation, ses effecteurs ainsi que les grandes fonctions qu'elle régule. Je soulignerai l'importance de l'une d'entre elles, l'autophagie, responsable notamment du renouvellement protéique et de la dégradation des lipides, dont l'implication dans le contrôle de la balance énergétique a été depuis peu identifiée. Enfin, j'introduirai l'ECS et préciserai les liens existant entre l'ECS et l'hypothalamus dans le contexte de la régulation de la balance énergétique. Je poursuivrai par les deux études que j'ai menées dans le contexte de mes travaux de thèse. En particulier, dans la première étude, nous avons mis en lien le système mélanocortine, la voie de mTOR et l'ECS dans la régulation de la prise alimentaire. Nous avons par ailleurs démontré l'existence de deux sous-populations de neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) régissant la prise alimentaire de façon opposée. Dans la seconde étude, nous avons examiné l'impact de la délétion de la protéine p62/SQSTM1, dont l'interaction avec la voie de mTOR est importante dans l'initiation du processus autophagique, dans les neurones à POMC sur la régulation de la balance énergétique en caractérisant une nouvelle lignée de souris transgénique possédant une délétion de p62/SQSTM1 restreinte aux neurones à POMC. Je terminerai par une discussion générale des différents résultats obtenus.

## **L'hypothalamus**

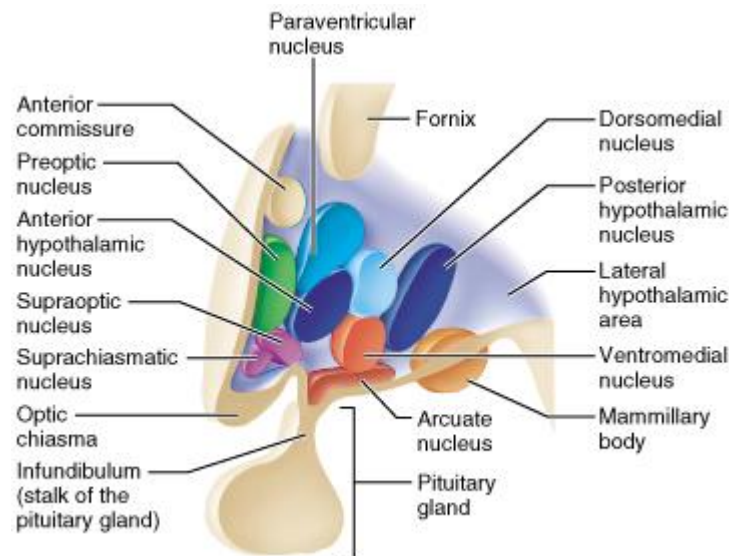
### **Anatomie générale**

L'hypothalamus et l'hypophyse ont attiré l'attention de nombreux scientifiques et artistes depuis leur première description par Galien au II<sup>ème</sup> siècle avant J.-C. dans son ouvrage *De Usu Partium*. Selon lui, l'hypothalamus serait une voie de drainage et l'hypophyse une fosse d'aisance du mucus en provenance des structures ventriculaires cérébrales en direction des cloisons nasales. Ces concepts sur le complexe hypothalamo-hypophysaire ont dominé la pensée scientifique durant plus de 1200 ans jusqu'au XIV<sup>ème</sup> siècle, quand l'anatomiste italien

Mondino de' Liuzzi, dans son œuvre *Anathomia* suggère que le troisième ventricule sert comme un 'intégrateur' des fonctions du corps. Plusieurs de ces idées ont été reprises par Andreas Vesalius au XVI<sup>ème</sup> siècle dans son célèbre ouvrage *De Humani Corporis Fabrica*, notamment la première représentation anatomique de la tige infundibulo-hypophysaire, également appelée tige pituitaire. Cette attention particulière pour la région hypothalamique a d'ailleurs influencé le travail des plus fameux artistes de la Renaissance, tels Léonard de Vinci et Michelangelo Buonarroti, dont les représentations graphiques de l'hypothalamus dans les livres d'anatomie ou bien sur le plafond de la chapelle Sixtine sont des plus célèbres. Ce n'est cependant qu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle qu'est réalisée la première investigation expérimentale de l'hypothalamus (Bailey and Bremer, 1921 ; King, 2006). L'apparition de l'appareil stéréotaxique ainsi que le développement des différentes méthodes histologiques ont ensuite considérablement révolutionné la recherche sur le CNS dans la régulation de la balance énergétique et permis de déterminer précisément la localisation de chaque noyau hypothalamique et d'étudier spécifiquement le rôle de chacun d'entre eux (Woods, 2013).

L'hypothalamus est une structure dont les fonctions sont très conservées au cours de l'évolution, à la différence de nombreuses autres structures du CNS. Il est le centre intégrateur des différentes variables des milieux interne et externe et constitue le principal relais entre les fonctions inférieures contrôlées par le tronc cérébral et la moelle épinière, et supérieures contrôlées, entre autres, par le système limbique, impliqué dans les comportements motivés dont la prise alimentaire (Petrovich, 2011), et le cortex. Ainsi, il peut intégrer une grande partie des fonctions végétatives dépendant du système nerveux autonome, telles la fréquence cardiaque, la vasodilatation et la température corporelle mais intervient également dans la régulation des rythmes circadiens, de la différenciation sexuelle, la reproduction et la lactation, des réponses au stress et immunitaires, de la prise hydrique et surtout de la balance énergétique.

L'hypothalamus est une structure du CNS, où il forme la partie ventrale du diencephale, qui permet de maintenir les fonctions vitales de l'organisme à l'intérieur de certaines limites physiologiques, ce que l'on appelle l'homéostasie. Il est situé à la base du cerveau, au-dessus du tronc cérébral et sous le thalamus dont il est séparé par le sillon hypothalamique de Monro. Il forme le plancher et les parois inféro-latérales du troisième ventricule. Il est délimité en avant par les chiasmas optiques, en arrière par le tectum mésencéphalique et il est relié à l'hypophyse par la tige infundibulaire et l'éminence médiane. On distingue trois régions principales : l'hypothalamus antérieur, l'hypothalamus médial et l'hypothalamus postérieur (Flament-Durand, 1980; Whetzel et al., 2011) (**Figure 1**).



**Figure 1. Représentation schématique des différents noyaux hypothalamiques en vue latérale (adaptée de Benjamin Cummings, [http://www.kean.edu/~jfasick/docs/Spring\\_09 AP-1/Chapter%2012 Part%20I.pdf](http://www.kean.edu/~jfasick/docs/Spring_09_AP-1/Chapter%2012_Part%20I.pdf)).**

L'hypothalamus antérieur siège entre la lame terminale et le bord caudal du chiasma optique. Il est composé de la LHA, de l'aire préoptique (POA), du noyau hypothalamique antérieur (AHN), du PVN, du noyau périventriculaire (PEVN), du SCN, du noyau supraoptique (SON) ainsi que de l'*organum vasculosum* (OVLT) et de l'organe sous-fornical (SFO).

L'hypothalamus médial entoure le récessus infundibulaire du troisième ventricule qui se trouve entre le chiasma optique et les corps mamillaires. Il est composé de l'axe hypothalamo-hypophysaire (hypophyse et éminence médiane), de la LHA, de l'ARC, du DMN, du VMN et du *tuber cinereum* (TC).

Les corps mamillaires (MB) forment deux masses proéminentes à la face basale du diencephale et marquent la limite de l'hypothalamus postérieur. Celui-ci comprend donc les MB, mais aussi la LHA et le noyau hypothalamique postérieur (PHN).

Chacune de ces régions comprend donc plusieurs groupements de neurones (ou noyaux hypothalamiques) qui sont interconnectés de manière précise et spécifique, établissant des projections neuronales vers d'autres noyaux, qui vont être importantes pour l'intégration des signaux endogènes et exogènes et la régulation des différentes fonctions végétatives au niveau hypothalamique. L'hypothalamus possède également d'importantes connexions, souvent réciproques, avec diverses structures du cerveau dont le septum, l'amygdale, l'hippocampe, le thalamus, et le cortex cérébral, notamment impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémoire et les réponses émotionnelles, ainsi que certaines structures impliquées dans le système de récompense, telles que l'aire tegmentale ventrale (VTA) et le NAc, procurant la motivation nécessaire à la réalisation d'actions ou de comportements adaptés, permettant de

préserver l'individu et l'espèce (recherche de nourriture, reproduction, évitement des dangers, etc.). Ces nombreuses connexions permettent à l'hypothalamus d'assurer son rôle de centre d'intégration des signaux pour la survie générale de l'organisme. En outre, l'hypothalamus constitue une structure clé dans la régulation de la balance énergétique. De nombreux noyaux et populations neuronales hypothalamiques ont été révélés comme jouant un rôle dans la régulation de cette balance. Ils ont été identifiés grâce à de nombreux travaux étudiant les conséquences de lésions focales de régions spécifiques hypothalamiques sur la prise alimentaire et le poids corporel (Elmqvist et al., 1999). Ces structures permettent d'intégrer les différents signaux d'origine périphérique tels que les nutriments (glucides, lipides, protéines) et les hormones (par exemple, leptine, insuline, ghréline) afin d'engager les réponses adaptatives d'ingestion d'énergie (via les aliments), de stockage et/ou utilisation en agissant sur le système nerveux sympathique (SNS) et les organes périphériques impliqués dans la balance énergétique (estomac, intestin, foie, pancréas, muscle et tissu adipeux) (Cota et al., 2007a). L'hypothalamus contrôle ainsi la prise alimentaire, le métabolisme des nutriments et la dépense énergétique. Les principaux noyaux impliqués sont l'ARC, le PVN, le VMN, le DMN, la LHA et, dans une moindre mesure, le SCN.

### **Le noyau arqué et le système mélanocortine**

De tous les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique, l'ARC est considéré comme étant un des acteurs majeurs (Seeley and Woods, 2003). Sa localisation dans l'hypothalamus médial, à la base de l'hypothalamus, de part et d'autre du troisième ventricule et à proximité de l'éminence médiane, où la présence de capillaires fenestrés caractérisés par une barrière hémato-encéphalique incomplète ou perméable (Belgardt et al., 2009) facilite sa capacité à détecter les signaux périphériques. De plus, l'ARC possède la plus forte expression de récepteurs à la leptine et à l'insuline de l'hypothalamus (Baskin et al., 1994; Schwartz et al., 1996), suggérant un rôle critique de ce noyau dans l'action de ces hormones dans la régulation de la balance énergétique. L'ARC contient des neurones dits de « premier ordre », car ils sont directement stimulés par les signaux circulants (Cone et al., 2001; Ciofi et al., 2009). Ces neurones projettent leurs axones sur les autres noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique, tels que le PVN, ainsi que vers le tronc cérébral (Belgardt and Bruning, 2010).

Parmi les neurones constituant l'ARC, deux populations aux actions antagonistes ont été particulièrement étudiées dans le contexte de régulation de la balance énergétique : une population produisant la POMC, dont les produits dérivés diminuent la prise alimentaire, et une

population produisant l'agouti-related peptide (AgRP), un puissant peptide augmentant la prise alimentaire. Ces peptides agissent sur des récepteurs spécifiques, les récepteurs à la mélanocortine (MCR), exprimés par les neurones de « second ordre » au niveau du PVN, du VMN et du DMN (De Jonghe et al., 2011). Ces différents acteurs constituent le système mélanocortine hypothalamique (Schwartz et al., 1996 ; De Jonghe et al., 2011). Ce système est donc un circuit neural formé de cellules exprimant soit la POMC et ses produits dérivés, l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et l'hormone stimulant l' $\alpha$ -mélanocyte ( $\alpha$ -MSH), provenant du clivage post-traductionnel de la POMC, et agonistes des MC3Rs et MC4Rs ; soit l'AgRP, antagoniste des MC3Rs et MC4Rs, et des cellules cibles exprimant les MCRs (De Jonghe et al., 2011). Dans l'ARC, ces deux populations neuronales co-expriment également, chacune, un autre peptide : les neurones à POMC synthétisent aussi le cocaine and amphetamine related transcript (CART), un peptide avec un effet anorexigène, tandis que les neurones à AgRP synthétisent le neuropeptide Y (NPY), un autre peptide avec un puissant effet orexigène (Grill and Kaplan, 2002 ; Hillebrand et al., 2002; Seeley and Woods, 2003).

De nombreuses études ont également montré que ces neurones semblent interagir entre eux : les neurones à AgRP peuvent réguler l'activité des neurones à POMC (Pinto et al., 2004). En effet, la grande majorité de ces neurones expriment également l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), principal neurotransmetteur inhibiteur du CNS, et envoient des projections inhibitrices aux neurones à POMC, favorisant ainsi la prise alimentaire (Cowley et al., 2001). Tandis que les neurones à POMC semblent être beaucoup plus hétérogènes puisque ces neurones sont capables de libérer soit du GABA, soit du glutamate, principal neurotransmetteur activateur du CNS, voire les deux (Hentges et al., 2009 ; Dicken et al., 2012 ; Jarvie and Hentges, 2012 ; Wittmann et al., 2013). Les neurones à POMC répondent différemment aux signaux périphériques associés à la faim et à la satiété. Les neurones à POMC sont activés par la leptine ou l'insuline tandis que les neurones à AgRP sont inhibés (Takahashi and Cone, 2005 ; Williams et al., 2010). Il existe donc, au sein des neurones à POMC, plusieurs sous-populations qui se distinguent selon leur capacité à répondre à la leptine et à l'insuline ou selon le type de neurotransmetteurs qu'elles libèrent, le GABA, le glutamate ou les deux.

L'importance de ce système mélanocortine dans le contrôle de l'homéostasie énergétique est illustrée dans plusieurs études réalisées chez les rongeurs et chez l'homme (Elmqvist, 2001). Des mutations inactivatrices du gène *Pomc* sont décrites chez la souris où elles provoquent une augmentation de la prise alimentaire et une obésité (Yaswen et al., 1999 ; Gropp et al., 2005). De même chez l'homme, où elles provoquent une obésité morbide et précoce (Krude et al., 1998). A l'inverse, une surexpression d'AgRP entraîne une augmentation de la prise alimentaire

et une obésité chez la souris (Graham et al., 1997), tandis qu'une ablation des neurones à AgRP conduit à une anorexie (Gropp et al., 2005; Luquet et al., 2005). Dans le CNS, cinq sous-types de MCRs ont été identifiés (Abdel-Malek, 2001). Mais seulement deux d'entre eux sont exprimés au niveau de l'hypothalamus et semblent ainsi jouer un rôle important dans la régulation de la balance énergétique, les MC3Rs et MC4Rs (Cone et al., 1996) ; même si l'action des MC3Rs semble tout de même avoir moins d'ampleur puisque une délétion du gène *Mc3r* chez la souris n'a aucun effet sur le poids corporel ou la prise alimentaire (Butler et al., 2000 ; Chen et al., 2000). Les MC4Rs sont largement exprimés dans le cerveau, mais sont particulièrement denses au niveau du PVN, du VMN, du DMN et de la LHA (Pritchard et al., 2002). Ils sont activés par l'ACTH et l' $\alpha$ -MSH, et inhibés par l'AgRP (Cone et al., 1996 ; Abdel-Malek, 2001 ; Leibowitz and Wortley, 2004). Il est intéressant de noter que les effets anoréxigènes des mélanocortines sont médiés par les MC4Rs des cellules parvocellulaires du PVN (Balthasar et al., 2005). En effet, l'activation des MC4Rs, notamment par l'ACTH et l' $\alpha$ -MSH, entraîne la diminution des stocks de graisse corporelle en inhibant la prise alimentaire et en favorisant la dépense énergétique, tandis que l'inhibition des MC4Rs, par l'AgRP ou des mutations inactivatrices du gène *Mc4r*, provoquent une augmentation de la prise alimentaire, une hyperleptinémie, une hyperinsulinémie associées à une obésité (Yaswen et al., 1999 ; Balthasar et al., 2005; Gropp et al., 2005). De même chez l'homme, où les mutations inactivatrices du gène *Mc4r* provoquent une obésité morbide et précoce (Krude et al., 1998). La restauration de l'expression des MC4Rs dans le PVN empêche l'émergence de l'obésité (Balthasar et al., 2005). Il est également important de souligner que le régime alimentaire, le statut nutritionnel et les différentes hormones affectent non seulement le fonctionnement des neurones à POMC et à AgRP (Pinto et al., 2004), mais également leur morphologie et leur plasticité structurale et synaptique (Gyengesi et al., 2010; Diano et al., 2011 ; Yang et al., 2011). Toutes ces données démontrent la nécessité d'un système mélanocortine intact pour le maintien d'une bonne homéostasie énergétique.

Quant au CART et au NPY, qui n'appartiennent pas au système mélanocortine mais sont également exprimés par les neurones à POMC et à AgRP, ils vont agir sur des récepteurs spécifiques, un récepteur couplé à une protéine  $G_{i/o}$  et les récepteurs Y1 et Y5, respectivement (Schaffhauser et al., 1997 ; Kushi et al., 1998; Belgardt et al., 2009). L'administration centrale de CART induit une diminution de la prise alimentaire (Kristensen et al., 1998), tandis qu'une délétion du gène *Cartpt* chez la souris entraîne une prise de poids corporel (Asnicar et al., 2001 ; Wierup et al., 2005). L'administration centrale de NPY, quant à elle, entraîne une augmentation de la prise alimentaire et la prise de poids corporel (Stanley et al., 1986), pouvant conduire à



une obésité accompagnée d'une hyperinsulinémie lorsque cette administration est chronique (Zarjevski et al., 1993). L'activité des neurones à POMC est également très fortement inhibée par le NPY (Roseberry et al., 2004). Cependant, la délétion du gène *Npy* ou l'ablation des neurones à NPY ne modifie ni la prise alimentaire, ni la prise de poids corporel chez la souris (Qian et al., 2002 ; Bewick et al., 2005). Ceci indique que d'autres facteurs inhérents aux différentes sous-populations de neurones à AgRP et à POMC peuvent également influencer la régulation de la balance énergétique.

L'état énergétique de l'organisme va fortement influencer la manière dont ces deux populations neuronales vont réagir en réponse aux signaux périphériques ; elles vont agir de façon complémentaire. Lors d'un jeûne, l'activité électrique des neurones anorexigènes et l'expression de la POMC et du CART diminuent tandis que l'activité électrique des neurones orexigènes et l'expression du NPY et de l'AgRP augmentent, entraînant une augmentation de l'appétit, de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique (Richard, 2015). A l'inverse, lors d'une exposition à la nourriture ainsi que lors d'expériences de « refeeding », l'activité des neurones anorexigènes augmente et l'activité des neurones orexigènes diminue. Cela entraîne des cascades de signalisation intracellulaire complexes, partiellement connues, qui aboutissent à une sensation de satiété, une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique.

## **Les autres noyaux hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie énergétique**

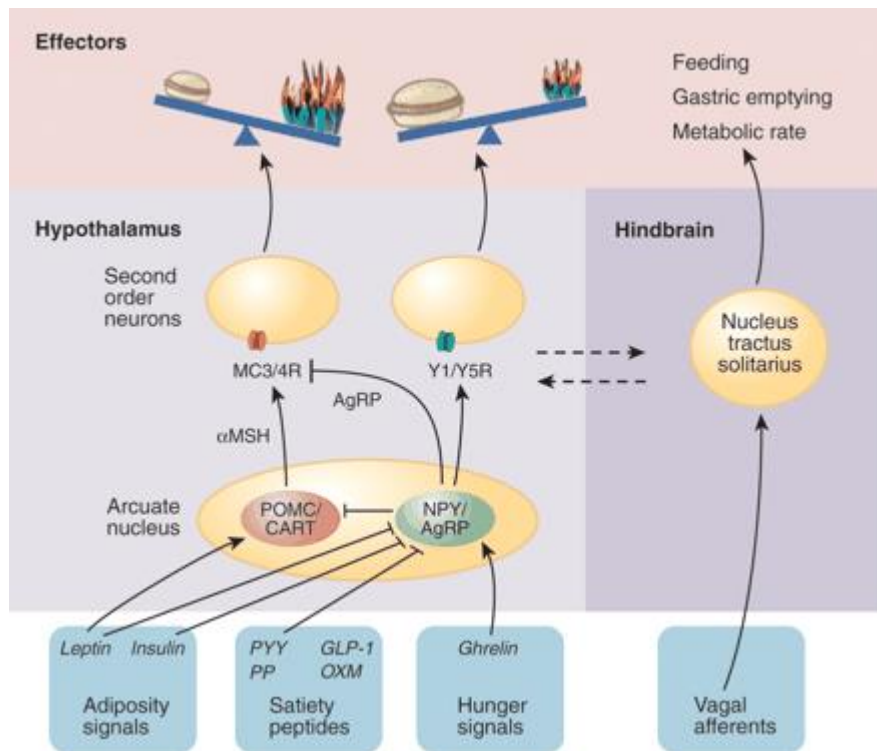
### **Le noyau paraventriculaire**

Le PVN, de par sa position, adjacente au troisième ventricule, et du fait qu'il soit l'une des régions les plus innervées par les neurones à POMC et à AgRP, est également fortement impliqué dans la régulation de la balance énergétique (Cone, 2005). A l'instar du VMN, le PVN a peu à peu présenté un rôle de centre de la satiété puisqu'une lésion bilatérale du PVN entraîne une augmentation de la prise alimentaire et une obésité (Sims and Lorden, 1986). Il est également constamment informé du statut énergétique de l'organisme, grâce à ses afférences provenant de l'ARC, du VMN et de la LHA, mais surtout du NTS, qui reçoit les informations périphériques via le nerf vague (Valassi et al., 2008). Il se compose de deux populations neuronales, les neurones magnocellulaires (MCn) et les neurones parvocellulaires, qui se distinguent par leur taille et leurs propriétés électrophysiologiques. Ces neurones sécrètent de nombreuses hormones et projettent leurs axones sur l'hypophyse, le système porte hypophysaire mais également vers le tronc cérébral et la moelle épinière, permettant au PVN de moduler de nombreuses fonctions physiologiques, notamment en modulant l'axe

hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), et d'avoir un contrôle fin des réponses périphériques, telles que l'activité thermogène du tissu adipeux brun (BAT) et la dépense énergétique (Ulrich-Lai and Herman, 2009).

Le PVN est une des cibles de l'action des mélanocortines. Les MC3Rs et les MC4Rs sont exprimés dans les MCn et les neurones parvocellulaires, qui sont recrutés par les neurones de « premier ordre » à POMC et à AgRP de l'ARC (Woods, 2005). Le PVN est particulièrement impliqué dans la réponse de prise alimentaire induite par le jeûne (Singru et al., 2007). Les souris soumises à un jeûne, puis réexposées à la nourriture, présentent une réponse hyperphagique ; cette réponse est en partie contrôlée par l'action des neurones à POMC sur le PVN (Singru et al., 2007 ; Sanchez et al., 2008). De plus, il semblerait que l'activation des neurones à POMC soit très rapide et intervienne avant même que la nourriture ne soit consommée, au moment même où la nourriture est présentée à l'animal (Chen et al., 2015). Enfin, une sous-population de neurones parvocellulaires projetant sur le NTS et principalement glutamatergique a été mise en évidence, suggérant que les neurones parvocellulaires activés par l' $\alpha$ -MSH dans le PVN pourraient contribuer à la satiété induite par l'absorption de nourriture médiée par le nerf vague à travers des effets sur le NTS, notamment en modulant la sensibilité des neurones du NTS aux signaux de satiété provenant du nerf vague via une excitation glutamatergique (Singru et al., 2012).

Quant aux peptides AgRP et NPY, ils entraînent tous les deux une augmentation de la prise alimentaire en exerçant leurs effets sur les neurones du PVN. Cependant, leurs actions ne sont pas médiées pas les mêmes récepteurs et ont une durée plus ou moins importante. En effet, l'administration d'AgRP induit une hyperphagie en agissant sur les MC4Rs, et peut durer jusqu'à six jours (Hagan et al., 2000) ; alors que le NPY agit par le biais de ses récepteurs Y1 et Y5, mais ne dure que quelques heures (Beck, 2006). De plus, une lésion bilatérale du PVN ou une délétion des gènes *Npy1r* et *Npy5r* dans le PVN bloque l'effet orexigène du NPY (Nguyen et al., 2012; Wang et al., 2013). Cependant, bien que les neurones à NPY provenant de l'ARC et du DMN projettent leurs axones sur le PVN, seuls ceux provenant du DMN projettent sur les régions du tronc cérébral, où sont relayés les messages de satiété du nerf vague (Moran, 2010). Ainsi, le PVN semble être la cible privilégiée de l'ARC pour son rôle de régulateur de la balance énergétique (**Figure 2**).



**Figure 2. Représentation schématique de la régulation hypothalamique de la balance énergétique (adaptée de Daniele Focosi, <http://www.ufrgs.br/immunovet/molecularimmunology/gastrointestinal.html>).**

Les différentes hormones (la leptine sécrétée par le WAT ; l'insuline sécrétée par le pancréas ; la ghréline, le GLP-1, la CCK, le PYY, le PP et l'OXM libérés par le tractus gastro-intestinal) et nutriments provenant de la périphérie traversent la BHE et sont intégrés au niveau des neurones anorexigènes à POMC/CART et orexigènes à AgRP/NPY de l'ARC où ils modulent leur activité neuronale et la libération des différents neuropeptides qu'ils expriment. Ces neurones émettent des projections et vont à leur tour moduler l'activité des neurones de « second ordre », notamment au niveau du PVN, qui en réponse vont réguler la balance énergétique. Ces hormones et nutriments agissent également sur le NTS soit directement, soit indirectement en modulant les afférences vagales. GLP-1 : glucagon-like peptide-1 ; PP : polypeptide pancréatique ; OXM : oxyntomoduline.

### **Le noyau ventromédian**

L'importance du rôle du VMN dans la régulation de balance énergétique a été observée dans les années 1940. En effet, une lésion bilatérale du VMN entraînait une augmentation de la prise alimentaire et une obésité (Hetherington and Ranson, 1942). Récemment, une étude utilisant des stimulations électriques du VMN a montré que cette méthode induisait une diminution du gain de poids corporel sans modification de la prise alimentaire, confirmant le rôle du VMN dans la régulation de la dépense énergétique (Melega et al., 2012). Le VMN constitue donc un centre de satiété. Il joue également un rôle dans l'homéostasie glucidique. En effet, il est constitué de deux populations neuronales gluco-sensibles : une population qui est stimulée par le glucose et inhibée par l'hypoglycémie de type GABAergique, et une population

qui est inhibée par le glucose et stimulée par l'hypoglycémie de type glutamatergique (Song et al., 2001 ; Tong et al., 2007; Zhu et al., 2010 ; Fioramonti et al., 2011). Le VMN contient également des neurones exprimant les MC3Rs et les MC4Rs (Kishi et al., 2003 ; Begriche et al., 2011). Une inhibition de ces neurones exprimant les MC3Rs et MC4Rs entraîne une augmentation de la prise alimentaire, de la prise de poids corporel, une hyperleptinémie et une hyperinsulinémie (de Backer et al., 2011). Il reçoit des projections de l'ARC et émet des projections glutamatergiques sur les neurones à POMC de l'ARC (Sternson et al., 2005), mais aussi sur le PVN, le DMN, la LHA et le NTS (Canteras et al., 1994; McClellan et al., 2006). Enfin, il est également important de noter que le VMN est le noyau hypothalamique possédant la plus forte concentration en mRNA des CB1Rs (Marsicano and Lutz, 1999), et que les connexions GABAergiques et glutamatergiques provenant des régions corticales et sous corticales projetant leurs axones sur le VMN expriment également les CB1Rs (Reguero et al., 2011), faisant de ce noyau un point important dans la médiation des effets de l'ECS. Ce noyau est donc crucial dans le maintien de l'homéostasie énergétique.

### **Le noyau dorsomédian**

Des études lésionnelles et de stimulation électrique ont mis en évidence le rôle du DMN dans la régulation de la prise alimentaire, de la prise hydrique et de la croissance corporelle (Bellinger and Bernardis, 2002). Le DMN fait également partie des noyaux hypothalamiques cibles du système mélanocortine. Il exprime les MC3Rs et les MC4Rs et reçoit des projections des neurones à POMC et à AgRP provenant de l'ARC (Mountjoy et al., 1994). Il est constitué principalement de deux populations neuronales : une population sécrétant l'orexine A (Pinos et al., 2011), et une libérant la CCK et étant gluco-sensible (Zhu et al., 2012). Les neurones du DMN exprimant les récepteurs Y1 et Y5, seraient donc les cibles des neurones à NPY de l'ARC et seraient impliqués dans l'effet orexigène de ce peptide (Bi et al., 2012). De plus, l'exposition à un régime riche en graisses augmente l'activité des neurones du DMN (Xin et al., 2000) et le DMN est également un site d'action de la leptine (Enriori et al., 2011). Ce noyau participe ainsi à la coordination des réponses appropriées pour le maintien de l'homéostasie énergétique, et notamment la régulation de la glycémie périphérique par l'intermédiaire des neurones à CCK (Zhu et al., 2012).

### **L'aire hypothalamique latérale**

La LHA, contrairement aux autres noyaux de l'hypothalamus, possède une organisation beaucoup plus étendue. Des études lésionnelles et d'électrostimulation ont démontré qu'elle était plutôt une région stimulatrice de la prise alimentaire (Leinninger, 2011). Elle projette des

axones sur les autres noyaux hypothalamiques, ainsi que sur d'autres régions extracérébrales, tel le système limbique (Petrovich, 2011). Elle possède trois populations neuronales connues : une population sécrétant l'hormone de concentration de la mélanine (MCH), qui stimule la prise alimentaire (Gomori et al., 2003), une libérant les orexines A et B, qui augmentent l'appétit (Sakurai et al., 1998), et une sécrétant du NPY et étant gluco-sensible (Marston et al., 2011). Ces populations neuronales semblent, toutes trois, jouer un rôle dans la régulation de la prise alimentaire.

### **Le noyau suprachiasmatique**

Le SCN est considéré comme le régulateur principal des rythmes circadiens (Albrecht, 2012). Il est capable de percevoir et d'intégrer les informations environnementales, grâce à ses connections avec la rétine notamment, ainsi que les signaux provenant des différents tissus de l'organisme, grâce à différentes voies de signalisation intracellulaires telle la voie de mTOR, et doit être capable de synchroniser ces informations afin d'orchestrer le fonctionnement des différents tissus, et ainsi les comportements (Albrecht, 2012). Cette synchronisation va s'effectuer via l'expression de « gènes horloges » par la SCN, qui vont rythmer l'expression et la libération de différents neuropeptides, tels que le peptide vasoactif intestinal, la vasopressine et le peptide libérant la gastrine et le GABA, qui sont aussi impliqués dans la régulation de la balance énergétique (Albrecht, 2012). Le SCN projette des axones sur l'ARC, le PVN et le DMN, et va donc pouvoir, dans une certaine mesure, influencer les signaux émis par ces populations neuronales en fonction des conditions environnementales et de l'état métabolique de l'organisme, afin de garantir l'adaptation des différentes fonctions physiologiques au rythme circadien. Des études chez l'homme suggèrent que des perturbations des rythmes circadiens sont des facteurs aggravant du syndrome métabolique et peuvent favoriser le développement de l'obésité et des problèmes métaboliques associés, tels que le diabète de type 2 (Albrecht, 2012).

### **Action des hormones et des nutriments sur les circuits hypothalamiques**

Les neurones hypothalamiques sont capables de détecter les concentrations plasmatiques de nombreuses hormones sécrétées par les organes ou tissus périphériques mais également les nutriments. En effet, les circuits hypothalamiques répondent aussi bien aux signaux anorexigènes, tels que la leptine, l'insuline et les nutriments (glucides, lipides, protéines), qu'aux signaux orexigènes, telle la ghréline (Tschop et al., 2000 ; Leshan et al., 2006 ; Del Prete et al., 2012 ; Thorens, 2012). Grâce à cette capacité de détection de l'hypothalamus, le cerveau est ainsi constamment informé du statut énergétique de l'organisme et peut ainsi adapter la prise alimentaire selon les besoins de l'organisme en modulant la réponse des organes qui y

participent, tels l'estomac, l'intestin, le foie, le pancréas, et contrôler la dépense énergétique par le biais du SNS. En parallèle, il module le métabolisme des lipides au niveau du tissu adipeux et du foie ainsi que l'homéostasie glucidique.

### **Signaux anorexigènes**

#### **La leptine**

La leptine est une hormone sécrétée par le tissu adipeux. Les concentrations plasmatiques de leptine sont corrélées à la quantité de masse grasse et reflètent donc l'état des réserves énergétiques (Friedman and Halaas, 1998). En effet, la leptinémie plasmatique diminue lors du jeûne et s'élève exponentiellement après la prise alimentaire (Kolaczynski et al., 1996). La leptine traverse la BHE via les tanocytes pour se lier à son récepteur (ObR) au niveau des neurones hypothalamiques, en mettant notamment en jeu la voie Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (Jak2/STAT3), afin d'informer le CNS du statut énergétique de l'organisme (Klok et al., 2007 ; Balland et al., 2014). Les neurones à POMC et à AgRP expriment les ObRs et sont inversement régulés par la leptine. Tandis que l'activation des ObRs des neurones à POMC entraîne la libération de POMC et induit une dépolarisation de ces cellules (Cowley et al., 2001), elle entraîne une diminution de la sécrétion de NPY et inhibe les neurones à AgRP (Hill et al., 2010). L'administration centrale ou périphérique de leptine induit une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Wang et al., 1997). Le jeûne alimentaire entraîne une diminution des concentrations plasmatiques de leptine (Mizuno et al., 1998), alors que les patients obèses ont une hyperleptinémie, accompagnée d'une résistance à la leptine au niveau central et périphérique (Sainz et al., 2015).

L'utilisation de modèles génétiques caractérisés par une altération du gène de la leptine *ob* (aussi connus sous le nom de souris *ob/ob*) ou du gène de son récepteur *db* (aussi connus sous le nom de souris *db/db*) a montré que ces souris étaient hyperphagiques, obèses et diabétiques et présentaient une expression des mRNAs de POMC fortement diminuée. L'administration de leptine chez les souris *ob/ob* permet cependant de restaurer partiellement leurs niveaux d'expression (Schwartz et al., 1997; Mizuno et al., 1998). Il a également été montré que la délétion du gène *db* dans les neurones à POMC, entraîne une augmentation de la prise de poids corporel et de la masse grasse (van de Wall et al., 2008), une hyperleptinémie et une altération de l'expression hypothalamique de POMC et AgRP (Balthasar et al., 2004). Paradoxalement, la délétion du gène *db* dans les neurones à AgRP donne un phénotype similaire, probablement due à une réduction de l'activité locomotrice (van de Wall et al., 2008). Ces résultats suggèrent

que la leptine inhibe la prise alimentaire via la modulation coordonnée des neurones à POMC et à AGRP dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

La leptine favorise également la dépense énergétique. En effet, elle module le métabolisme basal, notamment en réduisant le quotient respiratoire (RER), la température corporelle, la consommation en oxygène et l'activité physique chez des souris ob/ob (Hwa et al., 1997; Breslow et al., 1999) et des animaux de type sauvage (Scarpace et al., 1997). Cependant, aucune corrélation entre la leptinémie et le métabolisme chez des patients sains ou obèses n'a été encore démontrée à ce jour (Levine et al., 1999 ; Klok et al., 2007). Enfin, chez des rats obèses déficients pour le récepteur à la leptine, les niveaux d'expression hypothalamiques d'AEA et de 2-AG ainsi que les niveaux d'expression du mRNA de CB1R dans le PVN et le VMN sont augmentés (Di Marzo et al., 2001 ; Jelsing et al., 2009). La leptine, quant à elle, inhibe les neurones orexigènes à MCH de la LHA activés par les endocannabinoïdes, via la réduction des niveaux de calcium intracellulaires qui entraîne une diminution de la synthèse d'endocannabinoïdes (Jo et al., 2005). Ces études suggèrent que la signalisation de la leptine inhibe donc l'action de l'ECS au niveau hypothalamique. Tous ces éléments supportent donc l'idée que l'ObR et sa voie de signalisation, au sein de l'ARC notamment mais aussi dans d'autres régions hypothalamiques, sont des éléments importants dans la médiation des effets de la leptine sur la régulation de la balance énergétique.

### **L'insuline**

L'insuline est sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Elle régule l'homéostasie glucidique en favorisant notamment l'absorption du glucose au niveau du foie, du tissu adipeux et des muscles (Bagdade et al., 1967). Au niveau périphérique, l'insuline a un effet anabolique, favorisant la mise en réserve de l'énergie dans les tissus, mais au niveau central, l'insuline a un effet catabolique en diminuant la prise alimentaire et en augmentant la dépense énergétique (Brown et al., 2006). Les récepteurs à l'insuline (IR) sont abondamment exprimés au niveau de l'hypothalamus, notamment au niveau de l'ARC par les neurones à POMC et à AgRP (Plum et al., 2005). Tandis que l'insuline provoque une diminution de l'expression de NPY (Obici et al., 2001), elle augmente l'expression de POMC mais entraîne une hyperpolarisation des neurones à POMC (Benoit et al., 2002 ; Hill et al., 2010). La délétion du gène *Insr*, codant pour les IRs, au niveau du cerveau entraîne une augmentation de la prise alimentaire, de la masse grasse et de la prise de poids corporel chez la souris (Bruning et al., 2000). A l'opposé, la délétion du gène au niveau des neurones à POMC ou à AgRP ne modifie ni la prise alimentaire ni la prise de poids corporel mais modifie le métabolisme glucidique

périphérique (Konner et al., 2007). L'action de l'insuline sur les neurones à AgRP entraîne une inhibition de la néoglucogenèse hépatique (Okamoto et al., 2004), tandis que son effet sur les neurones à POMC favorise au contraire la production hépatique de glucose et la dépense énergétique (Lin et al., 2010). Les neurones à POMC et à AgRP modulent donc les effets centraux de l'insuline sur l'homéostasie glucidique périphérique. Les neurones du VMN, et dans une moindre mesure les neurones à NPY de la LHA, semblent aussi impliqués dans les effets centraux de l'insuline sur la prise alimentaire et de poids corporel (Varela and Horvath, 2012).

Par ailleurs, bien que la leptine et l'insuline semblent médier des réponses neuronales quelque peu indépendantes, il semble tout de même y avoir une certaine interaction entre ces deux hormones dans l'homéostasie énergétique dans le CNS. En effet, la leptine et l'insuline sont capables d'activer les mêmes voies de signalisations au niveau hypothalamique : le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K)/protéine kinase B (Akt), mTOR, et la protéine kinase activée par la 5'adenosine monophosphatase (AMPK) et de moduler l'expression de facteurs de transcription dont Forkhead box O1 (FoxO1) (Ren et al., 2012). Cependant, l'activation de PI3K/Akt par la leptine entraîne une activation neuronale, tandis que l'activation de cette voie par l'insuline entraîne, au contraire, une inhibition neuronale (Belgardt et al., 2009). La leptine et l'insuline sont également capables d'activer la phosphorylation de FoxO1, dont un des rôles principaux est d'inhiber l'expression de POMC et d'activer l'expression d'AgRP (Kitamura et al., 2006 ; Ren et al., 2012). FoxO1 est alors exporté du noyau, permettant la liaison de STAT3 au promoteur du gène *Pomc* afin de stimuler l'expression de POMC, tandis que dans les neurones à AgRP, l'exportation nucléaire de FoxO1 permet la liaison de STAT3 au promoteur du gène *Agrp* et ainsi inhibe l'expression de l'AgRP (Morrison et al., 2005 ; Ren et al., 2012). L'activation de la voie PI3K par la leptine et l'insuline favorise également l'inhibition par mTOR de l'AMPK et, ainsi, ses cibles, impliquées notamment dans l'absorption du glucose et la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Merrill et al., 1997 ; Claret et al., 2007). Les études pharmacologiques et génétiques démontrent que la leptine et l'insuline jouent, toutes deux, un rôle essentiel dans la régulation de la balance énergétique, en mettant en jeu notamment des voies de signalisation s'avérant, elles aussi, très importantes dans la détection des signaux endogènes et exogènes et permettant à l'organisme une adaptation du comportement alimentaire.



## **Le glucose**

Le cerveau est différent des autres organes dans le sens où sa source d'énergie principale est le glucose (Cota et al., 2007a). En même temps, il doit être capable de détecter les variations de glycémie plasmatique afin de maintenir un niveau d'énergie satisfaisant pour le bon fonctionnement de l'organisme. L'hyperglycémie favorise la diminution de la prise alimentaire par la sécrétion d'insuline et en activant les neurones anorexigènes à POMC (Ibrahim et al., 2003 ; Wang et al., 2004 ; Leloup et al., 2006). Tandis que l'hypoglycémie stimule la prise alimentaire par la sécrétion de glucagon et en activant les neurones orexigènes à AgRP (Biggers et al., 1989 ; Muroya et al., 1999 ; Nonogaki, 2000; Chen et al., 2012). L'idée d'une dichotomie entre différentes populations neuronales quant à la détection du glucose a d'ailleurs déjà été émise au début des années 1960, suggérant l'existence de neurones gluco-sensibles, activés ou inhibés directement par le glucose (Anand et al., 1964 ; Oomura et al., 1964). Les neurones gluco-sensibles sont notamment retrouvés dans plusieurs régions hypothalamiques, dont le VMN et l'ARC (Claret et al., 2007 ; Fioramonti et al., 2007). Les neurones gluco-activés du VMN sont activés lors d'une hyperglycémie via l'ouverture de canaux potassiques sensibles à l'ATP, favorisant leur dépolarisation (Ashford et al., 1990), tandis que les neurones gluco-activés à POMC semblent faire intervenir l'AMPK (Claret et al., 2007). Les neurones gluco-inhibés du VMN sont, quant à eux, activés lors d'une déplétion en glucose via une interaction entre l'AMPK et le monoxyde d'azote entraînant la fermeture de canaux chlorure et une augmentation de la fréquence des potentiels d'action (Murphy et al., 2009 ; Fioramonti et al., 2010), tandis que les neurones gluco-inhibés à AgRP/NPY ne font intervenir ni l'AMPK, ni le NO (Fioramonti et al., 2007 ; Leshan et al., 2012). Ces données suggèrent que l'hypothalamus semble médier directement l'action du glucose sur la modulation de la prise alimentaire, notamment via le recrutement de l'AMPK, et possiblement de mTORC1, au niveau de l'ARC.

## **Les acides gras**

Des études récentes ont montré qu'une certaine catégorie de lipides, les acides gras, sont capables d'agir directement sur le système mélanocortine et de moduler le comportement alimentaire et le métabolisme. En effet, l'administration centrale d'acides gras entraîne une diminution de la prise alimentaire associée à une réduction de l'expression de NPY sans variation de l'expression de POMC (Clement et al., 2002; Obici et al., 2002). A l'inverse, l'administration centrale d'un inhibiteur de la synthèse des acides gras entraîne une diminution de la prise alimentaire (Clegg et al., 2002). Bien que l'oxydation des acides gras ne soit pas la source privilégiée par le cerveau afin de lui fournir de l'énergie (Zauner et al., 2002), la présence

dans l'hypothalamus des principales enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras a suscité une étude plus approfondie quant au rôle possible de ces enzymes dans le cerveau. En effet, les niveaux d'expression du manolyl-coenzyme A (manolyl-CoA), produit par l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC), au niveau de l'hypothalamus sont diminués lors d'un jeûne et augmentés lors d'un paradigme de refeeding et fonctionnent comme un signal de satiété (Hu et al., 2003 ; Cha et al., 2006 ; Lopez et al., 2006). La régulation de l'ACC est sous le contrôle négatif de l'AMPK, entraînant la réduction des niveaux d'expression de manolyl-CoA (Kudo et al., 1995). De plus, l'administration de leptine, qui inhibe l'AMPK entraîne l'activation de l'ACC et une augmentation des niveaux de manolyl-CoA (Gao et al., 2007). L'acide gras synthase est, quant à elle, une enzyme importante de la synthèse *de novo* d'acides gras, utilisant le manolyl-CoA comme substrat. Un inhibiteur de la FAS entraîne une diminution de la prise alimentaire, associée à une réduction de l'expression du gène *Npy* et une augmentation des niveaux de manolyl-CoA, indépendamment de l'action de l'AMPK ou de l'ACC (Loftus et al., 2000 ; Lopez et al., 2006). La délétion du gène codant pour la FAS spécifiquement dans l'ARC et le PVN entraîne une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Chakravarthy et al., 2007). Ces données suggèrent que le cerveau est un site clé dans l'action des acides gras sur la modulation de la prise alimentaire.

### **Les acides aminés**

Les protéines sont des macromolécules constituées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques, elles-mêmes constituées de résidus d'acides aminés. Ces acides aminés sont également connus pour moduler la prise alimentaire. En effet, l'administration centrale de leucine, un des neuf acides aminés essentiels pour l'homme et utilisé dans la biosynthèse des protéines, inhibe la prise alimentaire (Cota et al., 2006) et active les neurones à POMC (Blouet et al., 2009; Blouet and Schwartz, 2010). De plus, cette diminution de la prise alimentaire associée à l'administration centrale de leucine dépend du recrutement de mTOR et de l'inhibition de l'AMPK au niveau de l'hypothalamus (Cota et al., 2006 ; Ropelle et al., 2008 ; Blouet et al., 2009). En outre, l'administration centrale de leucine diminue les niveaux d'expression des gènes *Agrp* et *Npy* et augmente ceux de *Pomc* dans l'ARC (Cota et al., 2006 ; Morrison et al., 2007; Ropelle et al., 2008). Enfin, son administration orale chronique semble améliorer la prise de poids corporel, l'adiposité et la résistance à l'insuline induites par un régime HFD (Zhang et al., 2007 ; Macotela et al., 2011 ; Binder et al., 2013), et est également associée à une réduction de la prévalence de l'obésité chez l'homme (Qin et al., 2011). Cependant, des études récentes ont montré des taux circulants de leucine importants associés à

une résistance à l'insuline et un diabète chez des sujets obèses, due à une dysrégulation du métabolisme des acides aminés (Newgard et al., 2009 ; Wang et al., 2011).

### **Une hormone orexigène : la ghréline**

La ghréline est une hormone sécrétée par le système digestif, notamment par l'estomac et le duodénum (Yoshihara et al., 2002). Elle est responsable de la sensation de faim et de l'initiation de la prise alimentaire. Sa concentration plasmatique augmente juste avant les repas, puis diminue rapidement ensuite (Cummings et al., 2001). La ghréline se lie à son récepteur, le growth hormone secretagogue receptor (GHSR), pour exercer ses effets au niveau des organes cibles périphériques mais est également capable de traverser la BHE pour agir sur les neurones hypothalamiques, notamment au niveau de l'ARC (Horvath et al., 2001). Contrairement à la leptine, elle stimule les neurones à AgRP et inhibe l'activité des neurones à POMC (Cowley et al., 2003). Elle diminue également l'action anorexigène de la leptine (Kamegai et al., 2001). L'administration aiguë ou chronique périphérique de ghréline entraîne une augmentation de la prise alimentaire associée à une augmentation de la masse grasse (Tschop et al., 2000). Les concentrations plasmatiques de ghréline sont d'ailleurs diminuées chez les sujets obèses tandis qu'elles augmentent en cas d'anorexie (Hansen et al., 2002 ; Stock et al., 2005). Cependant, certaines études suggèrent que la ghréline totale ne reflète pas exactement la réalité et qu'il serait préférable de prendre en considération les concentrations de ghréline acylée et ghréline non acylée, produits post-transcriptionnels, qui semblent être régulées différemment après un repas ou au cours de l'exercice physique (Mackelvie et al., 2007 ; Dardzinska et al., 2014).

Ces différents signaux régulant la prise alimentaire reflètent le statut énergétique de l'organisme. Ils vont agir, voire interagir entre eux, au niveau central afin de moduler à long terme la balance énergétique. Dans le cas d'une dérégulation chronique de cette balance énergétique, comme dans le cas d'une obésité, les systèmes de régulation sont affectés, voire même ne plus être fonctionnels, et les conséquences peuvent être dramatiques. Les études actuelles se focalisent sur le rôle physiologique de tels systèmes de détection, comme la voie de signalisation de mTOR, qui vont ensuite moduler la balance énergétique, notamment au niveau hypothalamique dans les neurones à POMC et à AgRP de l'ARC. Ces systèmes de détection pourraient ainsi constituer des cibles de choix pour le traitement de l'obésité.

## La voie de signalisation de mTOR

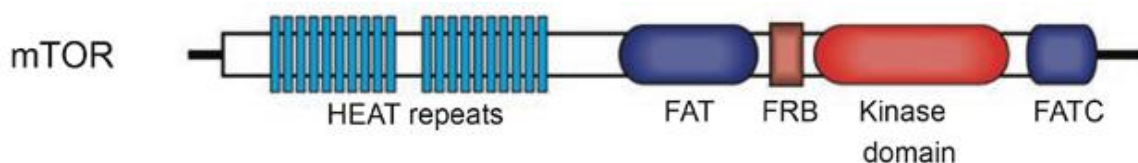
### Vue d'ensemble

Des fonctions cellulaires adaptées et la survie de l'organisme dépendent de la détection précise de la disponibilité des stocks énergétiques et de son couplage avec la croissance cellulaire et l'activité métabolique. Au cours des dix dernières années, mTOR est apparu comme un acteur critique dans la détection d'énergie cellulaire en raison de sa capacité à coupler la disponibilité des nutriments, des facteurs de croissance, des signaux hormonaux et de l'oxygène avec la régulation de la synthèse des protéines et des lipides, la biogenèse lysosomale, l'autophagie et l'activité et la morphologie des neurones (Laplante and Sabatini, 2012; Costa-Mattioli and Monteggia, 2013). Au niveau de l'organisme, mTOR est impliquée dans la régulation de l'équilibre énergétique et le métabolisme, de par son action sur le CNS et les circuits neuronaux contrôlant la prise alimentaire et le poids corporel, ainsi que sur les organes périphériques, où mTOR affecte à la fois le métabolisme du glucose et des lipides. La dérégulation de la voie de mTOR caractérise des maladies telles que l'obésité, le diabète de type 2, le cancer et les maladies neurodégénératives, démontrant l'importance de mTOR sur le maintien de l'homéostasie énergétique.

Dans les années 1970, il a été trouvé dans un échantillon de sol de l'île de Pâques, appelée Rapa Nui par ses habitants, une souche bactérienne, *Streptomyces hygroscopicus*, produisant un métabolite antifongique. Ce métabolite a été purifié et identifié comme étant une lactone macrocyclique, que l'on nommera par la suite rapamycine (RAPA) d'après son lieu de découverte. Il a été démontré, peu de temps après, que la RAPA présentait des effets immunosuppresseurs et était capable de supprimer la prolifération cellulaire (Vignot et al., 2005) ; ce qui a poussé les chercheurs à une enquête plus approfondie sur ses propriétés et sur mTOR, sa protéine cible. C'est dans les années 1990, que mTOR a été pour la première fois identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et dont les mutations lui confèrent une résistance aux effets inhibiteurs de la RAPA sur la croissance cellulaire (Heitman et al., 1991 ; Sabatini et al., 1994).

La protéine mTOR est une enzyme intracellulaire de 289 kDa à activité sérine/thréonine kinase appartenant à la famille protéique phosphatidylinositol 3-kinase (PIK)-related protein kinases (PIKK), elle-même régulée par phosphorylation (Heitman et al., 1991; Sabatini et al., 1994). Cette enzyme possède une structure hautement conservée avec 95% d'homologie de séquence entre la souris, le rat et l'homme (Janus et al., 2005). Par ailleurs, chez la souris, l'inactivation du gène *TOR* au stade embryonnaire est létale (Murakami et al., 2004). mTOR

possède à son extrémité N-terminale vingt motifs répétés non-identiques et riches en leucine huntingtine, facteur d'élongation 3, protéine phosphatase 2A et TOR1 (HEAT), qui forment des paires d'hélices  $\alpha$  antiparallèles, et qui seraient impliqués dans les interactions protéine-protéine (Andrade and Bork, 1995 ; Andrade et al., 2001). Ils sont suivis d'un domaine FK506-binding protein of 12 kDa (FKBP12)-rapamycin-associated protein, ataxia telangiectasia mutated, transformation/transcription domain associated protein (FAT) en position interne. Puis, à l'extrémité C-terminale, se trouve une séquence FKBP12-Rapamycin binding domain (FRB) suivie du domaine catalytique ; la RAPA va former un complexe avec son récepteur intracellulaire FKBP12, et ce complexe, en se fixant spécifiquement à la FRB, va inhiber l'activité kinase de mTOR (Choi et al., 1996; Hay and Sonenberg, 2004). Le domaine catalytique contient différents sites de phosphorylation qui sont les cibles de kinases localisées en amont tels que l'AMPK, qui inhibe mTOR, ou AKT, qui active mTOR, ou en aval telle la protéine ribosomale S6 kinase 1 (S6K1) (Laplante and Sabatini, 2012; Martinez de Morentin et al., 2014). Enfin, la dernière séquence, FAT C-terminal (FATC), est essentielle pour l'activité kinase ; elle fonctionne en tandem avec le domaine FAT et est indispensable à la fonction de mTOR (Dames et al., 2005) (*Figure 3*).

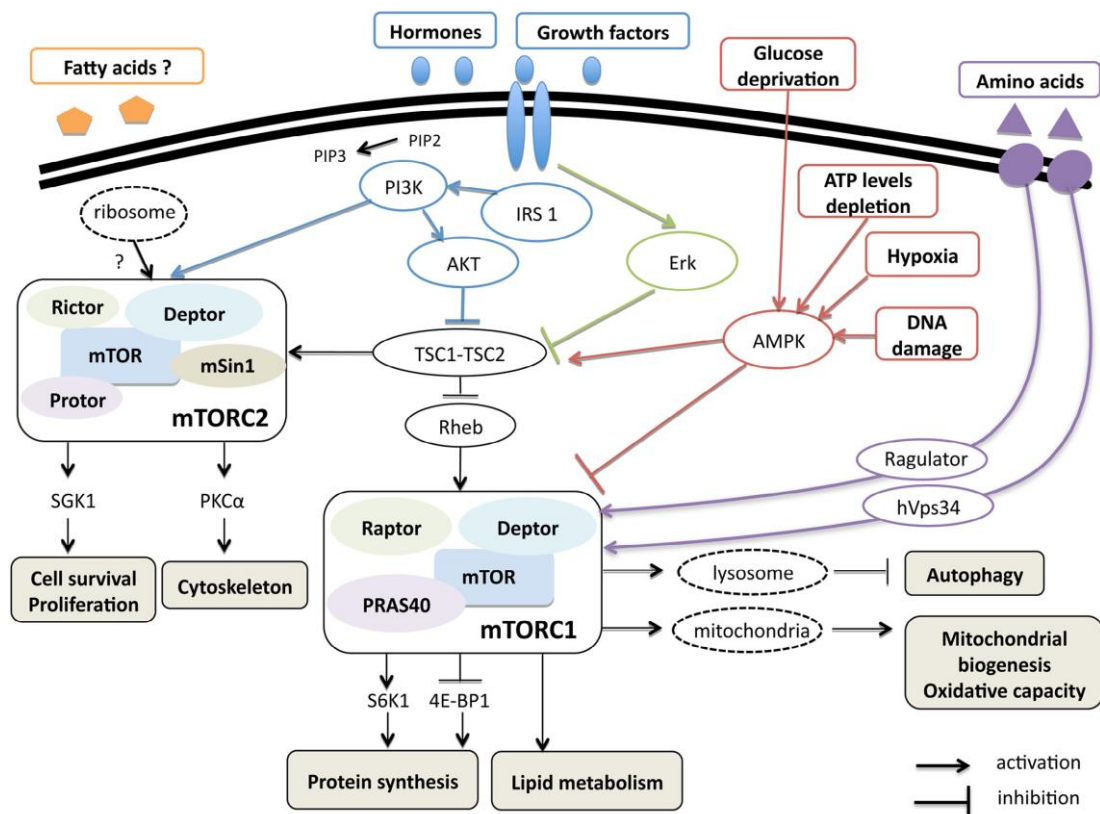


***Figure 3. Représentation schématique des composants de mTORC1 (adaptée de Yang Q and Guan K-L, Cell research, 2007).***

*HEAT : domaine d'interaction protéine-protéine formant deux paires d'hélices  $\alpha$  antiparallèles retrouvé chez l'huntingtine, le facteur d'élongation 3, la protéine phosphatase 2A et TOR1 ; FAT : un domaine partagé par la FKBP12-rapamycin-associated protein, l'ataxia telangiectasia mutated, et la transformation/transcription domain associated protein, qui sont des membres de la famille des PIKK ; FRB : FKBP12/rapamycin binding domain ; FATC : FAT C-terminal.*

Chez les mammifères, la protéine mTOR prend part à la formation de deux complexes protéiques distincts, mTORC1 et mTORC2, qui sont le résultat de l'interaction de protéines spécifiques avec mTOR (*Figure 4*). Ils régulent des fonctions cellulaires distinctes et possèdent une sensibilité différente à la RAPA (Bhaskar and Hay, 2007). En effet, l'interaction de la RAPA avec mTOR se produit généralement lorsque la protéine kinase fait partie intégrante de mTORC1. Toutefois, une exposition prolongée au macrolide peut également inhiber mTORC2 en séquestrant mTOR, en particulier dans certains types cellulaires (Sarbasov et al., 2006). mTORC1 est constitué de mTOR, d'une protéine de régulation associée à mTOR (Raptor), le

mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLST8), le prolin-rich Akt/PKB substrate 40 kDa (PRAS40) et la DEP domain containing mTOR interacting protein (Deptor) (Sancak et al., 2007 ; Peterson et al., 2009). Tandis que mTORC2 comprend mTOR, le compagnon de mTOR insensible à la RAPA (Rictor), de la protéine kinase activée par le stress (mSin1), de Deptor et de protéins observed with Rictor 1 and 2 (Protor-1 and 2) (Laplante and Sabatini, 2012). L'invalidation génétique des différents composants de mTORC1 et mTORC2 ont permis de différencier le rôle de ces deux complexes dans le développement embryonnaire et l'importance fonctionnelle des différents composants de ces complexes.



**Figure 4. Régulation de la voie de mTORC1 (adaptée de Haissaguerre M, Saucisse N, et al, Mol Cell Endocrinol, 2014).**

*mTORC1 est activé par les hormones, les facteurs de croissance et les nutriments. En amont, différentes kinases modulent l'activité de mTORC1 en convergeant sur le complexe TSC1/TSC2. Les hormones et les facteurs de croissance, par le biais de la voie PI3K/Akt ou en recrutant ERK, vont inhiber le complexe TSC1/TSC2 et donc induire l'activation de mTORC1. La déplétion en glucose ou en ATP, ainsi que l'hypoxie et les dommages de l'ADN vont entraîner l'activation de l'AMPK, qui va inhiber mTORC1 via l'activation du complexe TSC1/TSC2 ou en phosphorylant directement Raptor. L'activation de mTORC1 entraîne la phosphorylation de ses protéines effectrices S6K1, S6 et 4E-BP1 et la modulation de plusieurs fonctions cellulaires : la survie et prolifération cellulaire, la synthèse protéique, le métabolisme des lipides, la biosynthèse mitochondriale et la biogenèse des lysosomes et l'autophagie. mTORC2 peut également être active par l'insuline et les facteurs de croissance via la voie PI3K/Akt, et favoriser ainsi l'activation de mTORC1. SGK1 : serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 ; PKCα : protéine kinase C alpha ; hVps34 : PI3K de classe III.*

Ces différents composants sont capables de réguler l'activité du complexe mTOR ou possèdent des sous-unités spécifiques contrôlant des cibles spécifiques. Par exemple, Raptor, une protéine de 150 kDa, n'a pas d'activité enzymatique propre, mais son intégrité est indispensable pour la formation du complexe (Bhaskar and Hay, 2007) et l'activité kinase de mTORC1 (Guertin et al., 2006) mais aussi pour le recrutement des substrats de mTORC1 (Hara et al., 2002). En milieu pauvre en glucose ou acides aminés, Raptor se lie avec une haute affinité à mTOR, maintenant le complexe dans une conformation inactive, tandis qu'en milieu riche en glucose ou leucine, cette interaction est moins forte, permettant ainsi à mTOR de phosphoryler ses cibles (Kim et al., 2002). De même, PRAS40 et Deptor, en se liant à Raptor, régulent négativement la capacité de mTORC1 à phosphoryler ses cibles (Oshiro et al., 2007 ; Peterson et al., 2009). L'activation de mTOR induit la phosphorylation de ces 2 protéines, favorisant leur dissociation et permettant l'activation du complexe (Wang et al., 2007). Quant à mLST8, elle interagit directement avec mTOR pour favoriser, bien que n'étant pas nécessaire, son activité kinase (Guertin et al., 2006). Pour Rictor, sa liaison avec mTORC2 ainsi que son interaction avec mSin1 sont essentielles pour la formation et la stabilité du complexe et la phosphorylation de ses cibles (Sarbasov et al., 2004; Jacinto et al., 2006). Enfin, Deptor fonctionne également comme un régulateur de mTORC2 en inhibant sa capacité à phosphoryler ses cibles (Peterson et al., 2009).

Des deux complexes, mTORC1 est de loin le mieux caractérisé. En répondant rapidement aux niveaux d'énergie intracellulaires, aux nutriments, aux facteurs de croissance et aux hormones, mTORC1 contrôle une multitude de fonctions intracellulaires, allant de la croissance et prolifération cellulaire à l'activité neuronale, en passant par l'expression génique et l'autophagie (Laplanche and Sabatini, 2012 ; 2013). mTORC1 est aussi le complexe le mieux étudié pour son implication dans la régulation de l'équilibre énergétique et du métabolisme. mTORC2 est connu pour réguler la dynamique du cytosquelette (Oh and Jacinto, 2011) et est également impliqué dans le contrôle de la taille et la morphologie des neurones, ainsi que de la plasticité synaptique (Huang et al., 2013 ; Thomanetz et al., 2013) ; des fonctions que l'on pensait jusqu'à très récemment être sous le contrôle exclusif de mTORC1. Enfin, une étude récente fournit également des preuves sur l'implication de mTORC2, et notamment de Rictor, dans la régulation centrale de l'équilibre énergétique (Kocalis et al., 2014).

## **Régulation de la voie de mTORC1**

### **Régulateurs en amont de mTORC1**

mTORC1 intègre les informations provenant de plusieurs voies de signalisation qui sont impliquées à la fois dans des événements physiologiques et pathologiques. Les facteurs de croissance et les hormones, la disponibilité des nutriments ainsi que le statut énergétique intracellulaire, vont, en engageant soit ces voies de signalisation soit mTOR directement, contribuer à l'activation de mTORC1. mTORC1 va, en réponse, induire la croissance et prolifération cellulaire, la synthèse protéique et ainsi promouvoir l'activité neuronale, et dans le même temps, inhiber l'autophagie, un processus d'auto-dégradation qui permet de fournir des substrats énergétiques en cas de déficit énergétique (Zoncu et al., 2011).

La protéine homologue Ras enrichie dans le cerveau (Rheb) est une guanosine triphosphate(GTP)ase en amont de mTORC1, qui, dans des conditions de fixation du GTP, l'active. Elle est régulée par l'activité d'une protéine activant la GTPase (GAP), la tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), qui est stabilisée par la tuberous sclerosis complex 1 (TSC1) (Huang and Manning, 2008). La phosphorylation du complexe TSC1/TSC2 inhibe son activité GAP, entraînant l'activation de Rheb et, ainsi, de mTORC1 (Cheadle et al., 2000).

mTORC1 est une des cibles de la voie de signalisation PI3K/Akt, recrutée notamment par l'insuline et la leptine mais aussi par les facteurs de croissance, tel le facteur de croissance apparenté à l'insuline 1 (IGF-1), ainsi que par l'intermédiaire de la protéine Ras (Laplante and Sabatini, 2012). L'insuline et l'IGF-1 activent leurs récepteurs spécifiques à activité tyrosine kinase, qui phosphorylent et recrutent différents récepteurs envers des substrats (IRS). Ces IRS sont à leur tour phosphorylés et exposent ainsi des sites de fixation pour des partenaires, tels que PI3K, qui va alors convertir le phospholipide membranaire phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP3). PIP3 peut ensuite se lier à Akt, une enzyme à activité sérine/thréonine kinase, qui joue un rôle fondamental dans la survie cellulaire et l'apoptose (Fruman et al., 1998; Chalhoub and Baker, 2009). Akt est alors transloquée du cytoplasme à la membrane cellulaire, et activée à travers la phosphorylation de deux sites régulateurs, les résidus thréonine 308 et la sérine 473. La thréonine 308 est phosphorylée par la phosphatidylinositol 3 dependent kinase 1 (PDK1) (Alessi et al., 1996), tandis que la phosphorylation de la sérine 473 est sous le contrôle de mTORC2 (Sarbasov et al., 2005). Une fois activée, Akt phosphoryle et inhibe TSC2 (Wullschleger et al., 2006). Rheb peut alors activer mTORC1 (Sengupta et al., 2010). Par ailleurs, la phosphatase et homologue de la tensine (PTEN) est un important régulateur négatif de la voie PI3K/Akt, qui, par son



activité phosphatase lipidique contrecarre la fonction kinase de PI3K, et ainsi inhibe l'activation d'Akt et mTORC1 (Song et al., 2012).

Les facteurs de croissance, les hormones et les cytokines peuvent également activer mTORC1 en recrutant la kinase régulée par un signal extracellulaire (ERK), une protéine kinase activée par les agents mitogènes (MAPK), qui peut phosphoryler le complexe TSC1/TSC2 et ainsi activer mTORC1 (Ma et al., 2005). De plus, la voie de signalisation Wnt, qui est très importante pour le développement cellulaire, peut activer la voie mTORC1 en inhibant la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) (Inoki et al., 2006). GSK3, quant à lui, inhibe mTORC1 en activant TSC2 (Inoki et al., 2006).

L'AMPK est activée dans les situations de déplétion énergétique cellulaire, notamment en cas de diminution du taux d'ATP (Kemp et al., 1999), de déplétion en glucose (Viollet et al., 2003), en cas d'hypoxie ou de stress oxydant. L'AMPK est exprimé dans la majorité des tissus et est particulièrement impliqué dans l'homéostasie glucidique (Rutter et al., 2003). L'AMPK est un hétérotrimère composé d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . Son activation mène à la phosphorylation de TSC2, activant sa fonction GTPase, et inhibant ainsi mTORC1 (Inoki et al., 2003 ; Corradetti et al., 2004). L'AMPK supprime également la signalisation de mTORC1 en phosphorylant directement Raptor ou S6K1 (Kimura et al., 2003; Cheng and Russell, 2004 ; Sengupta et al., 2010), tandis qu'à l'inverse, S6K1 régule négativement l'AMPK, un phénomène qui semble important pour l'action hypothalamique de la leptine sur la prise alimentaire (Dagon et al., 2012). En effet, au niveau hypothalamique, l'activation de l'AMPK favorise la prise alimentaire (Minokoshi et al., 2004).

La capacité de l'insuline à activer mTORC1 est altérée par une réduction des niveaux cellulaires d'ATP, due soit à une réduction du glucose ou à l'inhibition de la respiration mitochondriale, suggérant que l'énergie cellulaire influe directement sur l'activité de mTORC1 (Dennis et al., 2001). De plus, les facteurs de stress cellulaires tels que l'hypoxie et les dommages de l'ADN peuvent également inhiber mTORC1. En effet, l'hypoxie induit l'expression du facteur induit par l'hypoxie (HIF1 $\alpha$ ) et de la protéine regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1). Tandis que REDD1 active TSC2, inhibant ainsi mTORC1 (Sofer et al., 2005), HIF1 $\alpha$  ne semble pas être nécessaire dans la médiation de cet effet (Arsham et al., 2003). Enfin, les acides aminés, notamment la leucine et l'arginine, qui sont les éléments constitutifs des protéines mais également des intermédiaires de la synthèse des lipides et de l'ATP, sont nécessaires à l'activation de mTORC1, et leur déplétion ne peut être compensée par aucun autre stimulus activateur de mTORC1 (Hara et al., 1998 ; Bauchart-Thevret et al., 2010 ; Han et al., 2012 ; Jewell and Guan, 2013). Cependant, ce stimulus essentiel

à l'activation de mTORC1 est aussi celui dont les mécanismes de transduction sont les moins bien connus (Jewell and Guan, 2013).

### **Effecteurs de mTORC1**

Sachant que mTORC1 est l'un des 'senseurs' d'énergie clés, tant au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme, il est peu surprenant que sa voie de signalisation soit impliquée dans plusieurs processus cellulaires essentiels, allant de la croissance et prolifération cellulaire, au contrôle de la synthèse protéique et lipidique, en passant par l'activité neuronale et l'autophagie.

La synthèse et traduction des protéines sont indispensables pour la croissance cellulaire et font partie des fonctions cellulaires les plus étudiées régulées par mTORC1. mTORC1 phosphoryle S6K1 et la protéine se liant au facteur d'initiation eucaryote 4E (4E-BP1), qui induisent respectivement la biogenèse de mRNA et la traduction cap-dépendante (Laplante and Sabatini, 2012 ; Martinez de Morentin et al., 2014). S6K1 est une protéine à activité sérine/thréonine kinase de 70 kDa localisée dans le cytoplasme (Peterson et al., 1999). Une fois activée, S6K1 phosphoryle la protéine ribosomale S6, appartenant à la sous-unité ribosomale 40S (Averous and Proud, 2006). L'activation de S6 par S6K1 entraîne l'initiation et l'élongation de la transcription des mRNAs mais également des RNAs ribosomaux et des RNAs de transfert, ainsi que la croissance et prolifération cellulaire (Laplante and Sabatini, 2012). L'AMPK, inhibant mTORC1, peut également induire une diminution de la phosphorylation de S6K1 (Kimura et al., 2003). En cas d'activation chronique de la voie mTORC1, S6K1 peut exercer un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation PI3K/Akt, recrutée par l'insuline, pouvant mener à une désensibilisation et résistance à l'insuline (Um et al., 2004). 4E-BP1, quant à elle, est une protéine régulant négativement la traduction (Poulin et al., 1998). Elle forme un complexe avec le facteur d'initiation eucaryote 4E (eIF4E) empêchant l'initiation de la traduction des mRNAs. La phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 entraîne la dissociation du complexe, libérant ainsi eIF4E et permettant donc l'initiation de la traduction (Gross et al., 2003). L'état de phosphorylation de S6K1, S6 et 4E-BP1 est souvent utilisé comme un marqueur de l'activité de mTORC1 dans les cellules et les tissus.

En plus de contrôler la synthèse des protéines, mTORC1 régule positivement des composants impliqués dans la biosynthèse des ribosomes et la production d'ATP mitochondrial. En effet, mTORC1 augmente le flux glycolytique en activant la transcription et la traduction de HIF1 $\alpha$  (Duvel et al., 2010). Alors que d'autres études ont montré que mTORC1 augmente la teneur en ADN mitochondrial et le métabolisme oxydatif en activant le coactivateur 1 $\alpha$  du récepteur  $\gamma$  activé par les proliférateurs de peroxysomes (PGC1 $\alpha$ ), permettant ainsi son

interaction avec le facteur de transcription yin-yang 1 (YY1) (Cunningham et al., 2007). mTORC1 peut également augmenter la respiration oxydative en phosphorylant STAT3, conduisant à sa translocation dans les mitochondries (Wegrzyn et al., 2009). Afin de stimuler la croissance cellulaire, mTORC1 régule la synthèse des lipides nécessaires à la génération des membranes cellulaires, en recrutant notamment les protéines de liaison régulées par les stéroïdes (SREBP-1) (Porstmann et al., 2008; Duvel et al., 2010). De plus, l'activité de mTORC1 favorise l'accumulation de lipides, l'adipogenèse et la différenciation des adipocytes en augmentant l'expression et l'activité des récepteurs  $\gamma$  activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR $\gamma$ ).

Enfin, en conditions riches en nutriments, mTORC1 favorise les processus anaboliques cellulaires en inhibant l'autophagie, un processus nécessaire au recyclage des organites et protéines intracellulaires endommagés, et pour l'adaptation de la cellule à un environnement déprivé en nutriments (Laplante and Sabatini, 2013). En particulier, mTORC1 phosphoryle la kinase pro-autophagique de type unc-51 (ULK1), inhibant son interaction avec l'AMPK et la formation d'un autophagosome, empêchant ainsi l'autophagie (Kim et al., 2011a). mTORC1 nécessite également la présence d'une protéine adaptatrice impliquée dans la reconnaissance des substrats spécifiques et leur recrutement vers l'autophagosome : la protéine s'associant à l'ubiquitine p62 ou séquestrome 1 (p62/SQSTM1), assurant la relocalisation de mTORC1 à la membrane lysosomale (Sancak et al., 2008 ; Duran et al., 2011 ; Johansen and Lamark, 2011).

### **Le rôle de mTORC1 dans la régulation de la balance énergétique**

mTORC1 est impliqué dans le métabolisme périphérique et central des nutriments et dans la régulation hypothalamique de la balance énergétique. mTORC1 régule cette homéostasie énergétique en modulant l'activité de certaines populations neuronales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel, ainsi qu'en définissant le stockage et l'utilisation des substrats énergétiques au niveau des tissus périphériques.

En accord avec son rôle de détecteur d'énergie cellulaire activé en conditions riches en nutriments, mTORC1 a démontré être impliqué dans l'absorption du glucose et son métabolisme (Patel et al., 2001 ; Buller et al., 2008), ainsi que pouvoir réguler positivement l'adipogenèse et la lipogenèse, tout en inhibant la lipolyse (Laplante and Sabatini, 2009). L'exposition de 2-deoxy-D-glucose, un analogue non-métabolisable du glucose, à des cellules musculaires, inhibe l'activité de mTORC1 (Dennis et al., 2001), tandis que la RAPA inhibe la glycolyse et favorise l'oxydation des acides gras (Sipula et al., 2006). L'obésité induite par l'alimentation (DIO) est associée à l'activation chronique de la voie de mTORC1 au niveau du foie et des muscles (Khamzina et al., 2005 ; Laplante and Sabatini, 2012). Cette sur-activation

de mTORC1 participe à la résistance à l'insuline (Um et al., 2004; Khamzina et al., 2005), qui pourrait donc représenter un mécanisme d'adaptation physiologique initialement destiné à réduire le métabolisme du glucose et le stress oxydatif induits par la DIO (Erol, 2007). Le glucose nécessite une voie de signalisation de mTORC1 fonctionnelle afin de réguler positivement la croissance et la prolifération des cellules  $\beta$  et la synthèse d'insuline (Pende et al., 2000 ; Ruvinsky et al., 2005; Deldicque et al., 2010). Tandis que la RAPA inhibe la prolifération des cellules  $\beta$ , voire même induit leur apoptose (Fraenkel et al., 2008 ; Zahr et al., 2008; Chang et al., 2009), et que le développement d'une intolérance au glucose et du diabète sont des effets secondaires courants de la RAPA ou ses dérivés quand ils sont utilisés pour le traitement contre le cancer ou comme immunosuppresseur pour la transplantation d'organes solides (Soefje et al., 2011; Kaplan et al., 2014).

Des études pharmacologiques et génétiques ont montré que la différenciation, notamment l'étape d'initiation, des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes matures requiert mTORC1 ; un mécanisme inhibé par la RAPA (Lamming and Sabatini, 2013). Ces études ont également montré l'importance de mTORC1, et de ses cibles S6K1 et 4E-BP1, dans le contrôle de l'adipogenèse. La délétion de S6K1 perturbe la génération d'adipocytes (Um et al., 2004; Carnevalli et al., 2010), tandis que la délétion de 4E-BP1 l'augmente (Le Bacquer et al., 2007). Il est également intéressant de noter que l'adipogenèse induite par l'insuline dépend de mTORC1, et qu'une augmentation de l'activité de mTORC1 favorise la production de leptine par les adipocytes (Roh et al., 2003). mTORC1 est également un régulateur critique de la synthèse des lipides, un mécanisme essentiel pour le renouvellement des membranes cellulaires (Laplante and Sabatini, 2009). L'administration d'insuline ou l'activation constitutive d'Akt entraîne le recrutement dans le noyau de SREBP-1, un facteur de transcription ainsi que des régulateurs principaux des gènes de la lipogenèse, tels que l'ACC et la FAS, de manière dépendante ou indépendamment de S6K1 (Duvel et al., 2010). La délétion du gène *Rptor* ou du gène *Tsc1* au niveau du foie entraînent une diminution de l'activité de SREBP-1 et de la lipogenèse (Wan et al., 2011 ; Yecies et al., 2011), suggérant que la diminution de l'activité ainsi que la sur-activation de mTORC1 perturbent, toutes deux, la synthèse des lipides. En particulier, l'inhibition de mTORC1 est connue pour augmenter la transcription de la triglycéride lipase (ATGL) dans les adipocytes, qui à son tour stimule la lipolyse (Chakrabarti et al., 2010). A l'inverse, l'activation de mTORC1 est en corrélation avec une diminution de la lipase hormono-sensible (HSL) et avec une réduction de la libération des acides gras libres (Soliman et al., 2010). Enfin, des études récentes ont montré que mTORC1 supprime l'oxydation des acides gras et la cétogenèse (Laplante and Sabatini, 2012). Le rôle important

joué par mTORC1 dans la régulation du métabolisme des lipides pourrait également expliquer la dyslipidémie induite par la RAPA, un autre effet secondaire important souvent observé chez les patients traités avec ce médicament.

En dehors de son rôle au niveau des tissus périphériques, mTORC1 est sans doute l'une des voies de signalisation intracellulaires régulée par les nutriments et les hormones au niveau du CNS, et plus particulièrement au niveau de l'hypothalamus. L'activation de la voie de mTORC1 peut être observée dans la grande majorité (plus de 90%) des neurones à AgRP et dans une partie (environ 40%) des neurones à POMC de l'ARC chez le rat nourri *ad libitum* (Cota et al., 2006 ; Inhoff et al., 2010).

La leptine et l'insuline agissent toutes les deux sur ces mêmes neurones, où elles nécessitent une voie de signalisation PI3K/Akt intacte pour exercer leurs actions sur la prise alimentaire et le métabolisme (Belgardt et al., 2009). Sachant que mTORC1 est une cible de la voie PI3K/Akt, la relation entre la leptine et mTORC1 a commencé à être étudiée au niveau hypothalamique. L'administration centrale de leptine entraîne une augmentation de la phosphorylation des cibles de mTORC1, S6K1 et S6 dans l'hypothalamus médiobasal, alors que l'administration de RAPA réduisait l'effet anorexigène de la leptine, en empêchant l'activation de mTORC1 (Cota et al., 2006 ; Ropelle et al., 2008 ; Blouet et al., 2009). En outre, les souris S6K1<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'effet anorexigène de la leptine, suggérant que S6K1 pourrait être spécifiquement requis pour l'action de l'hormone sur la balance énergétique (Cota et al., 2008). En effet, l'activation de S6K1 au niveau de l'hypothalamus médiobasal, par injection d'un adénovirus, favorise l'effet anorexigène et la perte de poids corporel induits par la leptine, en inhibant l'expression des mRNAs de l'AgRP et du NPY et en activant la thermogenèse au niveau du BAT (Blouet et al., 2008). D'autre part, la leptine inhibe l'activité de l'AMPK dans la même région hypothalamique (Minokoshi et al., 2004 ; Dagon et al., 2012), tandis que l'activation constitutive de l'AMPK bloque les effets de la leptine (Minokoshi et al., 2004). L'inhibition de l'AMPK hypothalamique est donc nécessaire à l'effet anorexigène, la perte de poids corporel ainsi que la diminution de l'expression des neuropeptides orexigènes hypothalamiques induits par la leptine, et dépend de S6K1 qui est capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'AMPK (Minokoshi et al., 2004; Dagon et al., 2012) ; une observation également décrite au niveau des tissus périphériques, tels que le muscle (Aguilar et al., 2007). Il est également important de noter que l'exercice physique semble capable de potentialiser l'activation de mTORC1 et l'inhibition de l'AMPK induites par la leptine (Ropelle et al., 2008), suggérant que la modulation réciproque de l'activité de ces voies de signalisation au niveau hypothalamique

serait importante dans les effets bénéfiques de l'exercice physique sur le métabolisme et la perte de poids corporel.

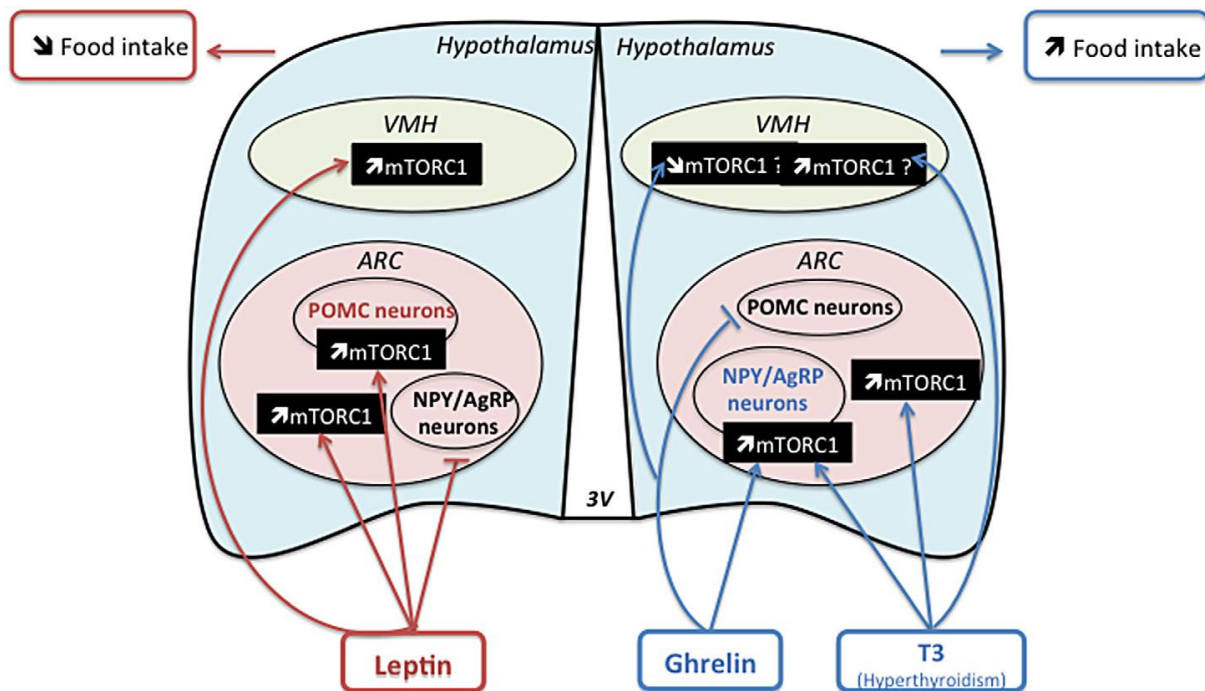
D'autre part, l'activation constitutive de S6K1 au niveau de l'hypothalamus médiobasal semble améliorer la sensibilité à la leptine et protéger contre la DIO induite par un régime riche en graisses (HFD) (Blouet et al., 2008), mais semble en même temps favoriser la résistance à l'insuline au niveau hépatique (Ono et al., 2008). Il est donc probable que les voies de signalisation contrôlant la prise alimentaire et l'homéostasie du glucose de l'hypothalamus médiobasal impliquent S6K1 de manière différentielle. Il est intéressant de noter qu'une exposition à un régime HFD, même brève (24h), entraîne une diminution de la phosphorylation basale de S6K1 au niveau de l'hypothalamus et bloque l'effet anorexigène ainsi que l'augmentation de l'activation de mTORC1 au niveau hypothalamique induits par l'administration centrale de leptine (Cota et al., 2008). Dans le cas d'une DIO, la leptine n'est plus capable d'inhiber l'activité de l'AMPK dans l'ARC, le PVN et le VMN (Martin et al., 2006). En réalité, la diminution de l'activité de mTORC1 pourrait représenter une des causes nécessaires au développement de la résistance à la leptine au niveau hypothalamique décrite dans la DIO, puisque la surexpression du suppresseur de la signalisation des cytokines 3 (SOCS3), un régulateur négatif de la signalisation de la leptine, dans les neurones à POMC entraîne une altération de la phosphorylation de STAT3 et S6 induites par la leptine dans cette population neuronale, menant au développement d'une résistance à la leptine, une obésité et une intolérance au glucose (Reed et al., 2010).

L'insuline, quant à elle, active également la voie PI3K/Akt, notamment au niveau de l'ARC, afin d'exercer ses effets centraux sur la balance énergétique, en favorisant la diminution de la prise alimentaire et du poids corporel et en modulant la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques (Belgardt et al., 2009). L'administration centrale d'insuline augmente la phosphorylation de S6 au niveau de l'ARC et du VMN, indépendamment de l'activité neuronale (Villanueva et al., 2009). De plus, l'insuline, comme la leptine, est capable d'inhiber l'activité de l'AMPK au niveau de ces mêmes noyaux hypothalamiques (Minokoshi et al., 2004). Enfin, il avait été démontré que S6K1 au niveau hypothalamique était impliquée dans le développement de la résistance hépatique à l'insuline (Ono et al., 2008) et que l'insuline au niveau hypothalamique avait un effet anorexigène (Menendez and Atrens, 1991 ; McGowan et al., 1992). Il a depuis été montré que l'administration centrale d'insuline active mTORC1 dans l'ARC, tandis que l'inhibition de mTORC1 bloque la réduction de la prise alimentaire et de poids corporel induites par l'administration centrale d'insuline, un effet semblant être médié par la voie PI3K/Akt (Muta et al., 2015). Ceci démontre l'importance de la voie de mTORC1

dans la modulation de l'action de l'insuline au niveau hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique.

A la différence de la leptine et l'insuline qui ont une action anorexigène lorsqu'elles agissent au niveau hypothalamique, la ghréline, dont les niveaux circulants sont élevés lors d'un jeûne, augmente très fortement la prise alimentaire et l'adiposité (Tschop et al., 2000). L'effet central de la ghréline sur la prise alimentaire est médiée par le GHSR dans l'ARC et le VMN, puisque sa délétion entraîne l'absence d'effet orexigène de la ghréline (Sun et al., 2004 ; Zigman et al., 2006). La ghréline induit la phosphorylation de S6 dans les neurones à AgRP, un phénomène associé à l'activation de ces neurones et à l'augmentation de la prise alimentaire (Villanueva et al., 2009). De plus, l'administration centrale de ghréline entraîne une augmentation de l'activité de mTORC1 dans l'ARC et l'administration centrale de RAPA bloque l'effet orexigène ainsi que l'augmentation de l'expression des mRNAs de l'AgRP, du NPY et de FoxO1 induite par la ghréline (Martins et al., 2012). Ainsi, la ghréline nécessite l'activité de mTORC1 pour induire l'expression de ces neuropeptides orexigènes, probablement via la modulation du facteur de transcription FoxO1 (Martins et al., 2012). Par ailleurs, l'administration chronique périphérique de ghréline augmente le poids corporel et l'adiposité chez les souris de type sauvage mais pas chez les souris  $S6K1^{-/-}$  (Stevanovic et al., 2013). Ces récentes découvertes reliant l'effet orexigène de la ghréline avec une activité accrue de mTORC1 peut sembler en contradiction avec les données illustrant le lien entre l'action anorexigène de la leptine et mTORC1 et la fonction globale de S6K1 au niveau hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique (Blouet et al., 2008). Au lieu de cela, ils impliquent simplement que la régulation de mTORC1 dans l'hypothalamus médiobasal varie selon le type cellulaire et le stimulus, plutôt que de répondre d'une manière uniforme (Villanueva et al., 2009). La ghréline stimule également l'activité de l'AMPK hypothalamique, en particulier dans le VMN (Andersson et al., 2004 ; Kola et al., 2005), conduisant à une diminution de la biosynthèse des acides gras en inhibant la FAS et à l'augmentation de l'oxydation des acides gras (Lopez et al., 2008). Le rôle de mTORC1 dans le VMN n'est pas connu, mais, en tenant compte de la modulation réciproque entre l'AMPK et mTORC1, les inhibiteurs de la FAS diminuent la prise alimentaire en augmentant l'activité de mTORC1 au niveau hypothalamique (Proulx et al., 2008), et que le jeûne et une déficience en leptine inhibent la phosphorylation de S6 dans le VMN (Villanueva et al., 2009), il est supposé que la ghréline inhiberait plutôt l'activité de mTORC1 dans le VMN, plutôt que de l'induire dans l'ARC. Ainsi, la réponse de

la voie à un même stimulus peut varier en fonction de la région hypothalamique, et par conséquent, en fonction des différentes populations neuronales ciblées (*Figure 5*).



**Figure 5. Représentation schématique de la relation entre l'activité de mTORC1 au niveau hypothalamique et des hormones participant à la régulation de la balance énergétique (adaptée de Haissaguerre M, Saucisse N, et al, Mol Cell Endocrinol, 2014).**

L'effet anorexigène de la leptine dépend d'une augmentation de l'activité de mTORC1 au niveau de l'ARC et du VMH. La leptine active les neurones à POMC et inhibe les neurones à NPY/AgRP. A l'inverse, la ghréline et T3 engagent les neurones à NPY/AgRP et nécessitent une augmentation de l'activité mTORC1 dans l'ARC pour exercer leur effet orexigène. T3 : triiodothyronine.

Enfin, l'activité de mTORC1 hypothalamique est impliquée dans la détermination des effets anorexigènes induits par l'alimentation et notamment par les des nutriments (Minokoshi et al., 2004 ; Cota et al., 2006 ; Ropelle et al., 2008; Blouet et al., 2009). Lors d'un jeûne, où la disponibilité des sources énergétiques est faible et est associée à une diminution de la libération de leptine et d'insuline et à une augmentation de libération de ghréline, les niveaux de phosphorylation de mTORC1, S6K1 et S6 diminuent au niveau hypothalamique, tandis que l'AMPK est au contraire activée. A l'inverse, lors d'un paradigme de « refeeding », où la disponibilité en nutriments et la libération de leptine et d'insuline sont augmentées, mTORC1 est activé alors que l'activité de l'AMPK est inhibée au niveau hypothalamique (Minokoshi et al., 2004 ; Cota et al., 2006 ; Blouet et al., 2008 ; Dagon et al., 2012). L'administration centrale de RAPA entraîne au contraire une augmentation de la prise alimentaire chez des rats nourris *ad libitum* (Cota et al., 2006). Ainsi, l'état d'activation de la voie mTORC1 hypothalamique



dépend du statut énergétique de l'organisme et notamment de la disponibilité des nutriments. En effet, l'administration centrale de leucine, un des neuf acides aminés essentiels, entraîne une diminution de la prise alimentaire associée à l'augmentation de la phosphorylation de S6K1 et S6 et l'inhibition de l'AMPK au niveau de l'hypothalamus médiobasal (Blouet et al., 2008). Elle diminue également l'expression du mRNA du NPY (Cota et al., 2006) et augmente l'expression du mRNA de POMC, et entraîne l'activation des neurones à POMC (Ropelle et al., 2008), ce qui occasionne une diminution de la taille et du nombre des repas, en recrutant notamment, les neurones parvocellulaires et les neurones du tractus solitaire (Blouet et al., 2009). L'administration centrale de RAPA prévient l'effet anorexigène de la leucine (Cota et al., 2006).

Récemment, des études ont montré que l'âge impliquait une sur-activation de mTORC1 au niveau des neurones à POMC (Yang et al., 2012). Cette sur-activation inhiberait l'activité électrique des neurones à POMC, entraînant une augmentation de la taille du corps cellulaire, une diminution des projections axonales vers le PVN et une hyperphagie menant à une obésité (Mori et al., 2009; Yang et al., 2012). L'administration de RAPA chez ces souris âgées entraîne une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel et restaure l'excitabilité des neurones à POMC (Yang et al., 2012).

Dans l'ensemble, la voie de mTORC1 constitue une des voies intracellulaires clés dans la régulation de l'activité des neurones régulant la prise alimentaire. Les effets de l'activation de mTORC1 au niveau hypothalamique varient selon le signal périphérique (leptine, insuline ou ghréline), selon le statut nutritionnel (jeûne ou satiété ; alimentation standard ou HFD), mais aussi selon la nature des neurones (POMC ou AgRP), la localisation (ARC, PVN ou VMN), selon l'âge ainsi que selon la durée et l'intensité de l'activation (aiguë ou chronique). Cependant, les mécanismes moléculaires recrutés par mTORC1 et impliqués dans la régulation de la balance énergétique ne sont pas encore parfaitement connus, notamment au niveau des neurones à POMC.

## **L'autophagie**

La déplétion nutritionnelle, le stress, l'hypoxie ou la réduction de la disponibilité des facteurs de croissance signalent aux cellules eucaryotes d'ajuster leur métabolisme pour leur survie et celle de l'organisme. Une réponse précoce de ces ajustements métaboliques implique l'inhibition de la croissance cellulaire et l'induction de l'autophagie afin d'optimiser l'utilisation des ressources énergétiques limitées. L'autophagie, un terme dérivé du grec pouvant se traduire par auto-digestion cellulaire, est un processus catabolique qui cible les constituants cellulaires,

tels que les organites et protéines endommagés ainsi que certains agents pathogènes intracellulaires, afin d'entraîner leur dégradation par les lysosomes et ainsi maintenir l'homéostasie cellulaire (Codogno and Meijer, 2005; Yorimitsu and Klionsky, 2005). Elle constitue une voie intracellulaire unique de régulation de la qualité et la quantité de la biomasse, sans restriction de taille ou de complexité pour ses cibles et jouerait donc un rôle important en contribuant à la survie de l'organisme lors de conditions défavorables à la croissance cellulaire.

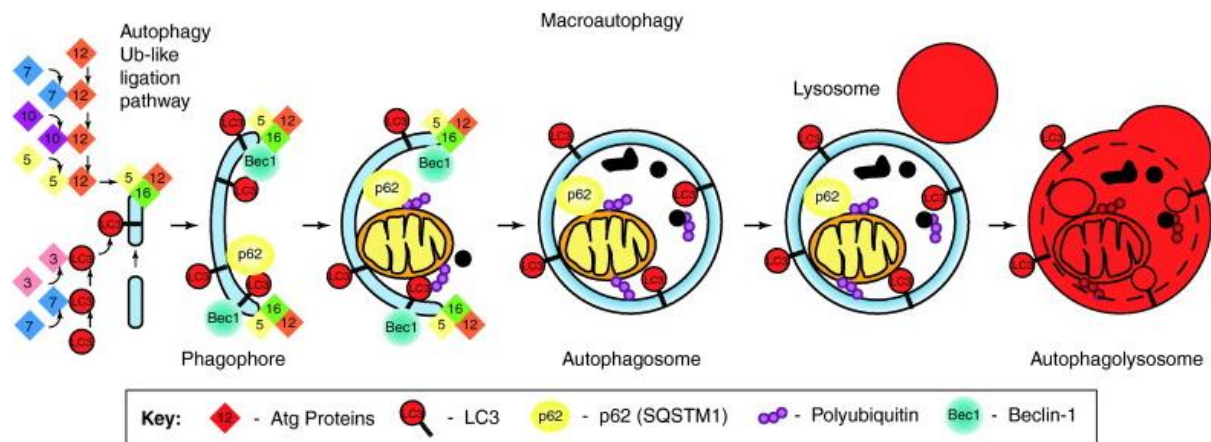
Elle est souvent désignée sous le nom de macroautophagie si l'on considère également la microautophagie, qui implique l'adressage des constituants cellulaires directement dans le lysosome par invagination de la membrane lysosomale, et l'autophagie assistée par des chaperons protéiques, qui sont des processus supplémentaires délivrant les protéines et les organites cytosoliques aux lysosomes afin d'y être dégradés. Il s'agit cependant du mécanisme autophagique majoritaire et également le plus étudié. L'autophagie est, par ailleurs, un processus extrêmement bien conservé au cours de l'évolution (Hughes and Rusten, 2007 ; Kourtis and Tavernarakis, 2009). En effet, on retrouve des acteurs protéiques spécifiques, un déroulement et un mécanisme moléculaire séquentiels et similaires chez la plupart des espèces. C'est également une voie existant dans toutes les cellules possédant un système lysosomal fonctionnel, bien que les niveaux d'autophagie basale ne soient pas équivalents d'un type cellulaire à l'autre (Kuma and Mizushima, 2008). L'autophagie serait cruciale pour le développement, la différenciation, la survie et l'homéostasie et protégerait du vieillissement et d'un certain nombre de pathologies telles que le cancer, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et les infections (Levine, 2007 ; Cuervo, 2008 ; Intemann et al., 2009 ; Vergne et al., 2009 ; Lee et al., 2010a). Cependant, il existe un certain nombre de preuves qui démontrent que l'autophagie peut également être le point de départ de la mort cellulaire par apoptose, par nécrose, voire par autophagie elle-même (Liu and Levine, 2015). Enfin, des études ont rapporté de nouvelles fonctions de l'autophagie dans la régulation de processus cellulaires tels que le métabolisme des lipides et la sensibilité à l'insuline (Meijer and Codogno, 2008 ; Singh et al., 2009a). L'autophagie, que ce soit à l'état basal ou lorsqu'elle est induite, est une voie intracellulaire cruciale dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et physiologique de l'organisme, en permettant notamment la clairance d'organites et de protéines endommagés ciblés par des protéines adaptatrices telles que p62/SQSTM1 et pouvant être toxiques pour l'organisme. Des études récentes ont rapporté des liens importants entre son rôle et sa régulation dans les complications associées à l'obésité (Lavallard et al., 2012).

## Déroulement du flux autophagique

L'autophagie implique la formation d'un petit sac vésiculaire en forme de croissant appelé membrane d'isolement ou phagophore (Gordon and Seglen, 1988). Le phagophore entoure une partie du cytosol conduisant à la formation d'une structure à double membrane appelé un autophagosome, pouvant atteindre jusqu'à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Mizushima et al., 2002). L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome conduisant à la dégradation des constituants cellulaires séquestrés par des protéines adaptatrices, telles que p62/SQSTM1, dans l'autophagolysosome nouvellement formé. Les acides aminés et les autres composés produits par la dégradation autophagique de macromolécules sont libérés dans le cytoplasme afin d'être recyclés ou pour la production d'énergie (Yorimitsu and Klionsky, 2005). L'origine des membranes impliquées dans la formation des autophagosomes n'est pas encore connue, bien que des études récentes suggèrent que les lipides servant à la formation des autophagosomes pourraient être dérivés du réticulum endoplasmique (ER), de l'appareil de Golgi, de la membrane plasmique ainsi que des mitochondries (Axe et al., 2008 ; Hayashi-Nishino et al., 2009 ; Yla-Anttila et al., 2009 ; Mari et al., 2011). La formation du phagophore et des autophagosomes requiert un ensemble de dix-huit protéines liées à l'autophagie (Atg), initialement identifiées chez la levure et relativement conservées au cours de l'évolution (Nakatogawa et al., 2009).

Le processus de formation de l'autophagosome comporte trois grandes étapes : l'initiation/nucléation, l'élongation et la maturation (**Figure 6**). Lors de la phase d'initiation/nucléation, le complexe ULK1-Atg13-focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa (FIP200)-Atg101 (Chan et al., 2009) active le complexe Beclin-1-PI3K, composé de Beclin-1, de la protéine de tri vacuolaire 34 (Vps34), qui est une PI3K, Vps15, Atg14L et l'activating molecule in Beclin-1 regulating autophagy (Ambra-1) (He and Levine, 2010), afin d'induire la formation de compartiments membranaires enrichis en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P), les phagophores (Simonsen and Tooze, 2009). Afin de contrôler l'autophagie en réponse à des facteurs de croissance et des signaux nutritionnels, le complexe ULK1-Atg13-FIP200-Atg101 est couplé à mTORC1, lui-même associé à p62/SQSTM1, inhibant ainsi l'autophagie (Chan, 2009 ; Duran et al., 2011). A l'inverse, à la réception de signaux de déplétion nutritionnelle, mTORC1 se dissocie de p62/SQSTM1 (Duran et al., 2011) et du complexe ULK1-Atg13-FIP200-Atg101, qui semble alors se transloquer aux membranes pré-autophagosomales, notamment de l'ER (Itakura and Mizushima, 2010). Là, le complexe ULK1-Atg13-FIP200-Atg101 va, en coopération avec le complexe Beclin-1-PI3K, entraîner la génération de PI(3)P et le recrutement ses protéines effectrices, telles que la protéine

contenant un double domaine FYVE (DFCP1) et les protéines contenant un motif WD40 interagissant avec les phosphoinositides (WIPI-1 et WIPI-2), conduisant à la formation d'autophagosomes naissants (Axe et al., 2008).



**Figure 6. Représentation schématique du déroulement du flux autophagique (adaptée de Gump JM and Thorburn A, Trends in Cell Biology, 2012).**

Le processus autophagique dégrade des constituants cellulaires endommagés (organites, protéines, etc.) ciblés par des protéines adaptatrices, dont p62/SQSTM1, entraînant la libération de métabolites afin de fournir l'énergie nécessaire à la cellule pour sa réparation ou sa survie lors de dommages cellulaires ou d'une déprivation en nutriments. Le flux autophagique consiste en la formation d'un phagophore, initié par les complexes ULK1-Atg13-FIP200-Atg101 et Beclin1-PI3K (initiation/nucléation). S'ensuit la conjugaison d'Atg12 à Atg5 et la lipidation de LC3, qui vont alors se lier à la membrane de l'autophagosome (élongation). Les protéines vont alors se dissocier avant la fermeture de ce dernier. L'autophagosome ainsi formé va alors fusionner avec le lysosome pour former l'autophagolysosome, entraînant la dégradation de son contenu (maturation).

L'élongation de l'autophagosome repose sur deux systèmes de conjugaison, similaires à l'ubiquitinylation des protéines (Ohsumi, 2001). Le premier système consiste en la conjugaison d'Atg12 à Atg5 médiée par deux ligases, Atg7 et Atg10. Le complexe Atg12-Atg5 ainsi formé s'associe à Atg16L pour former un complexe tétramérique Atg12-Atg5-Atg16L, qui va alors être recruté à la membrane autophagosomale. Ce complexe se dissociera et sera recyclé vers le cytosol avant la fermeture complète de l'autophagosome (Geng and Klionsky, 2008). Le second système implique le clivage de la protéine associée aux microtubules 1A/1B, chaîne légère 3 (LC3) par Atg4 conduisant à la forme soluble LC3-I, qui est ensuite conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE) par Atg7 et Atg3 (Ichimura et al., 2000). Cette conjugaison lipidique forme la protéine LC3-II, qui va alors s'associer aux membranes pré-autophagosomales permettant la fermeture de l'autophagosome (Ohsumi, 2001). Cette liaison à la membrane n'a cependant lieu qu'en présence d'un complexe Atg12-Atg5-Atg16L fonctionnel (Mizushima et al., 2001). Une fois l'autophagosome formé, toutes les protéines Atg

se dissocient de la membrane, à l'exception de LC3-II qui reste ancrée à cette membrane. LC3-II constitue donc un marqueur des autophagosomes (Kabeya et al., 2000). LC3-II est également capable d'interagir avec des protéines adaptatrices, telles que p62/SQSTM1, afin de cibler spécifiquement les constituants cellulaires endommagés à dégrader lors du processus autophagique (Johansen and Lamark, 2011).

Pendant l'étape de maturation, l'autophagosome fusionne avec l'endosome pour former l'amphisome avant de fusionner avec un lysosome, ou peut directement fusionner avec le lysosome pour former un autophagolysosome (Gordon and Seglen, 1988 ; Gordon et al., 1992). Plusieurs protéines sont impliquées dans ces processus de fusion vésiculaire, telles que des ATPases associées à diverses activités cellulaires (AAA ATPases), des GTPases de la famille Rab, les récepteurs membranaires de la protéine d'attachement au facteur soluble sensible au N-éthylmaléimide (SNARE), les complexes de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT), les présénilines, les protéines de membranes associées au lysosome (LAMP) et la FYVE and coiled to coil domain containing protein (FYCO1) (Nixon, 2013). Cette étape de fusion avec le lysosome est obligatoire afin d'acquérir le matériel nécessaire à la dégradation de son contenu, telles que des pompes à protons vacuolaires dépendantes de l'ATP permettant l'acidification de sa lumière et des hydrolases acides (Tanaka et al., 2000). Le LC3-II localisé sur la membrane externe sera alors recyclé en LC3-I par Atg4, tandis que LC3-II localisé sur la membrane interne sera dégradé, avec les autres composants de la membrane interne ainsi que le matériel séquestré dans les autophagolysosomes par les hydrolases acides (Kabeya et al., 2000 ; Yoshimori, 2002). Enfin, les métabolites ainsi générés seront relargués vers le cytosol par l'intermédiaire de perméases et réutilisés par la cellule pour la synthèse de nouveaux constituants cellulaires ou pour la production d'énergie (Yang and Klionsky, 2007). Le blocage de la maturation des autophagosomes ou de leur fusion avec le lysosome, ainsi qu'un mauvais fonctionnement des lysosomes, pourraient conduire à l'interruption du flux autophagique et avoir des conséquences délétères pour la cellule (Yang and Klionsky, 2007). Par ailleurs, le processus autophagique est relativement rapide. En effet, la séquestration d'une mitochondrie est un événement qui se produit en sept minutes (Rodriguez-Enriquez et al., 2006).

### **Régulation de l'autophagie**

Les voies de signalisation conduisant au déclenchement de l'autophagie sont nombreuses et souvent interconnectées. Elles ont la plupart du temps un lien direct ou indirect avec la disponibilité des nutriments et d'énergie disponibles. Près de vingt ans après la découverte de l'autophagie au milieu des années 1950, il a été observé que la déplétion en acides aminés est

un puissant activateur de l'autophagie au sein des cellules (Mortimore and Schworer, 1977). Comme mentionné précédemment, les acides aminés sont des régulateurs clés de l'activation de mTORC1. De plus, la plupart voire toutes les conditions d'induction de l'autophagie, telles que la déprivation en nutriments ou en facteurs de croissance et des niveaux énergétiques faibles, inhibent l'activité de mTORC1 ; suggérant un couplage étroit inversé entre l'induction de l'autophagie et l'activation de mTORC1 (Noda and Ohsumi, 1998 ; Yoshimori, 2004). mTORC1 constitue le centre névralgique des voies métaboliques et par conséquent joue le rôle de détecteur de l'état métabolique cellulaire (Cardenas et al., 1999 ; Jacinto and Hall, 2003). En dépit des progrès réalisés dans l'étude de l'autophagie, les mécanismes par lesquels mTORC1 régule l'autophagie restent méconnus.

mTORC1 interagit avec le complexe ULK1-Atg13-FIP200-Atg101 par le biais de Raptor, ce qui conduit à la phosphorylation d'ULK1, sur le résidu sérine 757, et d'ATG13, sur le résidu sérine 258, inhibant ainsi l'activité kinase d'ULK1 et l'autophagie (Ganley et al., 2009 ; Hosokawa et al., 2009 ; Jung et al., 2009). L'inhibition de mTORC1 entraîne la dissociation du complexe ULK1-Atg13-FIP200-Atg101 et la déphosphorylation d'ULK1 et d'Atg13. L'AMPK peut alors interagir avec ce complexe et phosphoryler ULK1, sur les résidus Ser 317 et 777, et ainsi induire son activation. ULK1 va alors phosphoryler ATG13, sur le résidu sérine 224, et FIP200, contribuant ainsi à l'initiation de l'autophagie (Kim et al., 2011a). Ainsi, l'initiation de l'autophagie par ULK1 est régulée réciproquement par mTORC1 et l'AMPK en réponse à des changements des niveaux énergétiques et de la disponibilité en nutriments. Il a également été montré que mTORC1 pouvait perturber l'activité du complexe Beclin-1-PI3K et ainsi la formation de l'autophagosome (Kim et al., 2013 ; Nazio et al., 2013 ; Yuan et al., 2013). En effet, mTORC1 inhiberait Beclin-1 et Ambra-1 (Nazio et al., 2013), ainsi que Atg14L (Yuan et al., 2013), tandis que l'AMPK entraînerait la phosphorylation et l'activation de Beclin-1 et de Vps34 (Kim et al., 2013; Yuan et al., 2013), offrant un autre mécanisme médié par mTORC1 et l'AMPK dans la régulation de l'autophagie. mTORC1 régule également l'autophagie au niveau transcriptionnel, en modulant notamment le facteur de transcription EB (TFEB) mais de aussi de FoxO1, impliqués tous les deux dans la transcription de gènes lysosomaux et de l'autophagie (Zhao et al., 2010; Settembre et al., 2013). mTORC1 coordonne donc le processus autophagique en supprimant son induction et en empêchant l'expression de gènes lysosomaux et de l'autophagie. Enfin, bien que mTORC1 soit inactivé pendant l'initiation de l'autophagie, l'efflux de métabolites entraîne sa réactivation, qui est nécessaire à la reformation de lysosomes fonctionnels et à l'accomplissement du flux autophagique (Yu et al., 2010).

Il est également important de noter que l'autophagie peut être contrôlée par la signalisation hormonale et serait donc importante pour le métabolisme et pourrait être impliquée dans les complications associées à l'obésité. En effet, il a été récemment rapporté que l'autophagie intervenait dans la régulation de la prise alimentaire, le développement du tissu adipeux, la stéatose hépatique, la résistance à l'insuline et jouait un rôle protecteur contre la lipotoxicité des cellules  $\beta$ . L'expression hypothalamique d'*Atg7* est réduite lors d'une DIO tandis que la délétion du gène *Atg7* dans l'hypothalamus entraîne une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel ainsi qu'une altération de la dépense énergétique (Meng and Cai, 2011). Ceci est corrélé avec l'induction de la voie de signalisation du facteur nucléaire  $\kappa$ -chaîne légère-activateur de cellules activées B (NF- $\kappa$ B), puisque le blocage de l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B dans les neurones corrige les effets induits par la délétion du gène *Atg7* (Meng and Cai, 2011). La déplétion nutritionnelle augmente l'autophagie des lipides et ainsi l'efflux d'acides gras, qui ensuite stimulent les neurones à AgRP, entraînant une augmentation de la prise alimentaire (Kaushik et al., 2011). De plus, la suppression de l'autophagie dans les neurones à AgRP entraîne une réduction de la prise alimentaire et du poids corporel ainsi que de la masse grasse (Kaushik et al., 2011), tandis que la suppression de l'autophagie dans les neurones à POMC active l'adiposité et altère la lipolyse périphérique et la tolérance au glucose, ainsi qu'une altération de la morphologie des neurones à POMC (Coupe et al., 2012; Kaushik et al., 2012). Récemment, il a également été démontré que l'autophagie régule la différenciation et la masse du tissu adipeux (Singh et al., 2009b ; Zhang et al., 2009). L'inhibition de l'autophagie dans les pré-adipocytes entraîne une réduction de l'accumulation de triglycérides, possiblement due à la transdifférenciation du WAT en BAT ainsi qu'une résistance à la DIO (Singh et al., 2009b ; Zhang et al., 2009). De plus, l'autophagie est suractivée dans le tissu adipeux chez des patients obèses, probablement due à une inactivation de la voie de mTORC1 (Ost et al., 2010 ; Kovsan et al., 2011). Une inhibition de l'autophagie dans le tissu adipeux pourrait jouer un rôle protecteur sur le risque d'obésité. Une diminution de l'autophagie est observée dans le foie de souris obèses accompagnée d'une stéatose hépatique, marquée par une diminution de LC3-II (Liu et al., 2009). Cette altération du flux autophagique hépatique entraîne une accumulation prolongée des niveaux lipidiques et une augmentation du stress, et contribue à l'apparition d'une résistance à l'insuline (Yang et al., 2010). Une délétion spécifique des gènes *Atg7* et *Atg5* dans le foie entraîne une diminution de l'autophagie et une accumulation de triglycérides (Komatsu et al., 2005; Singh et al., 2009a), tandis que la déplétion nutritionnelle augmente le nombre de gouttelettes lipidiques, d'autophagosomes, de lysosomes et d'autophagolysosomes (Singh et al., 2009a), confirmant le rôle crucial de l'autophagie dans la régulation du stockage

des lipides. Enfin, l'autophagie semble limiter la mort des cellules  $\beta$ . L'exposition à un régime HFD chez des souris où le gène *Atg7* a été délété dans les cellules  $\beta$  entraîne une diminution du nombre de cellules  $\beta$  et une altération de la tolérance au glucose (Ebato et al., 2008 ; Jung et al., 2008), bien que cet effet semble s'estomper après sept semaines de régime (Fujimoto et al., 2009). La meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'autophagie et de son implication dans la régulation de la prise alimentaire, l'homéostasie du glucose et des lipides, le diabète ainsi que les complications hépatiques ont permis de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour lutter contre l'obésité.

### **La régulation de l'autophagie par la protéine p62/SQSTM1**

L'autophagie a longtemps été considérée comme un processus non-sélectif permettant la dégradation massive des constituants cellulaires lors d'une privation en nutriments ou d'un stress cellulaire. Cependant, de nombreuses données suggèrent l'existence d'une sélectivité du processus autophagique des différents constituants cellulaires (Johansen and Lamark, 2011). Cette autophagie sélective nécessite la présence de protéines adaptatrices impliquées dans la reconnaissance des substrats spécifiques et leur recrutement vers l'autophagosome (Johansen and Lamark, 2011). Une de ces protéines est p62/SQSTM1, identifiée et isolée en 1996, qui est impliquée dans la formation et la dégradation d'agrégats protéiques (Vadlamudi et al., 1996). p62/SQSTM1 est au carrefour de différentes voies de signalisation impliquées dans la survie et la mort cellulaire, l'inflammation, la différenciation et le métabolisme des cellules (Puissant et al., 2012). Cette protéine, grâce à son domaine d'interaction avec l'ubiquitine (UBD), est impliquée dans le recrutement et l'adressage des protéines ubiquitinylées vers le protéasome, assurant ainsi leur dégradation et leur recyclage (Seibenhener et al., 2004). Mais cette protéine est surtout capable, grâce à son domaine d'interaction avec LC3 (LIR), d'adresser les constituants cellulaires ubiquitinylés vers l'autophagolysosome, afin d'être dégradés (Johansen and Lamark, 2011). Etant donné que la protéine p62/SQSTM1 est elle-même dégradée lors de l'autophagie, ses niveaux d'expression sont généralement considérés comme inversement proportionnels au flux autophagique (Klionsky et al., 2012). Enfin, une expression anormale de p62/SQSTM1 a été observée dans plusieurs types de cancer (Thompson et al., 2003 ; Mathew et al., 2009; Inoue et al., 2012), et la délétion du gène *p62/Sqstm1* entraîne une obésité accompagnée d'une altération du métabolisme du glucose et une résistance à l'insuline (Rodriguez et al., 2006).

Les fonctions cellulaires de p62/SQSTM1 sont influencées par ses différents partenaires protéiques, sa localisation cellulaire et ses modifications post-traductionnelles. Sa structure et

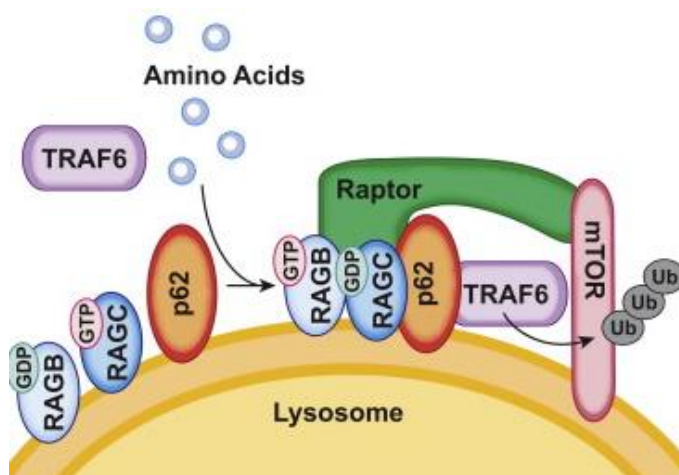


les différents domaines qui la composent lui permettent d'interagir avec un panel de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation intracellulaires. Une des premières fonctions identifiées de p62/SQSTM1 fut son rôle de protéine adaptatrice entre les protéines kinases C atypiques (aPKC) et leurs substrats. En effet, une étude avait démontré que p62/SQSTM1 permettait la phosphorylation via l'aPKC de la sous-unité Kv $\beta$ 2 de canaux potassiques neuronaux importants dans la régulation de l'activité neuronale (Gong et al., 1999). p62/SQSTM1 serait également importante au cours de la potentialisation à long terme (LTP) en permettant la phosphorylation via l'aPKC de la sous-unité GluA1 des récepteurs à acide aminométhylphosphonique (AMPA), favorisant l'adressage du récepteur au niveau de la vésicule synaptique (Jiang et al., 2009). La suppression du gène *p62/Sqstm1* entraîne une suppression de la LTP (Jiang et al., 2009). p62/SQSTM1 assure également la régulation du NF- $\kappa$ B, notamment via son interaction avec l'aPKC et le facteur associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TRAF6) (Duran et al., 2008). Ainsi, en réponse aux cytokines, p62/SQSTM1 modulerait également la réponse inflammatoire. En parallèle, p62/SQSTM1 se lie également à la Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), entraînant alors la dissociation du facteur nucléaire 2 similaire au dérivé d'érythroïde 2 (NRF2) associé à KEAP1 et sa relocalisation au noyau afin d'induire la transcription de gènes impliqués dans la réponse antioxydante (Jain et al., 2010). Ces résultats illustrent que la délétion ou la surproduction de p62/SQSTM1 a des répercussions fonctionnelles importantes *in vivo* en fonction du contexte

Des études récentes sur des souris dont le gène *p62/Sqstm1* a été délété dans le tissu adipeux donnent un aperçu de son rôle physiologique. En plus de développer une obésité et une résistance à l'insuline, ces souris présentent également une réduction de la dépense énergétique et de la thermogenèse, ainsi qu'une diminution des niveaux de transcription de gènes impliqués dans ces processus (Rodriguez et al., 2006). De plus, l'augmentation de l'adiposité observée chez ces souris serait due à une augmentation de l'expression des gènes codant pour PPAR $\gamma$  et ERK bien avant que ces souris ne deviennent obèses (Rodriguez et al., 2006). Tous ces changements conduisant à l'obésité seraient indépendants de son interaction avec l'aPKC (Lee et al., 2010b). Ces résultats indiquent que la perte de p62/SQSTM1 affiche toutes les caractéristiques du syndrome métabolique, suggérant un rôle de p62/SQSTM1 dans le contrôle de l'homéostasie métabolique.

Des données récentes montrent que p62/SQSTM1 interagirait avec un autre régulateur critique de l'homéostasie énergétique : mTORC1. Une analyse protéomique a permis d'identifier Raptor comme la protéine de mTORC1 interagissant avec p62/SQSTM1 au niveau d'un nouveau domaine (Duran et al., 2011) (**Figure 7**). Cette interaction permettrait d'expliquer

pourquoi p62/SQSTM1 est nécessaire à l'activation de mTORC1 en réponse aux acides aminés (Duran et al., 2011). Cette interaction assure également la relocalisation de mTORC1 à la membrane lysosomale et son activation par des GTPases de la famille Rab, conduisant ainsi à la régulation négative de l'autophagie (Sancak et al., 2008 ; Duran et al., 2011 ; Linares et al., 2013). De plus, en absence de p62/SQSTM1, l'autophagie est suractivée, un effet similaire à la suractivation de l'autophagie qui accompagne une réduction de l'activité de mTORC1 (Duran et al., 2011). Ceci implique que p62/SQSTM1, qui est dégradé par l'autophagie, régule également l'autophagie, suggérant l'existence d'un mécanisme de rétrocontrôle par lequel l'activation de mTORC1 par p62/SQSTM1 entraînerait des niveaux de p62/SQSTM1 plus élevés, qui, à leur tour, favoriseraient l'activité de mTORC1 (Duran et al., 2011). Ce mécanisme permettrait de garantir l'irréversibilité de la mort cellulaire en favorisant la suractivation de l'autophagie lors d'une déplétion nutritive. De plus, p62/SQSTM1 joue également un rôle important dans l'homéostasie énergétique au niveau de l'organisme, notamment dans la régulation de l'adipogenèse. En effet, l'inhibition de l'autophagie provoque l'accumulation de p62/SQSTM1 (Zhang et al., 2009), entraînant l'inhibition de l'adipogenèse (Rodriguez et al., 2006), tandis que la délétion du gène *p62/Sqstm1* augmente l'adipogenèse avec un BAT ayant des propriétés similaires à celles d'un WAT, et réduit également la dépense énergétique et l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique (Rodriguez et al., 2006). Ceci suggère que l'autophagie régule l'homéostasie métabolique et l'adipogenèse via l'inhibition de p62/SQSTM1 au niveau périphérique. Cependant, bien que certaines études démontrent l'importance d'un processus autophagique fonctionnel au niveau central, notamment au niveau de l'hypothalamus (Kaushik et al., 2011 ; Coupe et al., 2012; Kaushik et al., 2012), le rôle de p62/SQSTM1 et son interaction avec mTORC1 dans l'hypothalamus ne sont pas connus à ce jour.



**Figure 7. Représentation schématique de l'interaction de p62/SQSTM1 avec mTORC1 (adaptée de Linares, JF et al., Mol Cell, 2013).**

*En réponse aux acides aminés, p62/SQSTM1 se lie à Raptor, à TRAF6 et aux Rags, favorisant la formation et l'activation de l'hétérodimère RAGB/RAGC, ainsi que le recrutement et l'ancrage de mTORC1 à la membrane lysosomale via Ragulator et permettre son activation par Rheb et par TRAF6.*

## **Le système endocannabinoïde**

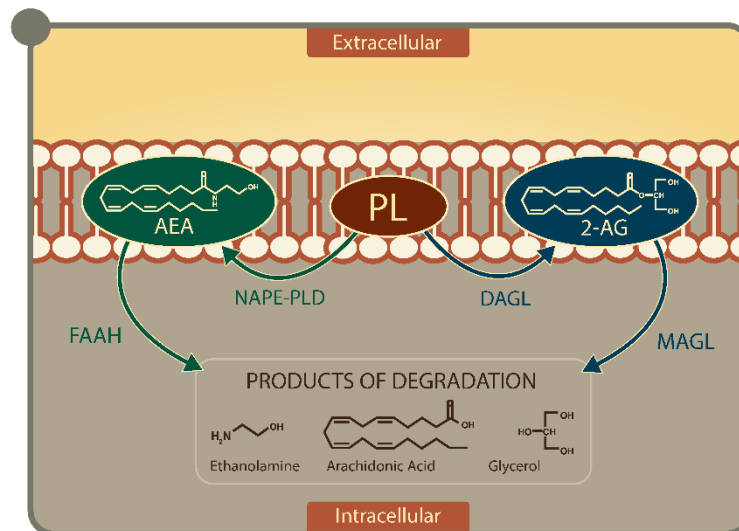
### **Vue d'ensemble**

Le *Cannabis sativa* est une des plus anciennes plantes cultivées par l'homme. Des écrits datant du XXVIII<sup>ème</sup> siècle avant J.-C. rapportent sa culture en Chine, lorsque l'empereur Shennong enseigna à son peuple comment cultiver le chanvre pour ses fibres (Mikuriya, 1969). Plus de mille ans avant J.-C., des écrits documentent son usage, non plus pour ses fibres, mais comme remède médicinal, notamment en Chine et en Inde (Mikuriya, 1969). La plante est arrivée en Europe au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, par l'intermédiaire d'un médecin britannique, W.B. O'Shaughnessy, qui la rapporta d'Inde en vantant ses qualités thérapeutiques mais également son utilisation récréative. Grâce à ses propriétés relaxantes, sédatives et analgésiques, elle fut tout d'abord utilisée pour traiter différentes pathologies, telles que les rhumatismes, la rage ou le tétanos, avant que son usage ne devienne de plus en plus répandu dans la pharmacopée des pays occidentaux lors de la deuxième moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle (Mikuriya, 1969). Elle fut ensuite peu à peu remplacée par d'autres molécules plus efficaces et plus faciles d'utilisation, telles que les opiacés, durant la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle (Mikuriya, 1969).

La compréhension des actions de la marijuana a commencé avec l'isolement et la caractérisation de ses composés chimiques. Une équipe de chercheurs isole et détermine la structure d'un premier cannabinoïde, le cannabidiol, en 1963 (Mechoulam and Gaoni, 1965b), puis ils isolent et purifient un an plus tard un deuxième cannabinoïde, le THC, connu à ce jour comme le principal composé psychoactif de la marijuana (Mechoulam and Gaoni, 1965a). Suite à la découverte du composé biologiquement actif de la marijuana, il a été déterminé que les effets du THC devaient être médiés par des protéines spécifiques de la membrane plasmique, désignés comme « récepteurs aux cannabinoïdes ». En effet, une équipe démontra que les cannabinoïdes, en particulier le THC, entraînaient une diminution de l'accumulation d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP), et donc une inhibition de l'adénylate cyclase (Howlett, 1984) ; un effet nécessitant une protéine  $G_{i/o}$  fonctionnelle (Howlett et al., 1986), suggérant que les cannabinoïdes agissaient par le biais d'un récepteur. C'est d'ailleurs en 1988 que Howlett et ses collaborateurs isolent et caractérisent pour la première fois un récepteur aux cannabinoïdes dans le CNS (Devane et al., 1988). Un premier gène codant pour ce récepteur fut ensuite identifié et cloné, le CB1R (Matsuda et al., 1990). Un second récepteur fut par la suite identifié et appelé CB2R (Munro et al., 1993). Bien que l'existence de plusieurs récepteurs pour le THC et/ou ses analogues synthétiques soit proposée en fonction des données

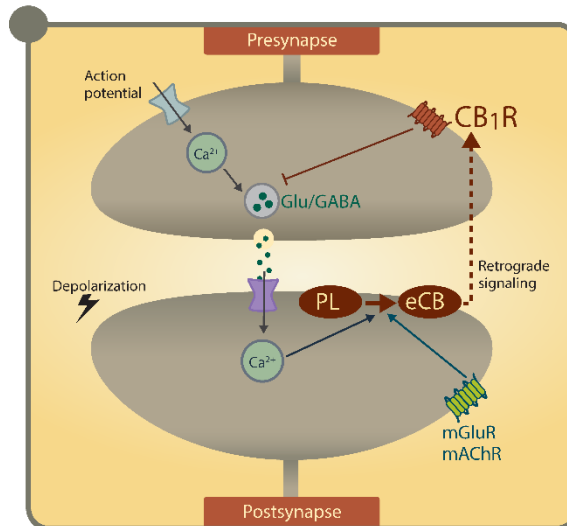
pharmacologiques, à ce jour seulement deux récepteurs aux cannabinoïdes ont été clonés. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) (Battista et al., 2012). CB1R est probablement le GPCR le plus abondant du CNS, et bien que l'on pensât qu'il soit essentiellement exprimé dans le cerveau et que l'expression des CB2Rs soit limitée à la périphérie et aux cellules immunitaires, leur distribution s'est révélée plus complexe (Battista et al., 2012). En effet, les CB1s sont également importants pour médier les effets des cannabinoïdes et de ses ligands endogènes nommés endocannabinoïdes, au niveau des tissus périphériques, tels que le WAT, le foie, les muscles, l'intestin et le pancréas (Bermudez-Silva et al., 2010), tandis que l'expression des CB2Rs est également observée dans certaines régions cérébrales (Gong et al., 2006). Cette distribution différentielle est due en partie aux fonctions que ces récepteurs régulent. Alors que les CB1Rs au niveau du cerveau sont responsables notamment de la modulation de la libération de neurotransmetteurs, les CB2s, quant à eux, semblent intervenir dans la régulation de la libération et de la fonction des cytokines (Ashton and Glass, 2007).

La découverte de récepteurs répondant aux cannabinoïdes exogènes suggérait qu'il existait des ligands endogènes également capables de les activer. En effet, cette supposition a conduit à la recherche et à la découverte de ces ligands endogènes, appelés endocannabinoïdes. Le premier endocannabinoïde, l'AEA fut découvert en 1992 (Devane et al., 1992). Un deuxième endocannabinoïde, le 2-AG, fut découvert peu de temps après (Mechoulam et al., 1995). D'autres endocannabinoïdes ont ensuite été identifiés, mais l'AEA et le 2-AG restent tout de même les plus étudiés. Ces endocannabinoïdes proviennent du métabolisme non oxydatif de l'acide arachidonique (AA), un acide gras polyinsaturé essentiel de la famille des  $\omega$ -6 appartenant aux phospholipides présents dans les membranes cellulaires, par des enzymes spécifiques (Mazier et al., 2015). La N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) permet la synthèse d'AEA à partir du N-acyl phosphatidylethanolamine (NAPE), tandis que la diacylglycérol lipase (DAGL) permet de synthétiser le 2-AG à partir du diacylglycérol (DAG) (Mazier et al., 2015). Les voies de dégradation spécifiques ont ensuite été identifiées : la fatty acid amid hydrolase (FAAH) et la monoacylglycérol lipase (MAGL) dégradent respectivement l'AEA et le 2-AG (Mazier et al., 2015) (**Figure 8**).



***Figure 8. Représentation schématique de la synthèse et dégradation des endocannabinoïdes au sein de la cellule (adaptée de Mazier W, Saucisse N et al, Trends Endocrinol Metab 2015).*** Principales étapes enzymatiques impliquées dans la formation et l'hydrolyse de l'AEA et du 2-AG dans la cellule. Les deux principaux endocannabinoïdes, l'AEA et le 2-AG sont synthétisés à la demande à partir de phospholipides du compartiment post-synaptique. L'AEA est synthétisé par catalyse de la NAPE via la NAPE-PLD. Le 2-AG provient quant à lui de l'hydrolyse du DAG via la DAGL. La dégradation de l'AEA s'effectue grâce à la FAAH qui le dégrade en AA et en éthanolamine. La dégradation du 2-AG est principalement attribuée à la MAGL qui le clive en AA et en glycérol. PL : phospholipides.

Comme indiqué précédemment, les CB1Rs sont l'un des GPCRs les plus abondants du CNS mais ils sont également exprimés par les astrocytes ainsi que dans les nerfs périphériques, dont ceux innervant le tractus gastro-intestinal (Mazier et al., 2015). De plus, l'expression de ces récepteurs coïncide avec l'expression de l'AEA et du 2-AG dans le CNS. Cependant, la distribution du mRNA et du CB1R diffèrent. Tandis que le mRNA est principalement localisé au niveau des corps cellulaires, CB1R est majoritairement localisé au niveau du compartiment pré-synaptique, au niveau des terminaisons axonales. Cette localisation pré-synaptique est importante dans la modulation de la libération des principaux neurotransmetteurs, tels que le GABA et glutamate, mais aussi les catécholamines et la sérotonine (Richard et al., 2009). En effet, à la différence des neurotransmetteurs classiques qui sont stockés dans des vésicules synaptiques et libérés en réponse à l'activation neuronale pour agir sur les neurones post-synaptiques, les endocannabinoïdes sont, quant à eux, synthétisés à partir des phospholipides membranaires du compartiment post-synaptique et libérés à la demande pour agir de façon rétrograde sur les neurones pré-synaptiques (Piomelli, 2003). Leur fixation aux CB1Rs induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, entraînant une hyperpolarisation des neurones pré-synaptiques et inhibant ainsi la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Piomelli, 2003) (**Figure 9**).



***Figure 9. Représentation schématique du fonctionnement de l'ECS au niveau synaptique (adaptée de Mazier W, Saucisse N et al, Trends Endocrinol Metab 2015).***

*Signalisation rétrograde des endocannabinoïdes au niveau de la synapse. Les endocannabinoïdes sont mobilisés au niveau de la membrane des neurones post-synaptiques et se lient aux CB1Rs localisés sur les neurones pré-synaptiques afin de moduler la libération de neurotransmetteurs. PL : phospholipides ; eCB : endocannabinoïdes ; mAChR : récepteur muscarinique de l'acétylcholine ; mGluR : récepteur métabotropique du glutamate.*

Cependant, les cascades de signalisation initiées par la liaison des endocannabinoïdes à CB1R est remarquablement complexe. L'activation des CB1Rs au niveau pré-synaptique active une protéine  $G_{i/o}$ , induisant la libération de la sous-unité  $\alpha$  (Piomelli, 2003). Cet isoforme va entraîner l'inhibition de l'adénylate cyclase, ainsi que la fermeture des canaux calciques dépendants du voltage et l'activation des canaux potassiques dépendants du voltage (Battista et al., 2012). Ce type d'action est à la base de la fonction neuromodulatrice de l'ECS dans le CNS ainsi que dans les tissus périphériques. Cependant, la libération de la sous-unité  $\beta\gamma$  peut, quant à elle, induire l'activation de l'adénylate cyclase ainsi que plusieurs autres kinases de signalisation, telles que les MAPK et ERK mais aussi PI3K et ainsi mTOR (Piomelli, 2003 ; New and Wong, 2007).

Le développement d'antagonistes sélectifs des CB1Rs ainsi que de modèles génétiques où le gène *Cnr1* codant pour le CB1R a été muté ont permis des avancées importantes dans la caractérisation de populations neuronales ou des tissus périphériques où ils sont exprimés ainsi que dans la compréhension de leur action dans la régulation de la balance énergétique. Notamment, les effets anorexigènes induits par l'utilisation d'un agoniste inverse des CB1Rs, le rimonabant, ont démontré que les endocannabinoïdes sont des composés dont l'activité tonique favorise la prise alimentaire. Cependant, l'utilisation du rimonabant en tant que traitement anti-obésité n'est plus autorisée à cause d'effets secondaires psychiatriques graves. Cependant, les études des dix dernières années ont permis d'apporter des informations

nouvelles sur les différents rôles physiologiques joués par l'ECS ainsi que ses mécanismes d'action, faisant de lui une cible de recherche toujours aussi attrayante pour le traitement de l'obésité.

### **Le rôle de l'ECS dans la régulation de la balance énergétique**

L'ECS exerce un contrôle sur tous les aspects liés à la recherche, la consommation, le métabolisme et le stockage des calories, et il a ainsi été reconnu avoir un rôle crucial dans la régulation de la balance énergétique, et entraîner notamment une prise de poids corporel. Ce système, qui est particulièrement bien conservé à travers les espèces (Elphick, 2012), semble avoir été sélectionné par l'évolution afin d'optimiser la consommation de nourriture et la conservation de l'énergie sous forme de masse grasse, susceptibles d'augmenter la survie de l'organisme en période de pénurie (Matias et al., 2006a ; DiPatrizio and Piomelli, 2012). En conséquence, l'activation de l'ECS favorise la consommation d'aliments agréables au goût, stimule la lipogenèse et procure un niveau de maintien calorique stable, tout en inhibant la dépense énergétique et la thermogenèse. Cependant, dans la société moderne, où la nourriture est abondante, l'activité excessive de l'ECS est une caractéristique marquante de l'obésité et des troubles métaboliques (Bermudez-Silva et al., 2012 ; Silvestri and Di Marzo, 2013). La compréhension des mécanismes biologiques et du rôle de l'ECS dans la modulation de la prise alimentaire a commencé seulement après la découverte des CB1Rs et l'identification des endocannabinoïdes. Bien qu'au début, il était supposé que les effets de l'ECS soient uniquement exercés au niveau du CNS, l'expression des CB1Rs au niveau du SNS et des organes périphériques affectant l'homéostasie énergétique, tels le système digestif, le tissu adipeux, le foie et les muscles, suggèrent un rôle de l'ECS dans le métabolisme périphérique (Mazier et al., 2015).

### **Le rôle de l'ECS dans les tissus périphériques**

Les cannabinoïdes, les endocannabinoïdes et l'activation des CB1Rs, favorisent la prise alimentaire, en particulier si la nourriture est palatable (Bermudez-Silva et al., 2012 ; Silvestri and Di Marzo, 2013). Il n'est donc pas surprenant que l'ECS joue un rôle dans la modulation, à la fois, de l'odeur et du goût, deux sens qui, avec la vue, guident l'organisme vers la prise alimentaire ou le rejet des aliments (Herman and Polivy, 2008). Un dysfonctionnement du système olfactif est d'ailleurs observé chez les patients obèses (Patel et al., 2015). De plus, la faim stimule la synthèse de 2-AG dans l'épithélium olfactif et augmente la sensibilité des neurones olfactifs (Breunig et al., 2010), tandis que la privation de nourriture induit également une augmentation de l'expression d'endocannabinoïdes dans le bulbe olfactif, entraînant une

augmentation de la détection olfactive et de la prise alimentaire lors d'un paradigme de « refeeding » (Soria-Gomez et al., 2014). Ainsi, la modulation de l'ECS au niveau du nez peut sensiblement influencer sur le comportement orienté vers la recherche de nourriture. Dans la bouche, les bourgeons du goût des papilles gustatives sont responsables de la détection des aliments et de la transmission gustative vers le NTS, qui en réponse envoie des projections et reçoit des informations du cerveau antérieur et des tissus périphériques (Grill and Hayes, 2012). Les CB1Rs colocalisent avec ces cellules et améliore notamment les réponses neuronales au goût sucré (Yoshida et al., 2010). L'AEA et le 2-AG sont également retrouvés dans la salive humaine et leurs niveaux d'expression sont plus importants chez les patients obèses (Matias et al., 2012), suggérant un possible rôle dans la perception des goûts et la détection orosensorielle, en particulier des lipides. Il semblerait également que ce soit un niveau d'interaction entre l'ECS et la leptine dans la modulation du goût (Niki et al., 2010). Cependant aucune étude n'a pour le moment montré de lien direct entre l'activation des CB1Rs dans la cavité buccale et la réponse neuronale aux graisses.

Des études ont démontré que les endocannabinoïdes produits par le système digestif sont capables de moduler la prise alimentaire et fonctionne comme des signaux de faim. En effet, le jeûne entraîne une augmentation de leur production dans le petit intestin, tandis que chez des rats nourris *ad libitum* leur production est diminuée (Gomez et al., 2002). Des études récentes ont étudié plus en détails la relation entre l'ECS et la consommation de nutriments spécifiques en utilisant le modèle de repas fictif, imitant la consommation alimentaire normale, mais où la nourriture et les boissons ne sont pas réellement digérées ou absorbées, permettant ainsi de différencier les propriétés orosensorielles de la nourriture des qualités post-ingestion. Il a été démontré que les endocannabinoïdes modulent la consommation de nourriture, en particulier des graisses, en fonction de leurs qualités orosensorielles, notamment au niveau du jéjunum (DiPatrizio et al., 2011 ; DiPatrizio et al., 2013). Cependant, aucun effet n'a été observé en réponse à l'ingestion de protéines ou de glucides (DiPatrizio et al., 2011), démontrant le rôle clé joué par les endocannabinoïdes sur la préférence et la consommation des graisses. Cependant, il est actuellement difficile de savoir comment les endocannabinoïdes produits dans le système digestif communiquent avec le cerveau pour réguler la prise alimentaire. Quelques articles suggèrent qu'ils pourraient exercer leurs effets via l'action des CB1Rs sur le nerf vague (Burdyga et al., 2010) et sur les nerfs du SNS (Ishac et al., 1996), ou bien via la modulation de la sécrétion d'hormones gastrointestinales, telles que la ghréline, qui est connue pour augmenter la perception du goût des graisses (Cai et al., 2013) et la valeur récompensante des régimes HFD (Perello et al., 2010).



D'autres études portant sur le rôle de l'ECS dans les tissus périphériques soulignent comment ce système est capable d'orchestrer le transport, le métabolisme et l'utilisation des nutriments comme substrat énergétique. L'ECS régule notamment le transport des lipides dans la circulation sanguine puisque l'administration systémique d'un inhibiteur de la dégradation des endocannabinoïdes entraîne une hypertriglycémie accompagnée d'une réduction de la clairance des triglycérides plasmatiques et de l'accumulation de lipoprotéines de haute densité (HDL) (Ruby et al., 2008). De plus, l'activation des CB1Rs dans le WAT favorise l'adipogenèse et l'accumulation de gouttelettes lipidiques riches en triglycérides, et ainsi le stockage de l'énergie via l'induction de la différenciation des adipocytes et l'inhibition de la biogenèse mitochondriale (Silvestri and Di Marzo, 2013), tandis que leur inhibition entraîne l'oxydation des acides gras, la biogenèse des mitochondries et la transdifférenciation du WAT en BAT (Perwitz et al., 2010; Tedesco et al., 2010). En outre, les CB1Rs au niveau des adipocytes semblent réguler l'expansion du WAT ainsi que le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline (Mancini et al., 2010). En effet, l'insuline et la leptine exerce un contrôle négatif sur la production d'endocannabinoïdes (Matias et al., 2006b ; Buettner et al., 2008; D'Eon et al., 2008), suggérant que la résistance à l'insuline et la leptine pourrait mener à une sur-activation de l'ECS favorisant l'accumulation de graisses.

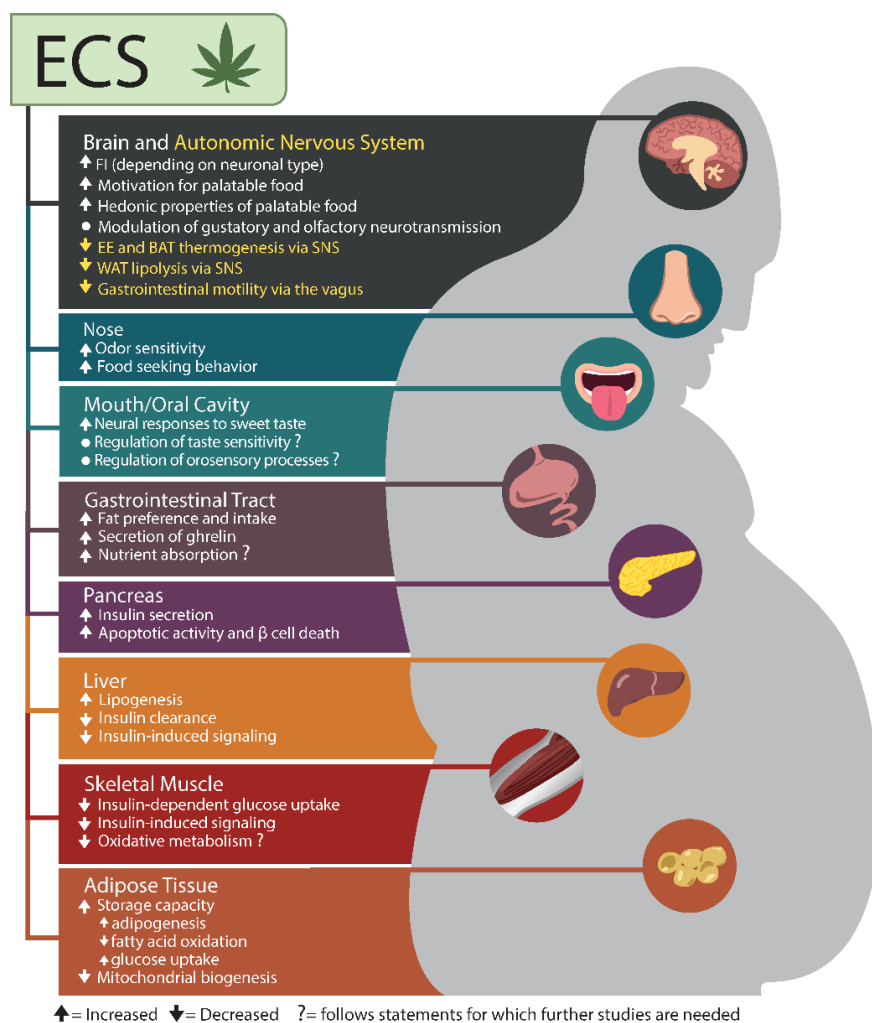
Une sur-activation de l'ECS est également observée au niveau du foie de patients obèses (Auguet et al., 2014). L'activation des CB1Rs dans le foie augmente l'expression de marqueurs de la lipogenèse, tels que les SREBP-1, l'ACC et la FAS, probablement via l'inhibition de l'activité de l'AMPK, entraînant l'accumulation de lipides et une stéatose hépatique (Osei-Hyiaman et al., 2008 ; Tam et al., 2010 ; Wu et al., 2011). L'activation des CB1Rs entraîne également une glycogénolyse, qui va inhiber la clairance de l'insuline ainsi que la phosphorylation d'Akt induite par l'insuline (Liu et al., 2012 ; Cinar et al., 2014). L'impact des CB1Rs hépatiques sur le métabolisme des lipides et du glucose est important, puisqu'il a été observé que la surexpression de CB1Rs spécifiquement dans le foie de souris où le gène *Cnr1* a été délété entraînait une forte résistance hépatique et systémique à l'insuline sans modification du poids corporel lors d'une exposition à un régime HFD (Liu et al., 2012). A l'inverse, la délétion spécifique du gène *Cnr1* dans le foie entraîne une prise de poids corporel mais protège de la stéatose hépatique, l'hyperglycémie, la dyslipidémie et la résistance à l'insuline (Osei-Hyiaman et al., 2008). De plus, l'administration d'un antagoniste des CB1Rs agissant exclusivement au niveau périphérique lors d'une DIO procure des effets bénéfiques sur la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline, entraînant une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Tam et al., 2010 ; Tam et al., 2012).

L'ECS au niveau périphérique semble également important dans les réponses métaboliques des glucocorticoïdes. Une augmentation des glucocorticoïdes circulants est considérée comme étant un facteur qui contribue à l'obésité et au syndrome métabolique (Dallman, 2010). En effet, chez des souris où le gène *Cnr1* a été délété, la capacité de la corticostérone à induire une obésité, une stéatose hépatique et une dyslipidémie est réduite voire abolie (Bowles et al., 2015). De même, l'administration d'un antagoniste des CB1Rs agissant au niveau périphérique atténue les changements métaboliques induits par les glucocorticoïdes, suggérant une action des glucocorticoïdes sur l'ECS périphérique dans ces effets. En effet, l'exposition chronique aux glucocorticoïdes entraîne une augmentation des taux circulants d'AEA au niveau du foie, sans modification au niveau central (Bowles et al., 2015). Les CB1Rs au niveau du foie sont d'ailleurs déterminants dans les changements induits par les glucocorticoïdes sur le métabolisme des lipides puisque la délétion du gène *Cnr1* dans le foie protège contre la dyslipidémie induite par les glucocorticoïdes, alors que ces souris développent toujours une obésité (Bowles et al., 2015).

Enfin, l'ECS exerce également un contrôle du métabolisme du glucose au niveau de plusieurs organes et module notamment la réponse à l'insuline au niveau du foie et des muscles, ainsi que la sécrétion d'insuline par le pancréas (Lipina et al., 2010). En particulier, l'activation des CB1Rs dans les cellules  $\beta$  recrute des focal adhesion kinases (FAK), provoquant l'exocytose de vésicules d'insuline via une réorganisation du cytosquelette (Malenczyk et al., 2013). Ce mécanisme pourrait donc participer à l'hyperinsulinémie généralement observée dans le diabète de type 2 (Malenczyk et al., 2013). De plus, les CB1Rs peuvent influencer sur la santé des cellules  $\beta$ , soit indirectement par l'induction de macrophages dans le pancréas (Jourdan et al., 2013), ou directement en stimulant l'activité apoptotique et la mort des cellules  $\beta$  (Kim et al., 2012). A l'inverse, le blocage des CB1Rs augmente la prolifération et la masse des cellules  $\beta$  (Kim et al., 2011b).

L'ECS est impliqué dans la plupart des aspects de la régulation de la balance énergétique au niveau périphérique, lui accordant une place préférentielle afin de pouvoir contrôler la prise alimentaire, l'absorption des nutriments, la dépense énergétique, le stockage des graisses et l'homéostasie du glucose (Mazier et al., 2015). Une hyperactivité de l'ECS, telles que celle reportée chez des patients obèses pourrait aisément contribuer à l'apparition de problèmes métaboliques et affecter notre alimentation et notre dépense énergétique, pouvant ensuite conduire au développement de la maladie (Quarta et al., 2011; Bermudez-Silva et al., 2012). Les recherches actuelles s'orientent sur la découverte et la caractérisation d'antagonistes des CB1Rs agissant au niveau périphérique (Mazier et al., 2015). Cependant, il ne faut pas oublier

que l'ECS joue également un rôle important dans la régulation de la balance énergétique au niveau central, puisque la délétion du gène *Cnr1* dans les neurones, en particulier ceux libérant du glutamate, entraîne une réduction de la prise alimentaire et procure une résistance à l'obésité (Quarta et al., 2010 ; Pang et al., 2011). Il est donc toujours important de chercher à comprendre les mécanismes mis en jeu par l'ECS et son rôle au niveau central dans la modulation de la balance énergétique (**Figure 10**).



**Figure 10. Représentation schématique illustrant l'action de l'ECS sur le métabolisme (adaptée de Mazier W, Saucisse N et al, Trends Endocrinol Metab 2015).**

L'ECS favorise la prise et la conservation de l'énergie au niveau de l'organisme en exerçant des actions clés sur les tissus cibles. L'action de l'ECS sur le cerveau et le SNS favorise la prise alimentaire, tout en diminuant la dépense énergétique et diminue l'utilisation de lipides en tant que substrats énergétiques à la périphérie. L'ECS affecte également l'alimentation en modulant la perception des goûts la détection orosensorielle, et en induisant spécifiquement une préférence pour la consommation des graisses au niveau du tractus gastro-intestinal. L'ECS exerce un contrôle multi-organe du métabolisme du glucose en modulant la réponse à l'insuline au niveau du foie et des muscles squelettiques, la clairance hépatique de l'insuline et la sécrétion pancréatique d'insuline. Enfin, l'ECS régule le métabolisme des lipides en augmentant la capacité de stockage dans le tissu adipeux et en favorisant l'accumulation de graisses et la stéatose hépatique. FI : prise alimentaire ; EE : dépense énergétique.

## **Le rôle de l'ECS dans le système nerveux central**

Notre appétit pour la nourriture est soumis à de puissantes influences d'ordre psychologique. La plupart d'entre nous résistent mal à un petit extra alimentaire. En effet, il nous est très difficile de ne pas céder à la plus excusable des tentations : la gourmandise. C'est probablement d'ailleurs l'un des sept péchés capitaux dont il est le plus difficile de ne pas succomber. Notre héritage évolutif a fait en sorte que nos mécanismes motivationnels s'efforcent de maintenir un apport constant et un stockage de l'énergie excédentaire au dépend de sa dépense. Notre susceptibilité aux propriétés sensorielles des aliments, c'est-à-dire la variété des sources et leur palatabilité, est une des causes principales de l'obésité. En effet, il existe au sein du cerveau deux circuits neuronaux en interaction dans la régulation de l'appétit et de la prise alimentaire : un contrôlant le « besoin » et l'autre le « plaisir » de manger et qui constituent le système de récompense. Le premier circuit prend son origine dans la VTA, qui projette des axones dopaminergiques sur le NAc. Il évalue la force motivationnelle de la nourriture. Le second circuit est situé au sein même du NAc, où les réseaux neuronaux permettent l'évaluation hédoniste de la nourriture. Certains psychotropes, dont le THC, sont capables d'interagir avec ce système de récompense. Un dysfonctionnement de ce système serait à l'origine de troubles du comportement, et notamment du comportement alimentaire (anorexie, boulimie, etc.) ou à la dépendance (psychotropes, jeux, sexe, etc.).

Dans le cerveau, les CB1Rs sont présents en quantité très importante dans différentes structures, telles que le système limbique, le cortex, l'hippocampe, le thalamus et le cervelet. L'ECS jouerait donc un rôle dans la régulation des émotions, les processus de mémorisation, l'intégration des informations sensorielles et le comportement moteur. Les CB1Rs sont également localisés à la confluence du centre du « besoin » et du « plaisir », le NAc, ainsi que dans de nombreuses régions à afférences dopaminergiques (Parsons and Hurd, 2015). Cette localisation très spécifique pourrait expliquer en partie les propriétés hédonistes et euphorisantes du cannabis. Enfin, l'action des cannabinoïdes et endocannabinoïdes au sein du système de récompense semble moduler la prise alimentaire. En effet, l'administration d'AEA et de 2-AG dans le NAc stimule la prise alimentaire tandis que l'administration de rimonabant la diminue (Kirkham et al., 2002 ; Soria-Gomez et al., 2007). Le THC semble augmenter la force motivationnelle de la nourriture, puisque l'administration de THC augmente la prise alimentaire de rats nourris *ad libitum* (Kirkham et al., 2002). De plus, un paradigme de « refeeding » entraîne une augmentation des niveaux d'expression d'AEA et de 2-AG, favorisant l'activité du réseau mésolimbique (Di Marzo and Matias, 2005). Les cannabinoïdes semblent également capables de moduler les aspects hédoniques des repas. En effet,

l'administration d'AEA, de 2-AG ou de THC augmente la palatabilité de la nourriture (Higgs et al., 2003 ; Jarrett et al., 2005 ; Jarrett et al., 2007). La sensation de faim, voire de fringale, expérimentée par les consommateurs de cannabis dérivent donc de la capacité du THC à mimer l'action des agonistes endogènes des CB1Rs, et a permis de commencer à comprendre le rôle biologique de l'ECS dans le contrôle de la balance énergétique au niveau cérébral.

Sachant que l'hypothalamus est une des principales régions cérébrales impliquée dans la régulation de la balance énergétique et que l'ECS semble également pouvoir moduler cette balance, il est logique de penser que l'ECS puisse jouer un rôle au niveau hypothalamique. L'activation des CB1Rs est très efficace au niveau de l'hypothalamus, malgré la faible expression de mRNA (Marsicano and Lutz, 1999). Comme mentionné précédemment, la plus forte expression de mRNA des CB1Rs se situe dans le VMN, mais ils sont également présents au niveau des autres noyaux hypothalamiques (Herkenham et al., 1991; Marsicano and Lutz, 1999 ; Cota et al., 2003). Le récepteur est, quant à lui, exprimé sur les afférences de l'ARC, du PVN, du VMN et de la LHA (Wittmann et al., 2007), connus pour être des régions clés dans la régulation de la balance énergétique (Meister, 2007 ; de Backer et al., 2011 ; van Dijk et al., 2011), ainsi que sur les afférences de régions extra-hypothalamiques également impliquées dans la régulation de la balance énergétique, telles que le tronc cérébral et le complexe vagal dorsal (CVD) (Di Marzo et al., 2009; Dockray, 2009). De plus, l'ECS semble interagir avec la leptine, notamment au niveau hypothalamique où la leptine inhibe la production d'endocannabinoïdes ainsi que leur fonction neuromodulatrice (Di Marzo et al., 2001 ; Jo et al., 2005; Malcher-Lopes et al., 2006). De plus les animaux ob/ob et db/db possèdent des niveaux d'expression d'endocannabinoïdes élevés au niveau de l'hypothalamus (Di Marzo et al., 2001). Cependant, les mécanismes impliqués ainsi que les sites spécifiques de cette interaction restent méconnus, bien que des études référencent tout de même des effets au niveau du PVN et de la LHA (Jo et al., 2005 ; Tasker, 2006 ; Cardinal et al., 2012). Bien que l'ECS semble moduler les différentes populations neuronales et interagir avec la signalisation de la leptine au niveau hypothalamique, son rôle dans la régulation de la balance énergétique reste méconnu.

L'idée d'une interaction entre l'ECS et le système mélanocortine est née très récemment. Certaines études ont montré une absence de colocalisation des mRNAs des CB1Rs avec les neurones à NPY (Cota et al., 2003), tandis que des afférences GABAergiques et glutamatergiques projetant sur l'ARC expriment le récepteur (Wittmann et al., 2007). D'autres études démontrent également que l'administration d'un agoniste des CB1Rs diminue l'amplitude et la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs induits par les neurones à

POMC, tandis que l'administration d'un antagoniste des CB1Rs les augmente (Ho et al., 2007). Il faut noter que les niveaux d'expression des CB1Rs semblent être beaucoup plus faible dans l'ARC en comparaison d'autres régions hypothalamiques et cérébrales. Mais avec l'arrivée de moyens de détection de plus en plus performants, il semblerait que les neurones du système mélanocortine expriment eux aussi les CB1Rs et plusieurs études suggèrent que l'ECS serait en aval de l'action du système mélanocortine. En effet, il a été montré qu'une sous-population de neurones à POMC libère des endocannabinoïdes qui inhibent la libération de GABA et ainsi suppriment l'action inhibitrice des neurones GABAergiques projetant leurs axones sur les neurones à POMC (Hentges et al., 2005 ; Hentges, 2007). Dans une étude récente, il a par ailleurs été montré que l'activation de l'ECS favorise la prise alimentaire, et de façon étonnante, entraîne également une augmentation de l'activité des neurones à POMC (Koch et al., 2015). L'augmentation de l'activité des neurones à POMC est essentielle à l'action orexigène de l'ECS, puisque l'inhibition sélective des neurones à POMC diminue, tandis que leur activation augmente la prise alimentaire induite par l'ECS, dévoilant un rôle inattendu des neurones à POMC dans la promotion de la prise alimentaire (Koch et al., 2015). D'autre part, l'administration de rimonabant diminue la prise alimentaire induite par un antagoniste des MC4Rs (Verty et al., 2004 ; Monge-Roffarello et al., 2014), tandis que l'administration d'un agoniste des MC4Rs ne modifie pas les concentrations d'endocannabinoïdes au niveau de l'hypothalamus (Matias et al., 2008), suggérant que l'ECS se situe en aval de l'action des mélanocortines. Quant au NPY et au CART, des études ont montré de possibles interactions de ces neuropeptides avec l'ECS. L'administration de rimonabant chez des souris dont le gène *Npy* a été délété entraîne toujours une diminution de la prise alimentaire (Di Marzo et al., 2001), alors chez des souris de type sauvage, elle induit l'activation des neurones à NPY et à CART, tout en diminuant l'expression des mRNAs de NPY et en augmentant ceux de CART (Verty et al., 2009). De plus, l'administration de rimonabant chez des souris CART-KO est incapable de réduire la prise alimentaire lors d'un paradigme de refeeding (Osei-Hyiaman et al., 2005). Dans le même temps, l'inactivation de la FAAH, entraînant une augmentation de la concentration hypothalamique d'AEA, diminue la libération de CART ; un effet restauré par l'administration de rimonabant (Osei-Hyiaman et al., 2005). Ces résultats suggèrent qu'il y aurait un lien entre le NPY, le CART et l'ECS et que le blocage simultané de plusieurs voies orexigènes serait nécessaire pour obtenir des effets cliniques favorisant la réduction de la prise alimentaire chez des patients obèses.

Le PVN est l'un des principaux sites d'actions de l'ECS sur la prise alimentaire (Richard et al., 2009). En effet, l'administration de THC dans le PVN augmente la prise alimentaire,

tandis que cet effet est inhibé par le rimonabant (Verty et al., 2005). De plus, l'administration d'AEA dans le PVN augmente également la prise alimentaire ainsi que le RER (Chapman et al., 2012). Le mRNA de CB1R est fortement exprimé au niveau de ce noyau (Marsicano and Lutz, 1999 ; Cota et al., 2003). Certains neurones du PVN projettent leurs axones sur l'hypophyse, laissant supposer un rôle de l'ECS dans la régulation de l'HPA, en exerçant notamment une action rétrograde négative sur la libération des glucocorticoïdes (Di et al., 2003 ; Patel et al., 2004). De plus, la délétion du gène *Cnr1* entraîne une sur-activation de l'HPA, notamment accompagnée d'une augmentation de la libération de corticostérone lors du pic circadien (Cota et al., 2007b). Le PVN projette des axones sur d'autres régions cérébrales, telles que le PBN et le NTS, mais également le CVD et le tronc cérébral où il module l'activité du SNS afin de réguler la prise alimentaire et la dépense énergétique (Hardaway et al., 2015). Cependant, le rôle de l'ECS et des CB1Rs sur ces projections a été très peu étudié. Une étude récente de notre laboratoire a démontré que les CB1Rs au niveau du PVN n'avaient pas d'effet sur la prise alimentaire, mais empêchaient plutôt la dépense énergétique et augmentaient l'adiposité et la résistance à l'insuline, ceci probablement accompagné d'une diminution de la thermogénèse, lors d'une DIO (Cardinal et al., 2015). Ces résultats révèlent une importante dissociation entre le contrôle de la prise alimentaire et la dépense énergétique par les CB1Rs, probablement médiés par les neurones du PVN (Cardinal et al., 2015).

Le VMN est le noyau hypothalamique ayant la plus forte expression de mRNA de CB1R (Herkenham et al., 1991; Marsicano and Lutz, 1999). Une part de ces récepteurs est présente sur les neurones GABAergiques et glutamatergiques corticaux et sous-corticaux projetant leurs axones sur le VMN (Wittmann et al., 2007 ; Reguero et al., 2011), suggérant une modulation de ces neurones par la VMN, qui en réponse influencera notamment le comportement alimentaire des animaux. En effet, l'administration aiguë d'AEA dans le VMN augmente la prise alimentaire ; un effet bloqué par l'administration de rimonabant (Jamshidi and Taylor, 2001). Cependant, malgré la forte expression de CB1R dans le VMN, le fait que le VMN soit connecté à de nombreuses régions cérébrales rend la recherche sur la contribution spécifique de l'ECS dans la régulation de la balance énergétique très compliquée. Une étude récente de notre laboratoire a cependant montré que les CB1Rs du VMN régulent les effets de la leptine sur le métabolisme et servent d'« interrupteur » moléculaire pour l'adaptation de l'organisme à un changement de régime alimentaire (Cardinal et al., 2014). En effet, la délétion du gène *Cnr1* dans les neurones du VMN entraîne une diminution de l'adiposité et une augmentation de la lipolyse par la leptine chez des souris nourries par un régime standard, tandis que cette délétion entraîne une résistance à la leptine, se traduisant par une altération de l'utilisation des lipides et

une augmentation de l'adiposité chez des souris nourries par un régime HFD (Cardinal et al., 2014).

Enfin, dans la LHA, le mRNA de CB1R est également exprimé supposant un rôle de l'ECS dans ce noyau. En outre, CB1R est également présent dans les neurones à MCH et à orexine suggérant que les régions cibles de ces neurones, telles que l'ARC et le PVN, soient des sites potentiels de l'action de l'ECS sur la balance énergétique (Cota et al., 2003). De plus, l'ECS semble également interagir avec la leptine au niveau de la LHA (Jo et al., 2005). En effet, l'activation des CB1Rs entraîne l'activation des neurones à MCH en inhibant l'action des afférences GABAergiques sur ces neurones ; un effet bloqué par la leptine, qui inhibe la synthèse d'endocannabinoïdes au sein des neurones à MCH, supprimant ainsi l'activation des CB1Rs (Jo et al., 2005). Enfin, les endocannabinoïdes semblent inhiber les neurones à orexine (Huang et al., 2007). Ainsi, l'ECS semble être également impliqué dans la régulation de l'activité des neurones au niveau de la LHA. L'ECS est donc un des acteurs majeurs de la régulation de la balance énergétique. Il est capable de réguler différents neurotransmetteurs impliqués dans cette régulation, notamment au niveau hypothalamique. Cependant, les études réalisées à ce jour ne permettent pas d'identifier clairement les acteurs et les mécanismes mis en jeu par l'ECS au niveau du CNS dans la régulation de la prise alimentaire et la dépense énergétique.



## **Problématiques et objectifs**

L'hypothalamus est une structure cérébrale ayant un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire, en faisant notamment intervenir les neurones à POMC de l'ARC, qui régulent la balance énergétique, classiquement en diminuant la prise alimentaire et le poids corporel. mTORC1 est une voie de signalisation intracellulaire agissant comme un détecteur d'énergie au sein de la cellule. Au niveau de l'hypothalamus, mTORC1 intègre les effets intracellulaires des nutriments et des hormones impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Cependant très peu d'études ont été menées quant au rôle exact de mTORC1 dans la modulation de l'activité des neurones à POMC. D'autre part, les neurones à POMC ne produiraient pas seulement des neuropeptides dérivants du clivage de POMC, mais seraient également capables de libérer du glutamate ou du GABA, voire les deux, et que la nature de leur neurotransmetteur pourrait être importante dans le contexte de la prise alimentaire. Enfin, dans le CNS, les endocannabinoïdes agissent de façon rétrograde au niveau des CB1Rs, généralement afin de réduire la libération des neurotransmetteurs. L'activité de l'ECS est considérée comme un signal orexigène puissant, mais cet effet dépendrait du type neuronal, glutamatergique ou GABAergique, exprimant le CB1R. Cependant, l'action des CB1Rs sur la libération de neurotransmetteurs des neurones à POMC et l'implication de ces effets sur la prise alimentaire sont inconnus à ce jour.

Le principal objectif de ce travail de thèse a donc été de définir le rôle fonctionnel de mTORC1 et de l'ECS dans la régulation de l'activité et la fonction des neurones à POMC dans la régulation de la prise alimentaire, en utilisant des approches génétiques, pharmacologiques, électrophysiologiques et moléculaires.

Pour cela, il s'est agi :

- 1- de vérifier la distribution des neurones à POMC en trois sous-populations selon le type de neurotransmetteurs qu'ils libèrent : glutamatergiques, GABAergiques ou mixtes.
- 2- d'établir le rôle relatif joué par mTORC1 dans la modulation de l'activité des neurones à POMC et de son impact sur la prise alimentaire.
- 3- d'élucider dans quelle mesure l'ECS est impliqué dans ces effets, notamment en étudiant la relation de causalité avec mTORC1 et son action sur l'activité et la fonction des neurones à POMC.

Etant donné le rôle joué par la voie de mTORC1 dans la régulation de la fonction des neurones à POMC mis en évidence lors du point 2, le deuxième objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer le rôle potentiel de l'autophagie, un mécanisme cellulaire en aval de mTORC1, sur l'activité neuronale et la fonction des neurones à POMC. En effet aussi bien le jeûne ou la RAPA inhibent la voie de mTORC1 et activent l'autophagie (Laplante and Sabatini, 2012).

Pour cela, il s'est agi :

- 4- d'établir le phénotype d'animaux dépourvues d'une voie de mTORC1 fonctionnelle dans les neurones à POMC en supprimant p62/SQSTM1, qui active mTORC1 et inhibe l'autophagie.
- 5- de caractériser l'impact de la suppression de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC sur le métabolisme de ces animaux.
- 6- de préciser l'impact de l'inhibition de l'autophagie sur la morphologie des neurones à POMC.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la partie suivante sous la forme :

- d'un premier article, soumis pour publication (points 1 à 3)
- d'un second article en préparation dont les expériences complémentaires sont en cours (points 4 à 6)

Une courte discussion suit systématiquement la présentation de chacun de ces travaux, dans laquelle sont abordés les points qui n'ont pas été débattus dans le manuscrit correspondant.

Enfin, une discussion générale nous permet dans une dernière partie de remettre ces travaux dans un contexte plus global et de terminer par quelques remarques de conclusion.



# Etude I



## **mTORC1 et l'ECS contrôlent deux sous-populations de neurones à POMC, régulant la prise alimentaire de façon opposée**

### **Contexte de l'étude**

La prise alimentaire chez les mammifères est régulée par des réseaux de neurones complexes, dont les mécanismes d'action sont encore à ce jour mal connus. L'hypothalamus est une structure cérébrale ayant un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire. Parmi les différentes populations neuronales qui le composent, les neurones à POMC sont classiquement connus pour diminuer la prise alimentaire et le poids corporel via la libération de neuropeptides produits par le clivage de POMC.

mTORC1 est une voie de signalisation intracellulaire agissant comme un détecteur d'énergie au sein de la cellule, notamment au niveau de l'hypothalamus, où elle intègre les effets intracellulaires des nutriments et des hormones impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Cependant très peu d'études ont été menées quant au rôle exact de mTORC1 dans la modulation de l'activité des populations neuronales hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire.

D'autre part, la capacité des neurones à POMC à réguler la prise alimentaire pourrait ne pas dépendre uniquement de la production des neuropeptides dérivants du clivage de POMC, mais aussi être liée à la libération de neurotransmetteurs. Des études suggèrent que les neurones à POMC seraient à la fois GABAergiques et glutamatergiques, voire les deux, et que la nature de leur neurotransmetteur pourrait être importante dans le contexte de la prise alimentaire.

Enfin, dans le CNS, les endocannabinoïdes agissent de façon rétrograde au niveau des CB1Rs, généralement afin de réduire la libération des neurotransmetteurs. L'activité de l'ECS est considérée comme un signal orexigène puissant, mais des données récentes montrent que cet effet dépend du type neuronal exprimant le CB1R. L'activation des CB1Rs sur les neurones GABAergiques, en réduisant la libération de GABA, entraîne une hypophagie. A l'inverse, l'activation des CB1Rs sur les neurones glutamatergiques, en réduisant la libération de glutamate, augmente la prise alimentaire. Cependant, l'action des CB1Rs sur la libération de neurotransmetteurs des neurones à POMC et l'implication de ses effets sur la prise alimentaire sont inconnus à ce jour.

## **But de l'étude et approches**

Nous avons cherché à identifier la contribution relative de mTORC1 et de l'ECS dans la régulation de l'activité et la fonction des neurones à POMC dans la régulation de la prise alimentaire chez la souris.

Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, vérifié la distribution des neurones à POMC en trois sous-populations selon le type de neurotransmetteurs qu'ils libèrent, grâce à des expériences de séquençage des RNAs en cellule unique en collaboration avec l'équipe du Pr. Tibor Harkany (University of Vienna, Austria). Cette technique permet le séquençage du transcriptome entier d'une cellule unique à un moment donné et renseigne sur l'identité et la quantité des mRNAs qui seront ensuite traduits en protéines.

Nous avons, dans un second temps, testé le rôle de la voie de mTORC1 dans la modulation de l'activité des neurones à POMC en enregistrant leur fréquence de décharge lors de l'application d'un bain de l'inhibiteur de mTOR, la rapamycine (RAPA ; 200 nM). Nous avons également étudié l'impact de la RAPA sur la transmission synaptique des neurones à POMC spécifiquement sur les neurones parvocellulaires du PVN par une approche optogénétique (enregistrement des courants post-synaptiques évoqués). L'idée fondamentale de ces approches électrophysiologiques, réalisées par mon collègue le Dr. Wilfrid Mazier, est d'établir si mTORC1 est capable de moduler l'activité des neurones à POMC, et ainsi des neurones parvocellulaires du PVN, qui jouent un rôle clé dans la détermination de la réponse de satiété induite par le système mélanocortine hypothalamique. En outre, nous avons testé la nécessité du rôle de mTORC1 dans la modulation de l'activité des neurones à POMC et de la réponse alimentaire associée par l'administration centrale de RAPA (25 µg/1 µL de DMSO) lors d'un paradigme de « refeeding » chez la souris, qui permet d'étudier spécifiquement l'action des neurones à POMC sur le PVN (Singru et al., 2007 ; Sanchez et al., 2008), puisque les neurones à AgRP sont inactivés (Riediger et al., 2004 ; Becskei et al., 2009), ainsi que par l'utilisation d'approches génétiques et pharmacogénétiques.

Dans un troisième et dernier temps, nous avons évalué l'implication de l'ECS dans ces effets, en mesurant, tout d'abord, par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, les niveaux hypothalamiques d'endocannabinoïdes après administration centrale de RAPA chez la souris. Nous avons également utilisé une approche pharmacogénétique afin d'établir un possible lien de causalité entre l'inhibition de la voie mTORC1 et l'activation de l'ECS associée à une hyperphagie. Enfin, nous avons étudié l'action de l'ECS sur les neurones à POMC dans la modulation de la prise alimentaire chez des souris

mutantes par l'administration coordonnée de RAPA et de picrotoxine (Ptx), un inhibiteur des récepteurs GABA<sub>A</sub>.

## Résultats

Notre étude remet en question les notions classiques sur la fonction des neurones à POMC dans la balance énergétique, en démontrant qu'il existe au moins deux sous-populations fonctionnellement distinctes de neurones à POMC, qui augmentent ou diminuent la prise alimentaire en fonction du neurotransmetteur qu'elles libèrent, le GABA ou le glutamate. La régulation de l'activité de ces deux sous-populations de neurones dépend de la voie de mTORC1, qui fonctionne comme un détecteur d'énergie cellulaire, et de l'ECS, qui régule la libération de neurotransmetteurs.

Le séquençage des RNAs en cellule unique a permis de vérifier l'existence d'une hétérogénéité des neurones à POMC au sein de l'hypothalamus. En effet, nous démontrons qu'il existe trois sous-populations distinctes caractérisées selon la nature des neurotransmetteurs qu'elles libèrent : glutamatergique, GABAergique ou mixte. Nos études d'électrophysiologie ont démontré que l'inhibition de mTORC1 ne module pas uniformément l'excitabilité des neurones à POMC, puisque la RAPA inhibe les neurones à POMC de type glutamatergique, tandis qu'elle active les neurones à POMC de type GABAergique.

Par ailleurs, nous avons montré que mTORC1 est activé dans les neurones à POMC lors d'un paradigme de « refeeding » et que l'administration centrale de RAPA entraîne une hyperphagie, qui nécessite une voie de mTORC1 fonctionnelle dans ces neurones. L'hyperphagie induite par la RAPA est médiée par la diminution des niveaux du peptide anorexigène  $\alpha$ -MSH (produit du clivage de POMC) et par l'augmentation de l'endocannabinoïde orexigène AEA.

En outre, l'activation spécifique des neurones à POMC, en utilisant l'outil pharmacogénétique dit « designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD) », ainsi que le rétablissement de la signalisation mélanocortine par le MTII, un analogue de l' $\alpha$ -MSH, bloque les effets comportementaux et moléculaires de la RAPA démontrant un lien de causalité entre l'activation de neurones à POMC, l'activation de la voie de mTORC1 et la réponse de satiété. Ces expériences confirment également que le recrutement du système mélanocortine est en amont de la synthèse d'AEA, puisque l'activation spécifique des neurones à POMC par le DREADD ainsi que l'administration de MTII bloquent l'augmentation de la production hypothalamique d'AEA induite par la RAPA.



Enfin, la délétion de CB1R dans les neurones à POMC démontre que le CB1R exprimé par les neurones à POMC de type GABAergique détermine l'amplitude de l'hyperphagie induite par la RAPA.

Ces résultats ont de multiples répercussions :

- en démontrant l'existence de deux sous-populations fonctionnellement distinctes de neurones à POMC, régissant la prise alimentaire de façon opposée.
- en identifiant l'implication de deux voies de signalisation interconnectées : mTORC1 et l'ECS, dans la modulation de l'activité et la fonction des neurones à POMC, et ainsi dans la régulation de la prise alimentaire.
- en remettent en question les notions classiques sur la fonction des neurones à POMC dans la balance énergétique.

## **Bidirectional control of food intake by hypothalamic POMC neurons**

Nicolas Saucisse<sup>1,2,6</sup>, Wilfrid Mazier<sup>1,2,6</sup>, Caterina Catania<sup>1,2</sup>, Elke Binder<sup>1,2</sup>, Luigi Bellocchio<sup>1,2</sup>, Roman A. Romanov<sup>3</sup>, Astrid Cannich<sup>1,2</sup>, Vincent Simon<sup>1,2</sup>, Isabelle Matias<sup>1,2</sup>, Kana Meece<sup>4</sup>, Delphine Gonzales<sup>1,2</sup>, Samantha Clark<sup>1,2</sup>, Sharon L. Wardlaw<sup>4</sup>, Tibor Harkany<sup>3,5</sup>, Federico Massa<sup>1,2</sup>, Giovanni Marsicano<sup>1,2</sup>, Daniela Cota<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, U1215, F-33000 Bordeaux, France; <sup>2</sup>University of Bordeaux, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, U1215, F-33000 Bordeaux, France; <sup>3</sup>Department of Molecular Neurosciences, Center for Brain Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; <sup>4</sup>Department of Medicine, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, 10032NY, United States; <sup>5</sup>Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

<sup>6</sup>These authors share first authorship

**\*Correspondence:** e-mail: [daniela.cota@inserm.fr](mailto:daniela.cota@inserm.fr)

## Summary

Hypothalamic Pro-opiomelanocortin (POMC) neurons classically promote satiety. However, POMC neurons belong to heterogeneous subpopulations, whose specific functions are unknown. This study demonstrates that two phenotypically distinct POMC neurons subpopulations oppositely regulate feeding in mice. Single-cell RNA-sequencing reveals that POMC neurons have heterogeneous neurotransmitter profiles, being glutamatergic, GABAergic or both in nature. Pharmacological blockade of mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) inhibited and activated glutamatergic and GABAergic POMC neurons, respectively. Optogenetic stimulation showed that mTORC1 signaling determines POMC neurons-mediated excitation or inhibition of parvocellular neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. Use of designer-receptors-exclusively-activated-by-designer-drugs (DREADD) and conditional deletion of mTORC1 demonstrated that mTORC1 blockade in POMC neurons induces hyperphagia. Decrease of POMC-derived anorexigenic  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone and recruitment of endocannabinoid-CB<sub>1</sub> signaling mediated the hyperphagia induced by mTORC1 blockade. Altogether, these findings pinpoint the molecular mechanisms engaged by POMC neurons to antagonistically drive feeding, thereby challenging classic notions about their functions.

## Introduction

Food intake is a highly complex behavior controlled by the coordinated action of different of neural circuits containing specialized neuronal cell subtypes. Within the hypothalamus, two neuronal populations located in the arcuate nucleus (ARC) have been recognized to play a key role in the regulation of feeding. These two populations respectively express the neuropeptides Agouti-related peptide (AgRP) and Pro-opiomelanocortin (POMC) and are known to oppositely control food intake and body weight (Cone, 2005; Koch and Horvath, 2014; Gautron et al., 2015). Specifically, AgRP neurons are activated by energy deficit (Hahn et al., 1998) and promote food seeking and intake through the release of AgRP as well as of Neuropeptide Y (NPY) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) (Fan et al., 1997; Ollmann et al., 1997; Tong et al., 2008). In turn, POMC neurons are activated by energy availability and classically promote satiety and body weight loss (Boston et al., 1997; Fan et al., 1997; Cowley et al., 2001). In virtue of their opposite action onto melanocortin receptors, these two neuronal types form the melanocortin system (Cone, 2005; Koch and Horvath, 2014; Gautron et al., 2015), and are responsive to a wide array of nutrient and hormonal signals related to both the short- and long-term energy availability in the organism. Thus, the melanocortin system provides a model of how energy changes are integrated in the brain to control feeding (Cota et al., 2007; Williams and Elmquist, 2012). Recent evidence also suggests that AgRP and POMC neurons are able to match the organism's energy needs to contextual information, since the sensory detection of food occurring before food consumption is sufficient to rapidly inhibit AgRP neurons and activate POMC neurons (Chen et al., 2015). Consistent with this evidence, refeeding after a fast is associated with increased activity of POMC neurons (evaluated by c-Fos immunoreactivity), which in turn regulate meal size (Singru et al., 2007; Fekete et al.,

2012). However, the molecular underpinnings of such response have not been unambiguously identified.

Intracellular fuel sensing pathways, whose activity relies on the level of energy available in the cell, have been implicated in the regulation of energy balance (Cota et al., 2007; Blouet and Schwartz, 2010; Lopez et al., 2016). Among these, the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway, which controls cellular growth and metabolism (Laplante and Sabatini, 2012), integrates the actions of hormones and nutrients in the hypothalamus to regulate feeding behavior (Cota et al., 2006; Blouet et al., 2008; Dagon et al., 2012). Hypothalamic mTORC1 activity varies as a function of both cell type and the stimulus employed (Villanueva et al., 2009). However, whether mTORC1 plays a role in matching energy availability with POMC neuronal activity remains unknown.

The ability of POMC neurons to regulate food intake might not solely depend on neuropeptides produced from the cleavage of POMC (Wardlaw, 2011), but also on the neurotransmitters they release. Differently from AgRP neurons which are GABAergic (Collin et al., 2003; Tong et al., 2008), neuroanatomical and electrophysiological studies suggest that POMC neurons are heterogeneous, and include both GABAergic and glutamatergic cells (Hentges et al., 2004; Hentges et al., 2009; Dicken et al., 2012; Jarvie and Hentges, 2012; Wittmann et al., 2013). Whether POMC neurons might exert different actions in the regulation of feeding behavior depending on the neurotransmitter they release is virtually unexplored.

GABAergic and glutamatergic neurotransmission are regulated by specific mechanisms in the brain, including hypothalamic areas interested by POMC and AgRP neurons. Among these, the retrograde suppression of neurotransmitter release exerted by endocannabinoids acting at the presynaptic cannabinoid type 1 (CB<sub>1</sub>) receptor is a

well described one (Kano et al., 2009). CB<sub>1</sub> activation also generally stimulates food intake (Mazier et al., 2015), although recent evidence demonstrates that this effect is neurotransmitter-type specific, with CB<sub>1</sub> on GABAergic terminals exerting a hypophagic action while CB<sub>1</sub> modulating glutamatergic neurotransmission induces the well-known hyperphagia (Bellocchio et al., 2010). Whether CB<sub>1</sub> on all or phenotypically-segregated subsets of POMC neurons might affect feeding responses through the modulation of neurotransmitter release is not known.

In this study, we addressed the physiological role of POMC neurons. Using pharmacological, genetic, chemogenetic, electrophysiological, and optogenetic approaches, we found that mTORC1 and CB<sub>1</sub> signaling are engaged in POMC neurons to regulate feeding, allowing the functional characterization of a POMC GABAergic neuronal subpopulation that drives feeding and of a POMC glutamatergic subpopulation that inhibits feeding. POMC neurons therefore exert a bimodal control on food intake, a finding that challenges classic notions about the role of POMC neurons as drivers of satiety.

## **Results**

### ***POMC neurons have a heterogeneous neurotransmitter profile***

Some electrophysiological and neuroanatomical evidence suggests that POMC neurons include cells that produce GABA, glutamate or both GABA and glutamate (Hentges et al., 2009; Dicken et al., 2012; Jarvie and Hentges, 2012; Wittmann et al., 2013). In order to align POMC neurons to GABA, glutamate or mixed subpopulations, we analyzed single cell RNA sequencing data (GEO: GSE74672) on POMC neurons from the hypothalamus of young adult mice (see Supplemental Experimental Procedures) by means of differential expression profiling (Figure 1). In order to verify

the distribution of POMC neurons in these three subpopulations, we performed single cell RNA sequencing on POMC neurons from the hypothalamus of young adult mice (see Supplemental Experimental Procedures). Of the 28 POMC cells examined, 7 expressed *Slc17a6*, coding for the glutamatergic marker vesicular glutamate transporter 2 (vGLUT2); 11 were positive for *Gad1* and *Gad2*, coding for the GABA synthesizing enzymes GAD67 and GAD65, respectively, and 10 were positive for both glutamatergic and GABAergic markers (Figure 1). Interestingly, 2 out of 11 POMC GABA neurons were also positive for *Npy* and *Npy* and *Agrp*, respectively, suggesting that a small proportion of GABAergic neurons co-express these orexigenic neuropeptides. Each POMC subpopulation was characterized by a specific gene expression profile (Figure 1 and Figure S1). Further gene expression analysis carried out comparing POMC GABAergic and POMC glutamatergic subpopulations demonstrated that these 2 groups of cells are substantially different (Table 1). In particular, POMC GABAergic neurons were enriched in the expression of genes regulating glucose and lipid metabolism as well as protein transcription and catabolism (Table 1). Conversely, POMC glutamatergic neurons showed increased expression of genes involved in synaptic vesicular function, purine metabolism and GTP signaling (Table 1). Thus, POMC hypothalamic neurons display heterogeneous neurochemical properties and belong to different subpopulations, whose specific functions are unknown. Regardless of their neurotransmitter identity, molecular determinants of mTORC1 and endocannabinoid signaling were expressed in all POMC neurons.

## ***Neuronal type-dependent modulation of POMC neurons activity by mTORC1 signaling***

To address the specific roles of distinct POMC neuronal subpopulations, we asked whether the mTORC1 pathway might differentially modulate them. First, we monitored their neuronal activity in hypothalamic slices under basal conditions and after the bath application of the mTOR inhibitor rapamycin (RAPA, 200 nM).

Taken all cell responses together, RAPA had no clear effect on firing frequency (Figures S2A and S2B, n=72). However, in agreement with the single cell RNA sequencing results, individual Z-score analysis allowed distinguishing three POMC neuronal populations that responded differently to RAPA: (i) POMC neurons activated by RAPA (RAPA<sup>act</sup>, Figures 2A-2B, n=20/72, 28%), (ii) POMC neurons inhibited by RAPA (RAPA<sup>inh</sup>, Figures 2A-2C, n=26/72, 36%), and (iii) POMC neurons where RAPA had no significant effect on firing (RAPA<sup>ns</sup>, Figure 2A-D, n=26/72, 36%). We then further characterized the two POMC cell populations that were oppositely regulated by RAPA. The treatment modified POMC cell excitability by changing the membrane potential ( $E_m$ ), with RAPA<sup>act</sup> POMC cells being depolarized and RAPA<sup>inh</sup> POMC cells being hyperpolarized (Figure S2C). RAPA<sup>act</sup> POMC neurons had higher membrane resting potential (Figure 2E) and a lower membrane capacitance ( $C_m$ ) than RAPA<sup>inh</sup> POMC cells (Figure 2F). An inverse correlation was found between the recorded cell  $C_m$  and the firing changes induced by RAPA (Figure 2G). RAPA<sup>act</sup> POMC neurons also showed higher membrane resistance (Figure 2H) and tended to have higher basal firing frequency than RAPA<sup>inh</sup> POMC cells (Figure S2D).

$C_m$  is considered an indicator of cell size (Hentges et al., 2009) and previous neuroanatomical studies have described a size discrepancy within ARC POMC neurons. Relatively smaller size was the most reliable marker of POMC GABAergic



neurons (Hentges et al., 2004; Hentges et al., 2009). Thus, based on the cell size (Figure 2F), we hypothesized that RAPA<sup>act</sup> POMC neurons were GABAergic. To confirm this hypothesis, recorded neurons were filled with biocytin and subsequently labelled with an antiserum directed against the GABAergic marker GAD65/67. After confocal image acquisition and 3D image reconstruction, RAPA<sup>act</sup> POMC neurons had significantly more GAD65/67 staining than RAPA<sup>inh</sup> POMC neurons (Figures 2I). GAD65/67 staining also strongly inversely correlated with the Cm of the analyzed cells (Figure 2J-K), implying that small POMC cells activated by RAPA were more likely to be GABAergic.

We then addressed the main synaptic target of POMC neurons. The hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), and especially its parvocellular part, receive projections from POMC neurons located in the ARC and plays a key role in determining the satiety response induced by hypothalamic melanocortin signaling (Balthasar et al., 2005; Singru et al., 2007; Singru et al., 2012). Thus, using an optogenetic approach, we studied whether the different POMC neurons subpopulations that we identified projected onto this brain area and whether the rapid inhibition of mTORC1 signaling could alter POMC neurons transmission onto PVN parvocellular neurons (Figure 3).

Using the FLEX system (Atasoy et al., 2008) in POMC-Cre neurons [Tg(Pomc1-cre)<sup>16Lowl/J</sup>, JAX Stock #005965, The Jackson Laboratory, USA; (Balthasar et al., 2004; Zhan et al., 2013)], we expressed the photoactivable channelrhodopsin ChR2 in this neuronal population (Atasoy et al., 2008). We recorded light-evoked POMC synaptic input onto parvocellular neurons. About 1 over 10 parvocellular neurons were synaptically connected to terminals arising from infected POMC neurons (31/321 cells; 9.66%). Pharmacological assays onto light-evoked synaptic transmission were performed in a total of 17 parvocellular cells. A majority of the POMC terminals

connecting onto parvocellular neurons released pure glutamatergic inputs (58.82%; 10/17); part of the recorded parvocellular cells also received pure GABAergic (17.65%; 3/17) or mixed Glutamate/GABA inputs (23.53%; 4/17) (Figures 3A and 3B). To test the implication of mTORC1 signaling in the control of neurotransmitter release from POMC terminals onto parvocellular neurons, we challenged light-evoked excitatory post-synaptic currents (eEPSCs) by adding RAPA in the perfusion bath. We observed that acute inhibition of the mTORC1 pathway significantly reduced light-evoked eEPSCs amplitude (Figures 3C and 3D,  $-17.88 \pm 2.948\%$ ;  $n=6$ ,  $p<0.0001$ ). Conversely, when RAPA was added while recording light-evoked inhibitory post-synaptic currents (eIPSCs), it significantly increased eIPSCs amplitude (Figures 3C and 3E,  $+9.22 \pm 3.042\%$ ;  $n=5$ ,  $p=0.01$ ).

Altogether these results pinpoint the existence of at least two functionally distinct subpopulations of POMC neurons that are oppositely regulated by the mTORC1 pathway and that converge onto the PVN, a structure critically involved in determining the action of melanocortins on food intake (Balthasar et al., 2005). Therefore, we went on to assess the role of the mTORC1 pathway in determining food intake under conditions known to classically engage hypothalamic POMC neurons, such as refeeding (Singru et al., 2007; Fekete et al., 2012).

### ***Recruitment of the mTORC1 pathway in POMC neurons during refeeding determines food intake***

To test the relevance of the mTORC1 pathway in modulating POMC neuronal activity and related feeding responses, we acutely inhibited mTORC1 by centrally (icv) delivering RAPA just before allowing 24-h fasted animals to access food. In refeed mice, RAPA administration decreased activation of c-Fos expression in POMC cells,

indicating reduced neuronal activation (Figures 4A and 4B), and it diminished phosphorylation of the ribosomal S6 protein (p-S6), a downstream target of mTORC1 (Laplante and Sabatini, 2012), in activated (i.e. c-Fos positive) POMC neurons (Figures 4A and 4C). In parallel, RAPA caused hyperphagia during the first 2 hours of refeeding (Figure 4D).

To assess whether mTORC1 signaling in POMC neurons is specifically required for RAPA-induced hyperphagia, we generated conditional knockout (KO) mice lacking the protein raptor, necessary for functional mTORC1 assembly (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002), in POMC neurons, thereafter called POMC-*Raptor*-KO mice (Figures S3A and S3B). Central administration of RAPA induced hyperphagia in WT littermates, but not in POMC-*Raptor*-KO (Figure 4E). In contrast, RAPA administered to conditional mutant mice lacking the protein rictor [required for functional mTORC2 formation (Sarbasov et al., 2004)] in POMC neurons (POMC-*Rictor*-KO mice, Figure S3C and S3D) still retained its hyperphagic effect (Figure 4F). Thus, RAPA causes hyperphagia by specifically targeting mTORC1 activity in POMC neurons.

To confirm that activation of POMC neurons and consequent recruitment of mTORC1 activity could prevent RAPA-induced hyperphagia, we induced chemogenetic activation of POMC neurons using the DREADD (designer-receptors-exclusively-activated-by-designer-drugs) method. The gene encoding the evolved human M3-muscarinic receptor fused to the fluorescent protein mCherry (hM3Dq-mCherry) was selectively expressed in POMC neurons by injecting a Cre-inducible adeno-associated viral vector (AAV-hM3Dq-mCherry) into the ARC of POMC-Cre mutants to obtain POMC-ARC<sup>hM3Dq</sup> mice (Atasoy et al., 2008; Zhan et al., 2013). POMC neurons were activated in these mice by systemic administration of the hM3Dq ligand clozapine-N-oxide (CNO). As expected, administration of CNO to POMC-ARC<sup>hM3Dq</sup> mice induced

strong c-Fos expression in mCherry-positive POMC neurons, accompanied by an important increase in p-S6 expression (Figures S3E-S3G). Repeated administration of CNO over a few days decreased food intake (Figure S3H), as already described by others (Zhan et al., 2013). As already described by others (Zhan et al., 2013), repeated administration of CNO over a few days decreased food intake (Figure S3H). In contrast, acute injection of CNO did not affect fasting-induced food intake in POMC- $ARC^{hM3Dq}$  mice (Figure 4G). However, when CNO was combined with the administration of RAPA, it completely prevented the effects of RAPA on food intake (Figure 4G). As expected, CNO administration was unable to prevent RAPA-induced hyperphagia in wild-type (i.e. not expressing Cre in POMC-positive neurons) mice intra-ARC injected with  $ARC^{hM3Dq}$ -mCherry (Figure 4H). Thus, acute activation of POMC neurons in the ARC fully compensate for hyperphagia induced by inhibition of mTORC1.

### **mTORC1 blockade causes hyperphagia by promoting fasting-like changes in hypothalamic $\alpha$ -MSH and endocannabinoids levels**

POMC is a precursor protein that must be cleaved to generate active peptides, which in turn affect food intake [Figure 5A and (Wardlaw, 2011)]. To evaluate whether blockade of the mTORC1 pathway could cause hyperphagia by altering the levels of POMC or of its products, we measured hypothalamic content of the POMC peptide, its processing intermediates and its cleavage products in 24-h fasted and 2-h refeed mice treated with vehicle or RAPA. Neither POMC itself nor its initial cleavage product adrenocorticotrophic hormone (ACTH) was altered by RAPA or refeeding (Table S1). However, hypothalamic levels of the anorectic peptide  $\alpha$ -MSH were increased after 2-h refeeding relative to fasting, and RAPA treatment completely prevented this increase

(Figure 5B). Of note,  $\alpha$ -MSH is implicated in determining satiety responses after a fast (Singru et al., 2007; Singru et al., 2012).  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ -EP) also had parallel, albeit non-significant, changes in response to refeeding and to RAPA (Table S1). When we calculated ratios of  $\alpha$ -MSH/POMC,  $\alpha$ -MSH/ACTH and  $\alpha$ -MSH/ $\beta$ -EP, a significant relative reduction in hypothalamic  $\alpha$ -MSH was found in refed, RAPA-treated mice (Figures 5C-5E). Thus, inhibiting the mTORC1 pathway specifically decreases hypothalamic  $\alpha$ -MSH levels, an effect that could in turn participate in the observed hyperphagia.

Endocannabinoid-dependent CB<sub>1</sub> signaling has been suggested to be downstream the actions of melanocortins and to play a role in opposing  $\alpha$ -MSH effects on food intake, particularly within the PVN (Verty et al., 2004; Monge-Roffarello et al., 2014). We therefore reasoned that changes in  $\alpha$ -MSH levels could be accompanied by opposite changes in endocannabinoid levels. Accordingly, we found that fasting enhanced hypothalamic levels of the endocannabinoid anandamide (AEA), while refeeding dampened them (Figure 5F). RAPA icv administration abolished the refeeding-induced decrease of hypothalamic AEA, maintaining this endocannabinoid at fasting-like levels (Figure 5F). RAPA had no effect on the hypothalamic or extra-hypothalamic content of the other main endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) or on extra-hypothalamic levels of AEA, independently of the feeding status of the mice (Figure 5G and Table S1). Thus, acute inhibition of mTORC1 signaling decreases hypothalamic  $\alpha$ -MSH while enhancing AEA levels. To determine whether these events were causally linked, we combined the central administration of RAPA with the stable  $\alpha$ -MSH analog MTII, used at a dose that did not have any effect on food intake or on hypothalamic AEA levels *per se* (0.02  $\mu$ g, icv, Figures S4A and S4B). During refeeding, MTII administration blocked the effect of RAPA on hypothalamic AEA levels (Figure

5H). Similarly, chemogenetic activation of POMC neurons prevented RAPA effect on hypothalamic AEA levels (Figure 5I). Hence, re-establishment of melanocortin signaling precludes RAPA-induced increase of AEA levels, indicating that  $\alpha$ -MSH and mTORC1 pathways oppositely regulate the activity of the endocannabinoid system in the hypothalamus.

### ***CB<sub>1</sub>-dependent signaling affects food intake by regulating GABA release from POMC neurons***

Consequently, to test whether the hyperphagia observed after RAPA administration might be due to increased endocannabinoid signaling. To test this hypothesis, we combined the central administration of RAPA with a sub-anorectic dose of the CB<sub>1</sub> antagonist Rimonabant (Rimo), which fully blocked the effect of RAPA on fasting-induced food intake (Figure 6A). Similarly, RAPA caused hyperphagia in WT mice, but not in CB<sub>1</sub>-KO littermates (Figure 6B). These data confirm the involvement of the endocannabinoid system in the hyperphagia upon blockade of mTORC1 signaling. Anatomical data suggest that ARC neurons express negligible levels of CB<sub>1</sub> receptors as compared to other brain regions (Marsicano and Lutz, 1999). However, studies on the endocannabinoid system recently revealed that even levels of CB<sub>1</sub> receptors at the limit of detection can have important functional relevance (Monory et al., 2006; Han et al., 2012). Thus, to test whether CB<sub>1</sub> receptors expressed in POMC are directly responsible of mTORC1-dependent endocannabinoid actions, we generated mice lacking CB<sub>1</sub> in POMC neurons, thereafter called POMC-CB<sub>1</sub>-KO. These animals showed a specific deletion of CB<sub>1</sub> in POMC neurons (Figures 6C and 6D), while expression of CB<sub>1</sub> was preserved in AgRP neurons (Figures S5A and S5B). We then evaluated the ability of an acute central administration of RAPA to modulate food intake

in POMC- $CB_1$ -KO mice and wild-type littermates (POMC- $CB_1$ -WT). As expected, RAPA caused hyperphagia in POMC- $CB_1$ -WT mice (Figure 6E). Deletion of  $CB_1$  from POMC neurons had no effect *per se* on food intake. Interestingly, however, POMC- $CB_1$ -KO displayed a significantly amplified effect of RAPA on food intake, implying that  $CB_1$  receptors on POMC neurons might actually inhibit food intake (Figure 6E). Past work from our laboratory has demonstrated that while activation of  $CB_1$  on glutamatergic neurons increases food intake, its activation on GABAergic neurons decreases food intake (Bellocchio et al., 2010), likely in the hypothalamus (Soria-Gomez et al., 2014). Thus, the RAPA-induced activation of POMC GABAergic cells (Figure 2) might be under the direct negative control of  $CB_1$  receptors. In this context, deletion of  $CB_1$  in POMC neurons would induce an excess liberation of GABA from synaptic terminals, thereby causing the hyperphagia under inhibition of mTORC1. Accordingly, a sub-effective dose [i.e. unable to affect food intake when administered alone (0.03  $\mu$ g/ $\mu$ l icv, see Figures S5C and S5D)] of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin (Ptx), blocked the excessive RAPA-induced hyperphagia observed in POMC- $CB_1$ -KO mice, reducing their food intake to that of RAPA-treated POMC- $CB_1$ -WT littermates (Figure 6E). Thus,  $CB_1$  on POMC GABAergic neurons determines the magnitude of the hyperphagia caused by mTORC1 blockade.

Collectively, these data demonstrate that modulation of mTORC1 activity in POMC neurons critically controls POMC neuronal functions and related feeding responses by regulating POMC neurons neurotransmission and melanocortin signaling.

## **Discussion**

Studies during the past 60 years have clearly demonstrated the key role of the hypothalamic melanocortin system in the regulation of food intake. These studies,

while delineating the functions of AgRP and POMC neurons in the context of energy balance, have also led to the widespread assumption that POMC neurons unvaryingly control the cessation of feeding. Here we have used a multidisciplinary approach to investigate the regulation of POMC neuronal activity during fast-induced food intake. These experiments have revealed that at least two POMC neuronal populations, one GABAergic, the other glutamatergic, are under the control of the mTORC1 pathway and CB<sub>1</sub> receptor signaling and that they antagonistically affect feeding responses. During food consumption, mTORC1 signaling is recruited in POMC glutamatergic and GABAergic neurons. This leads to increased POMC glutamatergic and decreased POMC GABAergic neurotransmission, respectively associated with stimulation of  $\alpha$ -MSH secretion and inhibition of endocannabinoid-CB<sub>1</sub> receptor signaling, leading to the termination of the meal. When mTORC1 signaling is inhibited, like under conditions of energy deficit (Laplante and Sabatini, 2012), the activation of POMC GABAergic neurons is facilitated, whereas POMC glutamatergic and melanocortin signaling are inhibited, and the recruitment of endocannabinoid signaling acts eventually as a break on feeding behavior, overall increasing food intake. Collectively, these findings therefore uncover a more complex and dynamic role for POMC neurons in the control of food intake than it has been appreciated to date.

Previous studies had actually suggested that at least 3 subpopulations of POMC neurons can be distinguished based on the type of neurotransmitter released (Dicken et al., 2012; Jarvie and Hentges, 2012; Wittmann et al., 2013). Our data provide functional significance to this long overlooked information, offering evidence for an opposite role of POMC glutamatergic and POMC GABAergic subpopulations in the regulation of food intake. Our transcriptomic profiling show that POMC glutamatergic and POMC GABAergic cells have specific characteristics, giving important insight into



the cell biology that characterizes these two subpopulations. Biological specificity holds true also for the mixt GABA/glutamatergic population that we have identified, which is unresponsive to RAPA and whose functions are currently unknown. It has been proposed that the proportion of POMC glutamatergic and POMC GABAergic neurons varies with age (Dennison et al., 2016). In this context, the third GABA/glutamatergic population may be indicative of a switch in neurotransmitter phenotype over time as well as representing another way for POMC neurons to fine-tune their actions on target circuits. It is also noteworthy to point out that the heterogeneity in neurotransmitter type likely explains the inability to observe acute, rapid changes in food intake using optogenetic or chemogenetic approaches to induce POMC neurons activity (present findings and (Aponte et al., 2011; Zhan et al., 2013; Koch et al., 2015)). Accordingly, the fact that POMC-*Raptor*-KO, POMC-*Rictor*-KO and POMC-*CB<sub>1</sub>*-KO mice did not have *per se* a phenotype during fasting-induced food intake could be attributed to the similar expression of the deleted genes and related pathways across the 3 POMC neurons subpopulations.

We were the first to suggest the involvement of the fuel sensing mTORC1 pathway in the hypothalamic regulation of food intake and body weight (Cota et al., 2006). Since then, a few studies by using conditional gene targeting approaches have investigated the role of the mTOR kinase or of components of its pathway in AgRP and POMC neurons (Mori et al., 2009; Kocalis et al., 2014; Smith et al., 2015; Caron et al., 2016). Some of these investigations have in particular shown that sustained mTORC1 activity, induced by either genetic manipulation or by aging, induces functional and morphological changes in POMC neurons, which in turn lead to hyperphagia and obesity (Mori et al., 2009 ; Yang et al., 2012).

The current findings now demonstrate that the mTORC1 pathway is critically implicated in the recruitment of POMC neurons in response to fuel availability and that depending on the cell neurotransmitter type, activity of the pathway leads to opposite effects on the regulation of neuronal activity. These changes in neuronal activity are in turn associated with changes in hypothalamic levels of  $\alpha$ -MSH and the endocannabinoid AEA, which then contributes to the further modulation of neurotransmitter release and to the feeding response. These observations on one side lead to propose that POMC cells use mTORC1 signaling to coordinate neuropeptidergic (i.e. levels of  $\alpha$ -MSH) and neurotransmitter-dependent responses induced by food consumption. On the other, they also allow confirming that, in agreement with previous evidence (Verty et al., 2004; Monge-Roffarello et al., 2014), recruitment of melanocortin signaling is upstream endocannabinoid-dependent CB<sub>1</sub> receptor activation and that the latter exert an important inhibitory action on the POMC GABAergic subpopulation, whose activation stimulates food intake. This action is part of the classic effects ascribed to presynaptic CB<sub>1</sub> and is consistent with our past observations demonstrating opposite effects of CB<sub>1</sub> signaling on food intake depending on the cell neurotransmitter type (Bellocchio et al., 2010; Soria-Gomez et al., 2014). Interestingly, recent work has shown that POMC neurons actually drive cannabinoid-induced hyperphagia in sated mice through a mechanism that relies on CB<sub>1</sub> modulation of presynaptic inputs onto POMC cells and on CB<sub>1</sub>-dependent mitochondrial adaptations, causing a switch in the release from the anorectic  $\alpha$ -MSH to the appetite-stimulant  $\beta$ -endorphin by POMC neurons (Dutia et al., 2012; Koch et al., 2015). Taking into account the present findings, further studies will be needed in order to assess the role of the mTORC1 pathway as regulator of differential POMC processing in response to different endogenous or exogenous

stimuli, and evaluate whether POMC processing might differ depending upon the specific POMC neurotransmitter cell type.

Our optogenetic studies finally demonstrate that POMC GABAergic, glutamatergic and GABA/glutamatergic subpopulations project onto parvocellular neurons of the PVN, substantiating the idea of a common convergent action of these 3 populations onto this hypothalamic nucleus. Acute modulation of mTORC1 signaling alters both excitatory and inhibitory POMC inputs onto parvocellular cells, suggesting that this is one of the outputs used for the regulation of feeding in our model. This evidence, however, does not exclude that each POMC neurons subpopulation might also project to (and receive projections from) specific and different circuits or that these subpopulations might affect each other activity, as implied by electrophysiological studies showing that GABA released from POMC neurons may act at presynaptic receptors on POMC terminals in an autoregulatory manner to limit continued transmission (Dicken et al., 2012).

The present study provides compelling evidence for a sophisticated role of POMC neurons in the regulation of food intake, indicating that specific POMC neurons subpopulations differentially impact on the regulation of energy balance. Thus, these data reveal an unforeseen neuronal mechanism, which modifies our vision of hypothalamic circuits regulating food intake, energy balance and associated pathological states.

## **Experimental Procedures**

### ***Animals***

All experiments were conducted in strict compliance with the European Union recommendations (2013/63/EU) and were approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (animal experimentation authorization n°3309004) and the local ethical committee of the University of Bordeaux (DIR1354). Maximal efforts were made to reduce any suffering and the number of animals used. Male mice, aged 7 to 16 weeks, were housed individually in standard plastic rodent cages, maintained on a 12-h light-dark cycle (lights off at 1300 h) with *ad libitum* access to pelleted chow (A03, SAFE, France) and water, unless otherwise specified. C57BL6/J mice (Janvier, France), POMC-Cre mice [Tg(Pomc1-cre)<sup>16Lowl</sup>/J, JAX Stock #005965, The Jackson Laboratory, USA; (Balthasar et al., 2004; Zhan et al., 2013)], POMC-YFP mice, and POMC-*Raptor*-KO, POMC-*Rictor*-KO, POMC-*CB<sub>1</sub>*-KO, *CB<sub>1</sub>*-KO and their wild-type (WT) littermates were used. Details about the generation of the different conditional mouse lines are provided in the Supplemental Information. Number of animals used in the study is indicated in the figure legends.

### ***Fasting-induced food intake studies***

Details about the stereotaxic surgery, AAV vectors used for hM3Dq (Gq-coupled human M3 muscarinic) expression and use of DREADD to modulate food intake, drugs preparation and pharmacologic dose-response studies are described in the Supplemental Information.

All mice were singly housed for at least 7 days before the fasting-induced food intake experiments. The day before the experiment, food was removed from the cages for 24 hours. Fasted mice received an icv injection of RAPA (25 µg in 1 µl DMSO) or its

vehicle, which were administered 4 h before dark onset. The same protocol was followed when Rimo (5 µg in 1 µl DMSO), Ptx (0.03 µg in 1 µl DMSO), MTII (0.02 µg in 1 µl PBS) or CNO (5 mg/kg in saline, ip) were combined with RAPA. Rimo, Ptx or MTII were simultaneously administered icv with RAPA; CNO or its vehicle were administered 15 min before the icv administration of RAPA or its vehicle.

Food was returned immediately after the drugs injections and intake was recorded after 1, 2 and, in some cases, after 24 h. Body weight was measured immediately before and 24 h after the treatments.

### ***Double fluorescent in situ hybridization (FISH)***

Experimental procedure for the double FISH studies is described in the Supplemental Information.

### ***Immunohistochemistry***

Experimental procedure for the immunohistochemistry studies is described in the Supplemental Information.

### ***Hypothalamic neuropeptides assays***

Hypothalami from fasted or refed C57BL/6J mice, treated icv with RAPA or its vehicle, were extracted in 0.1N HCl and assayed for POMC peptides as previously described (Savontaus et al., 2004). Further details are provided in the Supplemental Information.

### ***Endocannabinoid measurements***

C57BL/6J mice were sacrificed 1 h after icv administration of RAPA or its vehicle under fasting or refeeding conditions. Brains were removed and the hypothalamus,

hippocampus and cortex dissected, flash frozen and stored at -80°C until analysis. In other experiments, hypothalami were collected from 24-h fasted C57BL/6J mice injected icv with MTII (0.02µg) or PBS, or with RAPA or with RAPA combined to MTII and sacrificed 1 h after refeeding. Hypothalami were also collected from refed  $ARC^{hM3Dq}$  POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice sacrificed after ip injection of CNO or its vehicle and icv administration of RAPA. Measurements of AEA and 2-AG were carried out as in (Lafourcade et al., 2011; Gatta-Cherifi et al., 2012). Endocannabinoids content was expressed as fmol or pmol of mg of tissue.

### ***Single Cell RNA sequencing analysis***

Experimental procedure for the single cell RNA sequencing studies is described in the Supplemental Information.

### ***Electrophysiology***

Acute coronal brain slices were prepared from 8 to 12 weeks old mice expressing YFP or channelrhodopsin 2 coupled to mCherry selectively in POMC neurons. RAPA was directly added in the perfusion aCSF at a final concentration of 200 nM (for details see Supplemental Information).

### ***Statistical analyses***

Statistical analyses were performed using Prism (Graphpad, USA). All values are reported as means ± SEM. Data were analyzed by unpaired or paired Student's t-tests or by 1-way or 2-way ANOVAs as appropriate. Significant ANOVAs were followed by Fisher LSD post-hoc test. Single-cell RNA-seq data for the various POMC subgroups

was analyzed using Student's t-test on log-transformed mRNA copy data. P values less than 0.05 denote statistical significance.

### **Supplemental Information**

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, five figures, one data table, and two tables with detailed statistical analysis description.

### **Author Contributions**

N.S. performed most behavioral and neuroanatomical experiments; W.M. and F.M. performed electrophysiological studies and analyses; C.C., E.B. V.S., D.G. and S.C. helped with in vivo animal studies; L.B. and A.C. helped with molecular biology; I.M. carried out biochemical analysis of endocannabinoids; K.M. and S.L.W. performed POMC processing analysis; R.A.R. and T.H. carried out single-cell RNA sequencing studies and analyses; D.C. supervised the work; N.S., W.M., F.M., G.M. and D.C. wrote the manuscript; all authors discussed results and edited the manuscript.

### **Acknowledgements**

We thank N. Aubailly, S. Laumond and the animal facility personnel of the NeuroCentre Magendie for animal care, the Genotyping Platform of the NeuroCentre Magendie for mouse genotyping. The microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France Biolmaging. The help of Fabrice Cordelières, Christel Poujol and Sebastien Marais is acknowledged. We thank Dr. N. Abrous (INSERM U1215, Bordeaux) for initial help with immunohistochemistry, and Dr. Amit Zeisel and Dr. Sten Linnarsson (Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) for help with single-cell RNA

sequencing studies. We also thank Drs. S.C. Woods (University of Cincinnati), F. Chaouloff, and P. Ciofi (INSERM U1215) for useful suggestions. Supported by INSERM (to D.C. and G.M.), Aquitaine Region (to D.C. and G.M.), INSERM/Aquitaine Region PhD fellowship and FRM PhD fellowship FDT20150532545 (to N.S.), European Community's Seventh Framework Programme (Marie Curie IRG n°224757 to D.C., HEALTH-F2-2008-223713 to G.M., FP7-People2009-IEF-251494 to D.C. and E.B.), ERC-2010-StG-260515 (to G.M.), EFSD-Sanofi (to D.C. and G.M.), ANR-2010-1414-01 (to D.C.), ANR-13-BSV4-0006 (to D.C. and G.M.), Labex BRAIN ANR-10-LABX-43 (D.C. and G.M.), ANR-10-EQX-008-1 OPTOPATH (D.C.), FFRD (to D.C.), FRM (to C.C., F.M., L.B. and G.M.) and NIH DK080003 (to S.L.W.). T.H. was supported by the Swedish Research Council, Hjärnfonden, the Novo Nordisk Foundation, the European Research Council (SECRET-CELLS), and intramural funds of the Medical University of Vienna. R.A.R. is an EMBO long-term research fellow (ALTF 596-2014) co-funded by the European Commission FP7 (Marie Curie Actions, EMBOCOFUND2012, GA-2012-600394).

### **Disclosure Summary**

The authors have nothing to disclose.

### **References**

- Aponte, Y., Atasoy, D., and Sternson, S.M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience* 14, 351-355.
- Atasoy, D., Aponte, Y., Su, H.H., and Sternson, S.M. (2008). A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping.



The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28, 7025-7030.

Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Tang, V., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Chua, S.C., Jr., Elmquist, J.K., *et al.* (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42, 983-991.

Balthasar, N., Dalgaard, L.T., Lee, C.E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R.A., Kenny, C.D., *et al.* (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123, 493-505.

Bellocchio, L., Lafenetre, P., Cannich, A., Cota, D., Puente, N., Grandes, P., Chaouloff, F., Piazza, P.V., and Marsicano, G. (2010). Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nature neuroscience* 13, 281-283.

Blouet, C., Ono, H., and Schwartz, G.J. (2008). Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell metabolism* 8, 459-467.

Blouet, C., and Schwartz, G.J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural brain research* 209, 1-12.

Boston, B.A., Blaydon, K.M., Varnerin, J., and Cone, R.D. (1997). Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. *Science* 278, 1641-1644.

Caron, A., Labbe, S.M., Lanfray, D., Blanchard, P.G., Villot, R., Roy, C., Sabatini, D.M., Richard, D., and Laplante, M. (2016). Mediobasal hypothalamic overexpression of DEPTOR protects against high-fat diet-induced obesity. *Molecular metabolism* 5, 102-112.

Chen, Y., Lin, Y.C., Kuo, T.W., and Knight, Z.A. (2015). Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits. *Cell* 160, 829-841.

Collin, M., Backberg, M., Ovesjo, M.L., Fisone, G., Edwards, R.H., Fujiyama, F., and Meister, B. (2003). Plasma membrane and vesicular glutamate transporter mRNAs/proteins in hypothalamic neurons that regulate body weight. *The European journal of neuroscience* 18, 1265-1278.

Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature neuroscience* 8, 571-578.

Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312, 927-930.

Cota, D., Proulx, K., and Seeley, R.J. (2007). The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology* 132, 2158-2168.

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480-484.

Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., and Kahn, B.B. (2012). p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell metabolism* 16, 104-112.

Dennison, C.S., King, C.M., Dicken, M.S., and Hentges, S.T. (2016). Age-dependent changes in amino acid phenotype and the role of glutamate release from hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *The Journal of comparative neurology* 524, 1222-1235.

Dicken, M.S., Tooker, R.E., and Hentges, S.T. (2012). Regulation of GABA and glutamate release from proopiomelanocortin neuron terminals in intact hypothalamic networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 4042-4048.

Dutia, R., Meece, K., Dighe, S., Kim, A.J., and Wardlaw, S.L. (2012). beta-Endorphin antagonizes the effects of alpha-MSH on food intake and body weight. *Endocrinology* 153, 4246-4255.

Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165-168.

Fekete, C., Zseli, G., Singru, P.S., Kadar, A., Wittmann, G., Fuzesi, T., El-Bermani, W., and Lechan, R.M. (2012). Activation of anorexigenic pro-opiomelanocortin neurones during refeeding is independent of vagal and brainstem inputs. *Journal of neuroendocrinology* 24, 1423-1431.

Gatta-Cherifi, B., Matias, I., Vallee, M., Tabarin, A., Marsicano, G., Piazza, P.V., and Cota, D. (2012). Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity. *International journal of obesity* 36, 880-885.

Gautron, L., Elmquist, J.K., and Williams, K.W. (2015). Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. *Cell* 161, 133-145.

Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature neuroscience* 1, 271-272.

Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., Koehl, M., Abrous, D.N., Mendizabal-Zubiaga, J., Grandes, P., *et al.* (2012). Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell* 148, 1039-1050.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-189.

Hentges, S.T., Nishiyama, M., Overstreet, L.S., Stenzel-Poore, M., Williams, J.T., and Low, M.J. (2004). GABA release from proopiomelanocortin neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 1578-1583.

Hentges, S.T., Otero-Corchon, V., Pennock, R.L., King, C.M., and Low, M.J. (2009). Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 13684-13690.

Jarvie, B.C., and Hentges, S.T. (2012). Expression of GABAergic and glutamatergic phenotypic markers in hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *The Journal of comparative neurology* 520, 3863-3876.

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological reviews* 89, 309-380.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.

Kocalis, H.E., Hagan, S.L., George, L., Turney, M.K., Siuta, M.A., Laryea, G.N., Morris, L.C., Muglia, L.J., Printz, R.L., Stanwood, G.D., *et al.* (2014). Rictor/mTORC2 facilitates central regulation of energy and glucose homeostasis. *Molecular metabolism* 3, 394-407.

Koch, M., and Horvath, T.L. (2014). Molecular and cellular regulation of hypothalamic melanocortin neurons controlling food intake and energy metabolism. *Molecular psychiatry* 19, 752-761.

Koch, M., Varela, L., Kim, J.G., Kim, J.D., Hernandez-Nuno, F., Simonds, S.E., Castorena, C.M., Vianna, C.R., Elmquist, J.K., Morozov, Y.M., *et al.* (2015). Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature* 519, 45-50.

Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., De Smedt-Peyrusse, V., Labrousse, V.F., Bretilon, L., Matute, C., *et al.* (2011). Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nature neuroscience* 14, 345-350.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.

Lopez, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., and Dieguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nature reviews Endocrinology* 12, 421-432.

Marsicano, G., and Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *The European journal of neuroscience* 11, 4213-4225.

Mazier, W., Saucisse, N., Gatta-Cherifi, B., and Cota, D. (2015). The Endocannabinoid System: Pivotal Orchestrator of Obesity and Metabolic Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 26, 524-537.

Monge-Roffarello, B., Labbe, S.M., Roy, M.C., Lemay, M.L., Coneggo, E., Samson, P., Lanfray, D., and Richard, D. (2014). The PVH as a site of CB1-mediated stimulation of thermogenesis by MC4R agonism in male rats. *Endocrinology* 155, 3448-3458.

Monory, K., Massa, F., Egertova, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R., Kelsch, W., Jacob, W., Marsch, R., Ekker, M., *et al.* (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51, 455-466.

Mori, H., Inoki, K., Munzberg, H., Opland, D., Faouzi, M., Villanueva, E.C., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D., MacDougald, O.A., Myers, M.G., Jr., *et al.* (2009). Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell metabolism* 9, 362-374.

Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology : CB* 14, 1296-1302.

Savontaus, E., Breen, T.L., Kim, A., Yang, L.M., Chua, S.C., Jr., and Wardlaw, S.L. (2004). Metabolic effects of transgenic melanocyte-stimulating hormone overexpression in lean and obese mice. *Endocrinology* 145, 3881-3891.

Singru, P.S., Sanchez, E., Fekete, C., and Lechan, R.M. (2007). Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety. *Endocrinology* 148, 638-646.

Singru, P.S., Wittmann, G., Farkas, E., Zseli, G., Fekete, C., and Lechan, R.M. (2012). Refeeding-activated glutamatergic neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) mediate effects of melanocortin signaling in the nucleus tractus solitarius (NTS). *Endocrinology* 153, 3804-3814.

Smith, M.A., Katsouri, L., Irvine, E.E., Hankir, M.K., Pedroni, S.M., Voshol, P.J., Gordon, M.W., Choudhury, A.I., Woods, A., Vidal-Puig, A., *et al.* (2015). Ribosomal S6K1 in POMC and AgRP Neurons Regulates Glucose Homeostasis but Not Feeding Behavior in Mice. *Cell reports* 11, 335-343.

Soria-Gomez, E., Massa, F., Bellocchio, L., Rueda-Orozco, P.E., Ciofi, P., Cota, D., Oliet, S.H., Prospero-Garcia, O., and Marsicano, G. (2014). Cannabinoid type-1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit stimulated food intake. *Neuroscience* 263, 46-53.

Tong, Q., Ye, C.P., Jones, J.E., Elmquist, J.K., and Lowell, B.B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature neuroscience* 11, 998-1000.

Verty, A.N., McFarlane, J.R., McGregor, I.S., and Mallet, P.E. (2004). Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and melanocortin MCR-4 receptors in regulating food intake. *Endocrinology* 145, 3224-3231.

Villanueva, E.C., Munzberg, H., Cota, D., Leshan, R.L., Kopp, K., Ishida-Takahashi, R., Jones, J.C., Fingar, D.C., Seeley, R.J., and Myers, M.G., Jr. (2009). Complex

regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 in the basomedial hypothalamus by leptin and nutritional status. *Endocrinology* 150, 4541-4551.

Wardlaw, S.L. (2011). Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance. *European journal of pharmacology* 660, 213-219.

Williams, K.W., and Elmquist, J.K. (2012). From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature neuroscience* 15, 1350-1355.

Wittmann, G., Hrabovszky, E., and Lechan, R.M. (2013). Distinct glutamatergic and GABAergic subsets of hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons revealed by in situ hybridization in male rats and mice. *The Journal of comparative neurology* 521, 3287-3302.

Yang, S.B., Tien, A.C., Boddupalli, G., Xu, A.W., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2012). Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons. *Neuron* 75, 425-436.

Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J.E., Lin, S., Bao, J., Wu, P., and Luo, M. (2013). Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 3624-3632.



## Figure Legends

**Figure 1. POMC neurons with different neurotransmitter profile have specific genetic signature.** Neurotransmitter type-specific single-cell transcriptome profiling of hypothalamic *Pomc*<sup>+</sup> neurons. The heat map illustrates the differential expression of several genes depending on whether *Pomc*<sup>+</sup> cells are GABAergic (11 cells studied, column 1 to 11 from the left), glutamatergic (7 cells studied, columns 12 to 18 from the left) or GABA/glutamatergic (10 cells studied, columns 19 to 28 from the left). The color scale bar shows the color coding of the single-cell expression level. Data are normalized to maximum single-cell level in the dataset for every gene. See also Table 1 and Figure S1.

**Figure 2. mTORC1 blockade rapidly and differently changes POMC neurons activity depending on neurotransmitter cell type.**

(A) Repartition of the tested POMC neurons as function of their response to RAPA and time course of the POMC neurons response after RAPA perfusion. (B-E) Representative traces of POMC neurons firing during RAPA perfusion recorded in whole cell current clamp configuration from POMC-YFP mice. RAPA perfusion decreases (B and C n=26/72 cells) or increases (D and E, n=20/72 cells) POMC firing (31 animals analyzed in total). (F) Membrane potential is increased in RAPA<sup>act</sup> POMC neurons ( $+2.01 \pm 0.42$  mV, n=20 cells) as compared to RAPA<sup>inh</sup> POMC neurons ( $-1.07 \pm 0.37$  mV, n=26 cells). (G, I) Cell capacitance (C<sub>m</sub>) is reduced (G) while membrane resistance (R<sub>m</sub>) is increased (I) in RAPA<sup>act</sup> POMC neurons (n=20) as compared to RAPA<sup>inh</sup> POMC neurons (n=26). (H) Change in cell firing in response to RAPA is correlated to the cell membrane capacitance. (J) Representative images of a RAPA<sup>inh</sup> POMC neuron and RAPA<sup>act</sup> POMC neuron stained with biocytin (blue) and GAD65/67

(red) (left panel), and corresponding 3D cell reconstruction images used for quantification (right panel). (K) Number of GAD65/67 spots over membrane capacitance is higher in RAPA<sup>act</sup> POMC neurons as compared to RAPA<sup>inh</sup> POMC neurons (n=4-5 cells). (L) Number of GAD65/67 spots is inversely correlated to the cell membrane capacitance (n=15). Scale bar in J: 5  $\mu$ m. Data are mean  $\pm$  SEM. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. For details of statistical analyses, see Table S2. See also Figure S2.

**Figure 3. mTORC1 signaling regulates neurotransmitter input arising from POMC neurons onto PVN parvocellular cells.**

(A) Representative image of mCherry-positive, channelrhodopsin 2 expressing projections from ARC POMC neurons onto the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). (B) Distribution of the neurotransmission type recorded in parvocellular neurons after photostimulation (n=17 cells) and representative traces (right panel) of light-evoked post-synaptic currents recorded from parvocellular neurons of the PVN for each neurotransmission type. POMC neurons mainly release glutamate (58.82%, 10/17 cells) onto parvocellular neurons, however pure GABAergic (17.65%; 3/17 cells) and mixed Glutamate/GABA (23.53%, 4/17 cells) connections were also observed. (C) Amplitude time course of light-evoked EPSC (pink; n=6 cells) and IPSC (green; n=5 cells) normalized to baseline. RAPA decreases eEPSCs amplitude (D) and increases eIPSCs amplitude (E). Representative traces of eEPSC (D; top) and eIPSC (E; top) before (bef, in C) and after (aft, in C) 10 minutes of RAPA application. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001. Scale bar in A: 50  $\mu$ m. V: 3<sup>rd</sup> ventricle. Data are mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05. For details of statistical analyses, see Table S2.

**Figure 4. The mTORC1 pathway is recruited in POMC neurons during refeeding where it controls food intake.**

(A-C) Fast-induced food intake (FI) increases c-Fos expression (green color, evaluated after 1.5h of refeeding) in POMC-positive neurons (red color; A, B); this is associated with an increased phosphorylation of the mTORC1 downstream target S6 (p-S6) (purple color; A, B). Central administration of the mTOR inhibitor rapamycin (RAPA) decreases both c-Fos as well as p-S6 expression in POMC neurons during refeeding (A-C). (n=8-10 mice per group). (D-F) Fasting-induced 2-h food intake in C57BL/6J mice (D, n=5 per group), POMC-*Raptor*-WT and POMC-*Raptor*-KO littermates (E, n=9-12 per group), and POMC-*Rictor*-WT and POMC-*Rictor*-KO littermates (F, n=5 per group) treated icv with vehicle or RAPA. (G,H) Acute CNO injection inhibits RAPA-induced hyperphagia in ARC<sup>hM3Dq</sup> POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice (G, n=6-22 per group), but not in ARC<sup>hM3Dq</sup> POMC-Cre<sup>-/-</sup> control mice that do not express the Cre recombinase (H, n=7-8 per group).

Scale bar in A: 50µm, and 10µm for smaller inset. V: 3<sup>rd</sup> ventricle. Data are mean ± SEM. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. For details of statistical analyses, see Table S2. See also Figure S3.

**Figure 5. mTORC1 blockade during refeeding induces fasting-like changes in hypothalamic  $\alpha$ -MSH and AEA levels.**

(A) Schematic diagram illustrating hypothalamic POMC processing. (B)  $\alpha$ -MSH content in the hypothalami of 24-h fasted or 2-h refed C57BL/6J mice treated icv with vehicle or RAPA (n=8 per group). (C-E) Hypothalamic  $\alpha$ -MSH/POMC (C),  $\alpha$ -MSH/ACTH (D) and  $\alpha$ -MSH/ $\beta$ -EP (E) ratios in 2-h refed C57BL/6J mice treated icv with vehicle or RAPA (n=8 per group). (F, G) Effect of icv administration of vehicle or

RAPA on hypothalamic AEA (F, n=3-5 per group) and 2-AG (G, n=4-5 per group) content in fasted or refed C57BL/6J mice. (H) Effect of the combined icv administration of the  $\alpha$ -MSH analog MTII (0.02  $\mu$ g) and RAPA on hypothalamic AEA content in refed C57BL/6J mice (n=6 per group). (I) Effect of the combined administration of CNO and RAPA on hypothalamic AEA content in refed ARC<sup>hM3Dq</sup> POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice (n=8-10 per group). Data are mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. For details of statistical analyses, see Table S2. See also Figure S4.

**Figure 6. CB<sub>1</sub>-dependent signaling determines fasting-induced hyperphagia during mTORC1 blockade by modulating POMC GABAergic neurons.**

(A) Fast-induced 2-h food intake in C57BL/6J mice treated icv with RAPA, the CB<sub>1</sub> antagonist Rimonabant (Rimo), or with the two drugs combined (n=9-10 per group). (B) Fasting-induced 2-h food intake in CB<sub>1</sub>-WT and CB<sub>1</sub>-KO littermates treated icv with RAPA or its vehicle (n=9-13 per group). (C, D) Representative images taken at the level of the ARC (C) and related quantification (D) of fluorescent *in situ* hybridization studies showing colocalization of CB<sub>1</sub> mRNA expression (green color) in POMC mRNA-positive neurons (red color) of POMC-CB<sub>1</sub>-WT and POMC-CB<sub>1</sub>-KO littermates (n=3 per group). Nuclear counterstain carried out with DAPI. (E) Fast-induced 2-h food intake in POMC-CB<sub>1</sub>-WT and POMC-CB<sub>1</sub>-KO mice treated icv with RAPA, its vehicle or a combination of RAPA and the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin (Ptx) (n=7-26 per group). Scale bar in C: 50 $\mu$ m, and 5 $\mu$ m for smaller inset. V: 3<sup>rd</sup> ventricle. Data are mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. For details of statistical analyses, see Table S2. See also Figure S5.

**Table 1.** Gene annotation enrichment analysis of differentially expressed genes in POMC GABAergic and POMC glutamatergic neurons.

	Database	Term	Fold Enrichment	Count	p-value
<b>Enriched in POMC GABAergic Neurons</b>	Gene Ontology	Glutamate decarboxylase activity	67.11	2	2,94E-02
	Gene Ontology	Glucose-6-phosphate/hexose phosphate transport	45.07	2	4,35E-02
	Gene Ontology	Transcriptional repressor complex	11.75	5	7,79E-04
	Gene Ontology	Proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	9.01	4	9,52E-03
	Gene Ontology	Neutral lipid metabolic process	6.01	4	2,84E-02
	Gene Ontology	Glycerol ether metabolic process	6.01	4	2,84E-02
	Gene Ontology	Triglyceride metabolic process	5.63	3	9,81E-02
	Gene Ontology	Chromatin binding	4.33	10	5,03E-04
	Gene Ontology	Regulation of gene-specific transcription	4.04	4	7,59E-02
	Gene Ontology	Transcription coactivator activity	4.03	6	1,65E-02
	Gene Ontology	Transcription cofactor activity	3.82	12	3,10E-04
	Gene Ontology	Transcription repressor activity	3.73	10	1,45E-03
	Gene Ontology	Transcription corepressor activity	3.73	4	9,12E-02
	Gene Ontology	Glycerolipid metabolic process	3.14	6	4,19E-02
	Gene Ontology	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	2.88	6	5,74E-02
	Gene Ontology	Transcription factor binding	2.80	12	3,82E-03
	Gene Ontology	Negative regulation of transcription	2.54	14	3,56E-03
	Gene Ontology	Negative regulation of gene expression	2.47	15	3,04E-03
	Gene Ontology	Transcription factor complex	2.25	8	6,50E-02
<b>Enriched in POMC Glutamatergic Neurons</b>	Gene Ontology	Synaptic vesicle membrane	34.64	2	5,48E-02
	Gene Ontology	Synaptic vesicle membrane	34.64	2	5,48E-02
	Gene Ontology	Clathrin coated vesicle membrane	27.42	3	5,04E-03
	Gene Ontology	Cytoplasmic vesicle membrane	11.35	3	2,72E-02
	Kegg pathway	Purine metabolism	7.31	3	5,46E-02
	Gene Ontology	GTP binding	4.42	4	5,68E-02
	Gene Ontology	Vesicle	3.17	5	6,59E-02

## Supplemental Experimental Procedures

### *Animals*

Male POMC-YFP mice, and POMC-*Raptor*-KO, POMC-*Rictor*-KO, POMC-*CB<sub>1</sub>*-KO, *CB<sub>1</sub>*-KO and their wild-type (WT) littermates were all generated in the Neurocentre Magendie breeding facility. POMC-YFP mice were obtained by crossing POMC-Cre [Tg(Pomc1-cre)<sup>16Lowl</sup>/J, JAX Stock #005965, The Jackson Laboratory, USA] mice with Rosy mice [B6.129X1-Gt(ROSA)<sup>26Sortm1</sup>(EYFP)Cos/J, JAX Stock #006148, The Jackson Laboratory]. POMC-*Raptor*-KO and WT mice were generated by crossing POMC-Cre mice with *Raptor*-Flox mice (B6.Cg-Rptortm1.1Dmsa/J, JAX Stock #013188, The Jackson Laboratory). POMC-*Rictor*-KO and WT mice were obtained by crossing POMC-Cre mice with *Rictor*-Flox mice (Rictortm1.1Klg/SjmJ, JAX Stock #020649, The Jackson Laboratory). POMC-*CB<sub>1</sub>*-KO and WT mice were generated by crossing POMC-Cre mice with *CB<sub>1</sub>*-Flox mice (Marsicano et al., 2003). The constitutive *CB<sub>1</sub>*-KO strain was generated and genotyped as previously described (Marsicano et al., 2002).

Mice were genotyped from genomic DNA purified from tail biopsies by PCR using specific primers (see further below). Tails were incubated overnight at 56°C in Proteinase K buffer (100mM Tris-HCl pH8, 5mM EDTA, 0.2 % SDS, 200mM NaCl, 0,2mg/mL PK). After 10 min at 13200 rpm, the supernatants were purified on silica columns, according to the manufacturer protocol (Macherey nagel kit), on a zephyr automatic station. PCR assay was carried out using a Biorad C1000 thermal cycler, with GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega), and 0.3 to 0.6µM of each primer in a 25µL volume. PCR conditions were as follows: 1 cycle, 5 min at 95°C; 37 cycles, 30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C for, 1 min at 72°C; 1 cycle, 5 min at 72°C. PCR

products was analyzed on a Labchip GX microfluidic electrophoresis system (Caliper) using the DNA5k kit.

Primers for genotype analysis.

Mouse line	Primer	sequence 5'3'	expected fragment	
POMC-Cre	Cre F	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	Cre	100 pb
	Cre R	GTGAAACAGCATTGCTGCTCACTT		
CB <sub>1</sub> -Flox	CB1_F	GCTGTCTCTGGTCCTCTTAAA	excision	680 pb
	CB1_R	GGTGTCACCTCTGAAAACAGA	flox	555 pb
	CB1_ex	CTCCTGTATGCCATAGCTCTT	wt	450 pb
Rictor-Flox	Rictor-F	CAAGCATCATGCAGCTCTTC	Flox	560 pb
	Rptor-R	TCCCAGAATTTCCAGGCTTA	wt	410 pb
Raptor-Flox	Rptor-F	CTCAGTAGTGGTATGTGCTCAG	Flox	200 pb
	Rptor-R	GGGTACAGTATGTCAGCACAG	wt	160 pb
POMC-YFP	WT-F	AAAGTCGCTCTGAGTTGTAT	wt	620 pb
	Ki-F	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC	Ki	330 pb
	Common-R	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	Common	

### ***AAV vectors for hM3Dq and channelrhodopsin 2 (ChR2) expression***

Gq-coupled human M3 muscarinic DREADD (hM3Dq) fused to mCherry (Alexander et al., 2009), provided by Brian L. Roth (University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA) was subcloned in a CAG-DIO rAAV vector for Cre-dependent expression (Atasoy et al., 2008) by using standard molecular biology techniques. AAV-DIO-hChR2 virus was generated using pAAV-Ef1a-DO-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-pA plasmid as backbone (ADGENE #37082). Vectors used were of an AAV1/AAV2 mixed serotype, and were generated by calcium phosphate transfection of HEK-293T cells and subsequent purification as described (Monory et al., 2006).

### ***Stereotaxic surgery***

Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg, ip) and xylazine (10 mg/kg, ip), placed in a stereotaxic holder (David Kopf Instruments, USA) and

implanted with a cannula in the lateral cerebral ventricle (coordinate AP/DV/ML = -0.5/-2.1/-1.2 mm). Cannula placement was verified by administering 5 µg of neuropeptide Y (NPY) (Phoenix Pharmaceuticals Inc., France) in 0.1 M PBS (pH 7.4) and by assessing subsequent food intake, as in (Brown et al., 2006).

**Stereotaxic virus injection.** POMC-Cre<sup>+/+</sup> and POMC-Cre<sup>-/-</sup> mice were anesthetized and placed in a stereotaxic holder. Hamilton syringe with NanoFil needle (85 µm tip diameter) were filled with AAV and inserted into the ARC. AAV vectors (500 nL) were infused with pressure (coordinate AP/DV/ML = -1.5/-5.5/±0.2 mm; infusion speed = 100 nL/min; UltraMicroPump UMP3 (one) with SYS-Micro4 Controller, WPI, USA). To activate neurons, AAV DIO hM3Dq-mCherry vectors were injected into the ARC of POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice. For control, AAV DIO hM3Dq-mCherry virus was injected into the ARC of POMC-Cre<sup>-/-</sup> mice. Mice were then implanted with cannulae into the lateral cerebral ventricle as detailed above. Mice were used for the behavioral studies after at least 4 weeks from the intra-ARC AAV administration. For optogenetic electrophysiology studies, 5-weeks old POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice were stereotaxically and bilaterally injected with an AAV-DIO-hChR2 virus at same coordinates as before, injection volume: 500 nl and injection speed: 100 nl/min. Animals were used for electrophysiology studies after 4 to 5 weeks from the intra-ARC AAV administration.

### ***Drugs preparations and food intake studies***

Rapamycin (RAPA, EMD Millipore, USA), picrotoxin (Ptx, Sigma-Aldrich, USA), and Rimonabant (Rimo, NIMH Chemical Synthesis and Drug Supply Program, USA) were dissolved in DMSO, the α-MSH analog melanotan II (MTII, Phoenix Pharmaceuticals, USA) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS), and clozapine-N-oxide (CNO, Sigma-Aldrich, USA) was dissolved in saline.



**Chronic CNO food intake study.** ARC<sup>hM3Dq</sup> POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice were injected with saline during the first 3 days at dark onset and then 5h later. For the next 3 days, they were then treated with CNO (5 mg/kg, ip) twice a day, at dark onset and 5h later. From days 6 to 10, mice received two daily injections of saline, as before. Food intake was recorded every day for the length of the treatment.

**MTII and Ptx dose-responses.** The MTII and the Ptx dose-response were carried out in 24-h fasted C57BL/6J mice that received MTII (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03, 0.02 or 0.01 µg/µL in saline, icv) or Ptx (0.03, 0.06 or 0.09 µg/µL in DMSO, icv) respectively 1 h and 4 h before dark onset. Food intake was recorded at 1h, 2h and 24h. Body weight was measured immediately before and 24h after the treatments.

### ***Double fluorescent in situ hybridization***

POMC-CB<sub>1</sub>-KO, CB<sub>1</sub>-KO and their WT littermates (3 per genotype) were sacrificed by cervical dislocation. Their brains were isolated, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until sectioning (14 µm section thickness) using a cryostat (CM1950, Leica, Germany). FITC-labeled riboprobes against mouse CB<sub>1</sub> receptor and DIG-labeled riboprobes against mouse AgRP or POMC were prepared as described (Marsicano and Lutz, 1999; Marsicano et al., 2003; Monory et al., 2006). For the generation of FITC-labelled riboprobes, CB<sub>1</sub> cDNA was sub-cloned into pBluescript vector using the restriction enzymes EcoRI and BamHI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). After linearization with BamHI, the antisense riboprobe was synthesized with T3 RNA polymerase (Roche, Basel, Switzerland). For the generation of the sense riboprobe, EcoRI was used for the linearization and T7 RNA polymerase (Roche) for the synthesis. For signal amplification, we used the TSATM Plus System Cyanine 3/Fluorescein (Perkin Elmer). For the generation of DIG-labelled riboprobes, AgRP and

POMC cDNA were sub-cloned into pBluescript vector using the restriction enzymes EcoRI and BamHI. After linearization with BamHI, the antisense riboprobe was synthesized with T3 RNA polymerase. For the generation of the sense riboprobe, EcoRI was used for the linearization and T7 RNA polymerase for the synthesis. For signal amplification we used the TSATM System Cyanine 3/Fluorescein. Blocking buffer TNB and wash buffer TNT were prepared according to the manufacturer's protocol. Slides were analyzed by epifluorescence microscopy at 40X (Leica). Quantitative co-expression data were obtained using the program ImageJ with the "CellCounter plug-in" (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), by separately counting CB<sub>1</sub> (green), AgRP or POMC (red) and co-expressing neurons in the ARC of POMC-CB<sub>1</sub>-KO, CB<sub>1</sub>-KO and their WT littermates. CB<sub>1</sub>-KO brains were included as negative control in the experiment to verify the complete deletion of CB<sub>1</sub> in both AgRP and POMC neurons. A total of 70-100 neurons were counted using 3 images containing the ARC from 3 mice for each genotype.

### ***Immunohistochemistry***

Mice were deeply anesthetized using pentobarbital given ip and then perfused transcardially with ice-cold PBS, pH 7.4, followed by 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, France) in PBS with 0.2% picric acid. Brains were extracted and postfixed in 4% PFA overnight at 4°C, then cryoprotected with 30% sucrose in PBS at 4°C. Coronal sections (30 µm) were cut with a cryostat (CM1950, Leica, Germany), collected in PBS and stored in antifreeze solution (30% ethylene glycol, 30% glycerol in KPBS) at -20°C until further used.

**Double-labeling immunohistochemistry.** Brain sections from POMC-*Raptor*-KO and their WT littermates were processed for the co-localization of raptor and POMC.

Sections were first incubated with 10% normal goat serum (Dako, Denmark) and then with rabbit anti-raptor antibody (1:500, Abcam, UK) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A647-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (1:500, Cell Signaling, USA). Sections were washed in PBS and incubated with Goat Fab Fragment Anti-Rabbit IgG (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) to avoid cross-reactivity. Sections were then washed in PBS and blocked with 10% normal goat serum (Dako) and then incubated with rabbit anti-POMC antibody (1:2000; Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A488-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (1:500, Cell Signaling, USA). Sections were then mounted and cover-slipped. The same protocol was followed for the co-localization of rictor and POMC in POMC-*Rictor*-KO mice and their WT littermates, where sections were first incubated with rabbit anti-rictor antibody (1:1000, Bethyl Laboratories, Inc., USA).

**Evaluation of chemogenetic activation of POMC neurons.** For co-localization of c-Fos and phosphorylated S6 ribosomal protein (p-S6) in mCherry-expressing POMC neurons, ARC<sup>hM3Dq</sup> POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice received a single injection of CNO (5 mg/kg, ip) or its vehicle 90 minutes before sacrifice. Collected sections were first incubated with 10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) and then with goat anti-c-Fos antibody (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A488-conjugated secondary donkey anti-goat antibody (1:500, EMD Millipore, USA). Sections were then washed in PBS and blocked with 10% normal goat serum (Dako, Denmark) and subsequently incubated with rabbit anti-p-S6 ser240/244 antibody (1:200; Cell Signalling, USA) overnight at 4°C. The next day sections were

washed in PBS and incubated for 1 h with A647-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (1:500, Cell Signaling, USA). Sections were then mounted and cover-slipped.

**Triple-labeling immunohistochemistry.** Brain sections from 90-min refed C57BL6/J mice were processed for the co-localization of c-Fos and p-S6 in POMC neurons. Sections were first incubated with 10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) and then with goat anti-c-Fos antibody (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A594-conjugated secondary donkey anti-goat antibody (1:500, EMD Millipore, USA). Sections were then washed in PBS and blocked with 10% normal goat serum (Dako, Denmark) and then incubated with rabbit anti-p-S6 antibody (1:200; Cell Signaling, USA) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with biotinylated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:400, Vector Labs, USA), followed by washes and 1 h of amplification with an avidin-biotin complex (Vector Labs, USA). The sections were then washed and incubated with a FITC-conjugated streptavidin (1:400, Vector Labs, USA). Finally, sections were washed in PBS and incubated with Goat Fab Fragment Anti-Rabbit IgG (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) to avoid cross-reactivity. Sections were then washed in PBS and blocked with 10% normal goat serum (Dako) and then incubated with rabbit anti-POMC antibody (1:2000, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A647-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (1:500, Cell Signaling, USA). Sections were then mounted and cover-slipped.

**Quantification of the immunohistochemical signal.** Fluorescent images were acquired with a confocal microscope (SP8-STED, Leica, Germany) and all sections containing the ARC were rostro-caudally analyzed using ImageJ.

### ***Hypothalamic neuropeptides assays***

$\alpha$ -MSH RIA was performed with antiserum that cross-reacts fully with des-acetyl- $\alpha$ -MSH, but has no cross-reactivity with ACTH or CLIP, nor with the free acid form of  $\alpha$ -MSH that has not been amidated.  $\beta$ -EP RIA was performed with an antiserum directed at  $\beta$ -EP<sub>18-25</sub>. ACTH RIA was performed with antiserum directed against ACTH<sub>7-18</sub> (IgG Corp. TN, USA), which cross-reacts with Pro-ACTH but has no cross-reactivity with  $\alpha$ -MSH, CLIP or  $\beta$ -EP (Papadopoulos and Wardlaw, 1999). POMC precursor ELISA was performed with reagents provided by Dr. Anne White at the University of Manchester (Tsigos et al., 1993). Data are expressed versus mg protein.

### ***Single Cell RNA Sequencing analysis***

RNA-seq data on *Pomc*-expressing neurons ( $\geq 2$  mRNA copies per cell) were extracted from a publicly available dataset on hypothalamic neurons from 2-4 weeks old mice [(Romanov et al., 2016); GEO accession number GSE74672]. Briefly, the procedure to prepare a transcriptome dataset on hypothalamic neurons included: 1) isolation of a central column of the mouse hypothalamus spanning the posterior preoptic area until the arcuate nucleus (rostrocaudal axis), vertically including the paraventricular nucleus (dorsal) and laterally the ventrolateral hypothalamic area. This was achieved through microdissection from serial 300- $\mu$ m thick coronal slices under light microscopy guidance; 2) cells were dissociated using the “Papain Dissociation System” (Worthington); 3) cells were concentrated to a density of 600-1,000 cells/ $\mu$ l; 4) individual cells were separated and captured on a C1-AutoPrep IFC microfluidic chip designed for cells of 10-17- $\mu$ m in diameter (Fluidigm) (capture quality for exclusion of debris or doublets was performed manually after each experiment); 5) cells were lysed,

cDNA synthesized, amplified and tagged for high-throughput RNA sequencing (Illumina HiSeq2000 sequencer) (Romanov et al., 2015; Zeisel et al., 2015). Next, we evaluated the distribution of cells expressing Pomc transcripts in the hypothalamus through public databases on in situ mRNA hybridization (Allen Brain Atlas, Mouse Brain, experiments 2493 and 2494) and noted highly specific Pomc expression in the ARC. This validates that Pomc-expressing neurons in our single-cell RNA-seq dataset originate from the ARC, and can be used for subtype deconvolution. For the validity of our following analysis, we checked cells for outliers using Principal Component Analysis to exclude those neurons coming to the dataset because of the contamination/ectopic Pomc gene transcription. Finally, we performed differential gene expression profiling of Pomc+ neurons by using Genepattern 3.9.8 (Reich et al., 2006; <https://genepattern.broadinstitute.org>) with the “ComparativeMarkerSelection” and “ExtractComparativeMarkerResults” modules. Data were then rendered into heatmaps (HeatMapImage module) for maximum visual clarity.

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources 6.7 was used to identify the genes that had statistically significant differences in expression among the different POMC neuron subpopulations (Huang da et al., 2009a, b). To interpret our data, we used the «Functional annotation chart» tool. This tool associates gene ID with a biological term which belongs to one out of the 40 annotation categories available in DAVID, including Gene Ontology terms and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways. This extended annotation coverage increases the analytic power by allowing investigators to analyze their genes from many different biological aspects in a single space. Each functional annotation was associated with an enrichment score, which depended on the distribution of the enrichment (p-values) of each gene. A good enrichment score was

obtained when most of genes had good p-values. This score is a relative score instead of a statistical probability with a minimum and a maximum value. This means that enrichment scores could be considered only together, by comparing them.

### ***Electrophysiology***

**Brain slices preparation.** Animals were anesthetized with isoflurane, the brain extracted and immediately placed in an ice-cold oxygenated cutting solution (in mM: 180 Sucrose, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 Glucose, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 MgSO<sub>4</sub>, 0.2 CaCl<sub>2</sub>; saturated with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>). Slices were obtained using a vibratome (VT1200S Leica, Germany) and transferred into a 34°C bath of oxygenated aCSF (in mM: 123 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 Glucose, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>; osmolarity 310 mOsm/l, pH 7.4) for 30 minutes and then cooled down progressively till room temperature (RT; 23-25°C) in oxygenated aCSF. After a 45 min recovery period at RT, slices were bisected by cutting along the third ventricle axis. The hemi-slice was anchored with platinum wire at the bottom of the recording chamber and continuously bathed in oxygenated aCSF (32-34°C; 2ml/min) during recording.

**Patch-clamp recordings.** Patch electrodes were pulled (micropipette puller P-97, Sutter instrument, USA) from borosilicate glass (O.D. 1.5 mm, I.D. 0.86 mm, Sutter Instrument) to a resistance of 2-4 mΩ. Electrophysiological data were recorded using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular devices, UK), low-pass filtered at 4 kHz and digitized at 10Hz (current clamp) or 4 Hz (voltage clamp) (Digidata 1440A, Molecular devices, UK). Signals were analyzed offline (Clampfit software, pClamp 10, Molecular devices, UK). The pipette internal solution contained [in mM: 125 potassium gluconate, 5 KCl, 10 Hepes, 0.6 EGTA, 2 MgCl<sub>2</sub>, 7 Phosphocreatine, 3 adenosine-5'-triphosphate

(magnesium salt), 0.3 guanosine-5'-triphosphate (sodium salt) (pH adjusted to 7.25 with KOH; osmolarity 300 mOsm/l adjusted with d-Mannitol].

**Evaluation of RAPA effect on POMC neurons firing.** Fluorescent POMC-YFP neurons were identified onto 250  $\mu\text{m}$  thick slices obtained from 8-12 weeks old male POMC-YFP mice, using fluorescence/infrared light (pE-2 CoolLED excitation system, UK). Neurons action potential firing was monitored in whole-cell current-clamp recording configuration. For each recorded neuron, membrane potential ( $E_m$ ), membrane capacitance ( $C_m$ ) and membrane resistance ( $R_m$ ) were collected right after cell opening. After a 10 min baseline, RAPA was added in the bath for 20 minutes. For the analysis, considering the variability of the POMC neurons basal firing, the significance of RAPA-induced changes in action potential firing was calculated by comparing the firing rate before and during RAPA application (bin size of 10 sec) using a normalization via Z-score transformation of individuals instantaneous frequencies values (Courtin et al., 2014). Z-score values were calculated by subtracting bin average instantaneous frequencies to the average baseline instantaneous frequency established over at least 120 sec preceding RAPA application and by dividing the difference by the baseline standard deviation. Scores under drug application were obtained comparing the firing rate of recorded neurons 120 sec before and after 4 min of drug application. Neurons with at least 5 significant positive or negative z-score bins ( $z\text{-score} > \pm 1.96$ ,  $p < 0.05$ ) after RAPA application onset were considered as drug-responsive neurons.

**Effect of RAPA on light-evoked POMC to Parvocellular neurons neurotransmission.** Brains from POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice bilaterally injected with an AAV-DIO-hChR2 virus were obtained after 4 to 5 weeks from the AAV intra-ARC administration and 350 $\mu\text{m}$  thick brain slices were prepared following the preparation



protocol described above. Here the aCSF was modified in order to increase the neurotransmission success rate (3 mM Ca<sup>2+</sup>, 0.1 mM Mg<sup>2+</sup> and 100 $\mu$ M 4 aminopyridine). Parvocellular neurons of the PVN were differentiated from magnocellular neurons by preliminary electrophysiological analysis made right after patch breaking in current clamp configuration. Indeed, when submitted to a depolarizing current, magnocellular neurons exhibit a large transient outward rectification, not found in parvocellular neurons (Luther and Tasker, 2000; Nahar et al., 2015). Then cells were switched in voltage clamp configuration ( $V_h = -70$ mV) and synaptic transmission was evoked with a 5 milliseconds flash of blue light (470nm, 1-3mW at 0.03 Hz; pE-2 CoolLED excitation system). Light- evoked glutamatergic or GABAergic transmission were pharmacologically isolated using picrotoxin (100 $\mu$ M) or a NBQX/APV mix (10 $\mu$ M/50 $\mu$ M) respectively. RAPA was added for 20 minutes after at least 10 minutes of stable amplitude light-evoked eEPSCs or eIPSCs. At the end of each experiment, responses were fully blocked using Tetrodotoxine (TTX, 1 $\mu$ M). For statistical analysis, eEPSCs or eIPSCs amplitudes during the last 4 minutes of baseline period were compared to the amplitudes obtained after 10 minutes of RAPA perfusion (4 minutes).

**POMC neuronal type characterization by immunofluorescence.** In order to get information about the cell type of the recorded POMC neurons, we ran immunostaining against GAD65/67, a GABAergic marker. The presence of this enzyme within the cell body of the recorded cell indicated a GABAergic profile. During recording POMC neurons were filled via passive diffusion of biocytin (0.4% in internal solution, Sigma, France). Afterwards, slices were fixed overnight at 4°C in 4% PFA-containing phosphate buffer (PB). After washing (3x15min in PB), slices were permeabilized and saturated for 3 hours at RT (0.3% triton, 10% bovine serum albumin in PB). Slices were

incubated with primary antibody (anti-GAD65/67 made in rabbit, 1/2000, Millipore) for 72 hours at 4°C. Then the fluorophore-coupled secondary antibody (A647-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody, 1:500, Cell Signaling, USA) and a fluorescent streptavidin (AMCA, anti-biotin, 1/1000, Vector laboratories) were applied overnight at 4°C. Slices were mounted with fluoromount and stored at 4°C in the dark.

Pictures of POMC cells were captured using a confocal microscope with objective 63X (SP8-STED, Leica). Sampling rate respected the optic resolution of the system (voxel size: 0.0819x0.0819x0.2985  $\mu\text{m}^3$ ) and z-axis stacks were processed (around 20 images per cells). Images were acquired separately for each wavelength (blue=405nm and far red=647nm) and then merged for analysis. Using Imaris 8.1.2 software (Bitplane, Switzerland), POMC cell body volume and individual GAD65/67 staining spots (0.4  $\mu\text{m}$  diameters dots) were automatically reconstructed in 3D. A dedicated analysis module allowed making a clear distinction between the GAD65/67 spots located around the cell and the ones present within the cell body of the POMC neuron.

## Supplemental References

Alexander, G.M., Rogan, S.C., Abbas, A.I., Armbruster, B.N., Pei, Y., Allen, J.A., Nonneman, R.J., Hartmann, J., Moy, S.S., Nicoletis, M.A., *et al.* (2009). Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 63, 27-39.

Atasoy, D., Aponte, Y., Su, H.H., and Sternson, S.M. (2008). A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 7025-7030.

Brown, L.M., Clegg, D.J., Benoit, S.C., and Woods, S.C. (2006). Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiology & behavior* 89, 687-691.

Courtin, J., Chaudun, F., Rozeske, R.R., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., Abdi, A., Baufreton, J., Bienvenu, T.C., and Herry, C. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* 505, 92-96.

Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* 37, 1-13.

Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4, 44-57.

Luther, J.A., and Tasker, J.G. (2000). Voltage-gated currents distinguish parvocellular from magnocellular neurones in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *The Journal of physiology* 523 Pt 1, 193-209.

Marsicano, G., and Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *The European journal of neuroscience* 11, 4213-4225.

Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglansberger, W., *et al.* (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418, 530-534.

Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutierrez, S.O., van der Stelt, M., *et al.* (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302, 84-88.

Monory, K., Massa, F., Egertova, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R., Kelsch, W., Jacob, W., Marsch, R., Ekker, M., *et al.* (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51, 455-466.

Nahar, J., Haam, J., Chen, C., Jiang, Z., Glatzer, N.R., Muglia, L.J., Dohanich, G.P., Herman, J.P., and Tasker, J.G. (2015). Rapid Nongenomic Glucocorticoid Actions in Male Mouse Hypothalamic Neuroendocrine Cells Are Dependent on the Nuclear Glucocorticoid Receptor. *Endocrinology* 156, 2831-2842.

Papadopoulos, A.D., and Wardlaw, S.L. (1999). Endogenous alpha-MSH modulates the hypothalamic-pituitary-adrenal response to the cytokine interleukin-1beta. *Journal of neuroendocrinology* 11, 315-319.

Reich, M., Liefeld, T., Gould, J., Lerner, J., Tamayo, P., and Mesirov, J.P. (2006). GenePattern 2.0. *Nature genetics* 38, 500-501.

Romanov, R.A., Alpar, A., Zhang, M.D., Zeisel, A., Calas, A., Landry, M., Fuszard, M., Shirran, S.L., Schnell, R., Dobolyi, A., *et al.* (2015). A secretagogen locus of the mammalian hypothalamus controls stress hormone release. *The EMBO journal* 34, 36-54.

Romanov, R.A., Zeisel, A., Bakker, J., Girach, F., Hellysaz, A., Tomer, R., Alpar, A., Mulder, J., Clotman, F., Keimpema, F., *et al.* (2016). A novel organizing principle of the hypothalamus reveals molecularly segregated periventricular dopamine neurons. Submitted.

Tsigos, C., Crosby, S.R., Gibson, S., Young, R.J., and White, A. (1993). Proopiomelanocortin is the predominant adrenocorticotropin-related peptide in human cerebrospinal fluid. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 76, 620-624.

Zeisel, A., Munoz-Manchado, A.B., Codeluppi, S., Lonnerberg, P., La Manno, G., Jureus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., *et al.* (2015). Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* 347, 1138-1142.

## Supplemental Figure Legends

### **Figure S1. POMC GABA, POMC glutamatergic and POMC GABA/glutamatergic neurons have specific gene expression profile, Related to Figure 1.**

Neurotransmitter type-specific single cell transcriptome profiling of hypothalamic Pomc<sup>+</sup> neurons. The heat map illustrates top rank 100 genes differently expressed in each Pomc<sup>+</sup> neurotransmitter-determined group (GABA, GLUT and GABA/GLUT, indicated by green rectangle). Left to heatmaps – p values for log transformed data, right – gene names.

### **Figure S2. POMC neurons differently respond to mTORC1 blockade depending on their neurotransmitter type, Related to Figure 2.**

(A, B) Taking all analyzed POMC neurons together (n=72 cells), they exhibit a small, non-significant firing decrease in response to RAPA perfusion. (C) Effect of RAPA treatment on cell membrane potential in POMC RAPA<sup>act</sup> neurons ( $+2.01 \pm 0.42$  mV, n=20 cells) and in POMC RAPA<sup>inh</sup> neurons ( $-1.07 \pm 0.37$  mV, n=26 cells). (D) POMC RAPA<sup>act</sup> neurons tend to have a more frequent basal firing than POMC RAPA<sup>inh</sup> neurons. Data are mean  $\pm$  SEM. \*\*\*p<0.001.

### **Figure S3. Expression of raptor and rictor protein in hypothalamic POMC neurons and use of DREADD to activate POMC neurons, Related to Figure 4. (A,**

**B)** Representative images illustrating raptor (red) protein expression in POMC-expressing neurons (green) in the ARC of POMC-*Raptor*-WT and POMC-*Raptor*-KO littermates (A) and related quantification (B) (n=6 mice per group). (C, D) Representative images illustrating rictor (red) protein expression in POMC-expressing neurons (green) in the ARC of POMC-*Rictor*-WT and POMC-*Rictor*-KO littermates (C)

and related quantification (D) (n=7-8 mice per group). **(E-G)** Representative images (E) from the ARC of ARC<sup>hM3Dq</sup> POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice treated with CNO or its vehicle and related quantification (F, G) showing that acute CNO administration induces c-Fos expression (green, E and F) and phosphorylation of the mTORC1-downstream target S6 (p-S6, purple, E and G) in CNO-activated-POMC neurons (red, E) (n=3-14 mice per group). **(H)** Effect of repeated daily administration of CNO (twice a day for 3 days) on the food intake of ARC<sup>hM3Dq</sup> POMC-Cre<sup>+/+</sup> mice (n= 4 mice per group). Data are mean  $\pm$  SEM. \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001. V: 3<sup>rd</sup> ventricle. Scale bar in A, C and E: 50  $\mu$ m; 5  $\mu$ m for smaller inset in A and C; and 10  $\mu$ m for smaller inset in E.

**Figure S4. Dose response of the  $\alpha$ -MSH analog MTII on food intake and MTII action on hypothalamic AEA levels, Related to Figure 5.** **(A)** Dose-response effect of an icv administration of MTII on 2h fast-induced food intake in C57BL/6J mice (n=6-23 mice per group). **(B)** Hypothalamic AEA content in refed C57BL/6J mice treated with MTII (0.02  $\mu$ g, icv) or its vehicle (n=6 mice per group). Data are mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

**Figure S5. Expression of CB<sub>1</sub> receptor mRNA in AgRP neurons and effect of a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist on food intake, Related to Figure 6.** **(A, B)** Representative images taken at the level of the ARC (A) and related quantification (B) of fluorescent *in situ* hybridization studies showing colocalization of CB<sub>1</sub>R mRNA expression (green color) in AgRP mRNA-positive neurons (red color) of POMC-CB<sub>1</sub>-WT and POMC-CB<sub>1</sub>-KO littermates (n=3 mice per group). Nuclear counterstain carried out with DAPI. **(C, D)** Dose-response effect of an icv administration of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin (Ptx) on 2h and 24h fast-induced food intake in

C57BL/6J mice (n=6-8 mice per group). Data are mean  $\pm$  SEM. \*\*p<0.01. V: 3<sup>rd</sup> ventricle. Scale bar in C: 50  $\mu$ m and 5  $\mu$ m for smaller inset.



**Table S1.** POMC and POMC-derived peptides ACTH and  $\beta$ -EP levels in the hypothalamus and endocannabinoid levels in the cortex and the hippocampus of mice fasted or refed and treated with an icv injection of RAPA or its vehicle. Data are Mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis among groups by one-way ANOVA.

Analyte	Fasted/Veh	Refed/Veh	Refed/RAPA	N mice	p-value
POMC (fmol/mg prot)	254.18 $\pm$ 14.84	292.94 $\pm$ 29.62	281.99 $\pm$ 24.07	8	0.501159
ACTH (fmol/mg prot)	71.98 $\pm$ 11.06	84.88 $\pm$ 12.95	78.91 $\pm$ 8.15	8	0.707979
$\beta$ -EP (fmol/mg prot)	462.20 $\pm$ 13.89	620.00 $\pm$ 47.30	502.45 $\pm$ 12.84	8	0.129059
AEA (fmol/mg tissue)					
<i>Hippocampus</i>	38.16 $\pm$ 9.01	43.14 $\pm$ 9.96	42.86 $\pm$ 10.63	4-5	0.755380
<i>Cortex</i>	34.56 $\pm$ 2.83	38.72 $\pm$ 3.92	38.25 $\pm$ 6.01	4-5	0.842681
2-AG (pmol/mg tissue)					
<i>Hippocampus</i>	12.75 $\pm$ 4.18	14.89 $\pm$ 2.55	13.85 $\pm$ 3.71	4-5	0.664832
<i>Cortex</i>	16.84 $\pm$ 0.44	15.38 $\pm$ 0.62	16.53 $\pm$ 1.93	4-5	0.683500

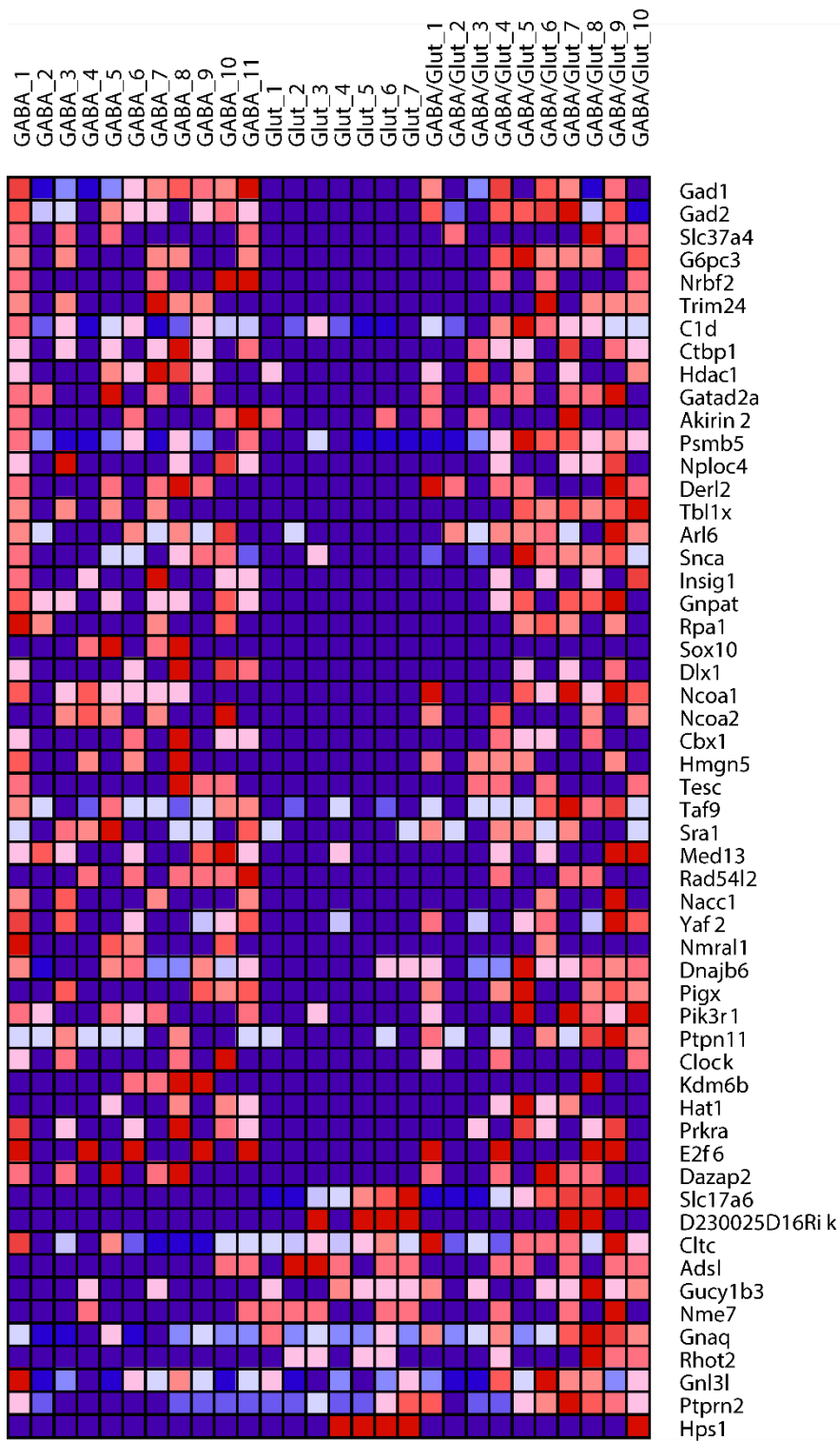
**Table S2.** Statistical analyses for main figures.

Figure	Dependent variable(s)	Factor Analyzed	Analysis (post-hoc test reported in figure)	n	Degree of freedom & F/t/R etc value	P value
2C	POMC AP firing	Treatment	Paired t-test	26 cells	t=5.502 df=25	p<0.0001
2E	POMC AP firing	Treatment	Paired t-test	20 cells	t=4.132 df=19	p=0.0006
2F	POMC cell Em	Group	Unpaired t-test	20-26 cells	t=3.164 df=44	p=0.0028
2G	POMC cell Cm	Group	Unpaired t-test	20-26 cells	t=5.355 df=44	p<0.0001
2H	Correlation RAPA effect vs POMC size	Firing change under RAPA vs Cm	Linear Regression	46 cells	R <sup>2</sup> =0.23	p=0.0012
2I	POMC cell Rm	Group	Unpaired t-test	20-26 cells	t=4.862 df=44	p<0.0001
2K	GAD spots/Cm	Group	Unpaired t-test	4-5 cells	t=4.571 df=5	p=0.0060
2L	Correlation GAD staining vs POMC size	Cm vs GAD staining quantity	Linear Reg.	15 cells	R <sup>2</sup> =0.471	p=0.0047
3D	Change in eEPSC amplitude	Treatment	Paired t-test	6 cells	t=5.883 df=24	p<0.0001
3E	Change in eIPSC amplitude	Treatment	Paired t-test	5 cells	t=2.821 df=20	p=0.0109
4B	% c-Fos positive POMC neurons	Treatment	One-way ANOVA	8-10	F (2, 25) = 24.159	p<0.0001
4C	% of p-S6 in c-Fos positive POMC neurons	Treatment	One-way ANOVA	8-10	F (2, 25) = 17.275	p<0.0001
4D	2h food intake	Treatment	Unpaired t-test	5	t=2.359 df=8	p=0.0460
4E	2h food intake	Genotype	Two-way ANOVA	9-12	F (1, 38) = 5.977	p=0.0192
4E	2h food intake	Treatment	Two-way ANOVA	9-12	F (1, 38) = 9.717	p=0.0035
4E	2h food intake	Interaction	Two-way ANOVA	9-12	F (1, 38) = 5.114	p=0.0295
4F	2h food intake	Genotype	Two-way ANOVA	5	F (1, 16) = 2.905	p=0.1076
4F	2h food intake	Treatment	Two-way ANOVA	5	F (1, 16) = 8.418	p=0.0104
4F	2h food intake	Interaction	Two-way ANOVA	5	F (1, 16) = 0.806	p=0.3826
4G	2h food intake	IP Treatment	Two-way ANOVA	6-22	F (1, 62) = 6.148	p=0.0159
4G	2h food intake	ICV Treatment	Two-way ANOVA	6-22	F (1, 62) = 1.974	p=0.1650
4G	2h food intake	Interaction	Two-way ANOVA	6-22	F (1, 62) = 4.565	p=0.0365
4H	2h food intake	IP Treatment	Two-way ANOVA	7-8	F (1, 25) = 0.166	p=0.6874
4H	2h food intake	ICV Treatment	Two-way ANOVA	7-8	F (1, 25) = 4.332	p=0.0478
4H	2h food intake	Interaction	Two-way ANOVA	7-8	F (1, 25) = 0.001	p=0.9700
5B	α-MSH levels	Treatment	One-way ANOVA	8	F (2, 21) = 4.440	p=0.0246
5C	α-MSH/POMC	Treatment	Unpaired t-test	8	t=2.873 df=14	p=0.0123
5D	α-MSH/ACTH	Treatment	Unpaired t-test	8	t=2.646 df=14	p=0.0192
5E	α-MSH/β-EP	Treatment	Unpaired t-test	8	t=2.807 df=14	p=0.0140
5F	AEA levels	Treatment	One-way ANOVA	3-5	F (2, 10) = 4.737	p=0.0357
5G	2-AG levels	Treatment	One-way ANOVA	4-5	F (2, 11) = 0.225	p=0.8024
5H	AEA levels	Treatment	Unpaired t-test	6	t=2.556 df=10	p=0.0286
5I	AEA levels	Treatment	Unpaired t-test	8-10	t=2.171 df=16	p=0.0453
6A	2h food intake	Treatment	One-way ANOVA	9-10	F (3, 33) = 4.339	p=0.0110
6B	2h food intake	Genotype	Two-way ANOVA	9-13	F (1, 40) = 28.037	p<0.0001
6B	2h food intake	Treatment	Two-way ANOVA	9-13	F (1, 40) = 4.208	p=0.0468
6B	2h food intake	Interaction	Two-way ANOVA	9-13	F (1, 40) = 5.233	p=0.0063
6D	%CB <sub>1</sub> mRNA in POMC neurons	Genotype	Unpaired t-test	3	t=33.212 df=4	p<0.0001
6E	2h food intake	Genotype	Two-way ANOVA	7-26	F (1, 89) = 1.318	p=0.2540
6E	2h food intake	Treatment	Two-way ANOVA	7-26	F (2, 89) = 28.280	p<0.0001
6E	2h food intake	Interaction	Two-way ANOVA	7-26	F (2, 89) = 4.910	p=0.0095

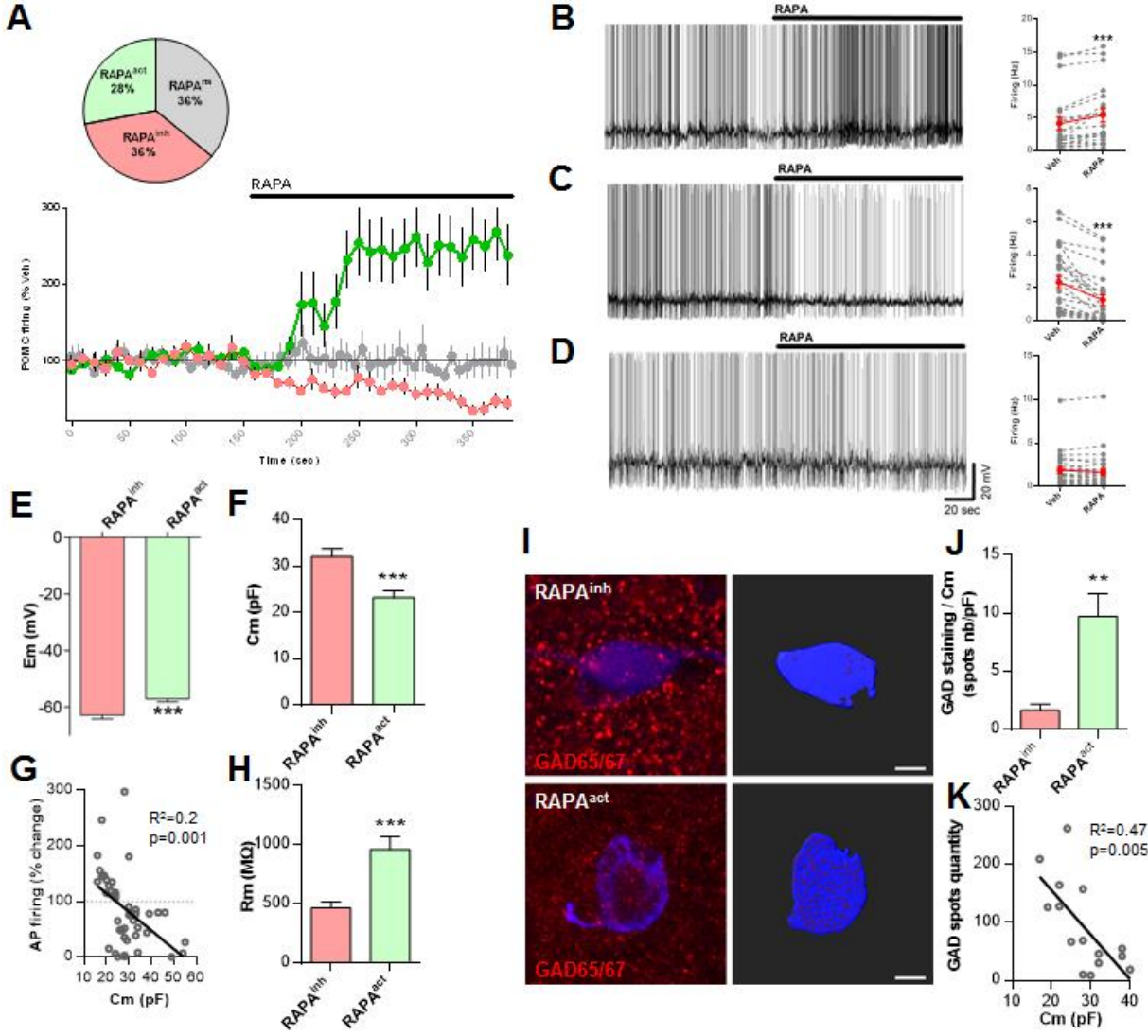
**Table S3.** Statistical analyses for supplemental figures.

Figure	Dependent variable(s)	Factor Analyzed	Analysis (post-hoc test reported in figure)	n	Degree of freedom & F/t/R etc value	P value
S2A	POMC AP firing	Treatment	Paired t-test	72 cells	t=0.6964 df=71	p=0.4885
S2C	Change in Em under RAPA	Group	Unpaired t-test	20-26 cells	t=5.381 df=44	p<0.0001
S2D	Basal firing of POMC cell	Group	Unpaired t-test	20-26 cells	t=1.782 df=44	p=0.0816
S3B	% of Raptor expression in POMC neurons	Genotype	Unpaired t-test	6	t=24.736 df=10	p<0.0001
S3D	% of Rictor expression in POMC neurons	Genotype	Unpaired t-test	7-8	t=51.505 df=13	p<0.0001
S3F	%mCherry-labeled c-Fos positive neurons	Treatment	Unpaired t-test	3/14	t=4.592 df=15	p=0.0003
S3G	% of P-S6 in mCherry and c-Fos positive POMC neurons	Treatment	Unpaired t-test	3/14	t=7.241 df=15	p<0.0001
S3H	Food intake	Treatment	Paired t-test	4	t=8.692 df=3	p=0.0032
S4A	2h food intake	Treatment	One-way ANOVA	6-23	F (7, 67) = 7.475	p<0.0001
S4B	AEA levels	Treatment	Unpaired t-test	6	t=0.183 df=10	p=0.8584
S5B	% CB <sub>1</sub> mRNA in AgRP neurons	Genotype	Unpaired t-test	3	t=0.511 df=4	p=0.6360
S5C	2h food intake	Treatment	One-way ANOVA	6-8	F (3, 25) = 0.770	p=0.5217
S5D	24h food intake	Treatment	One-way ANOVA	6-8	F (3, 25) = 5.000	p=0.0075

Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**

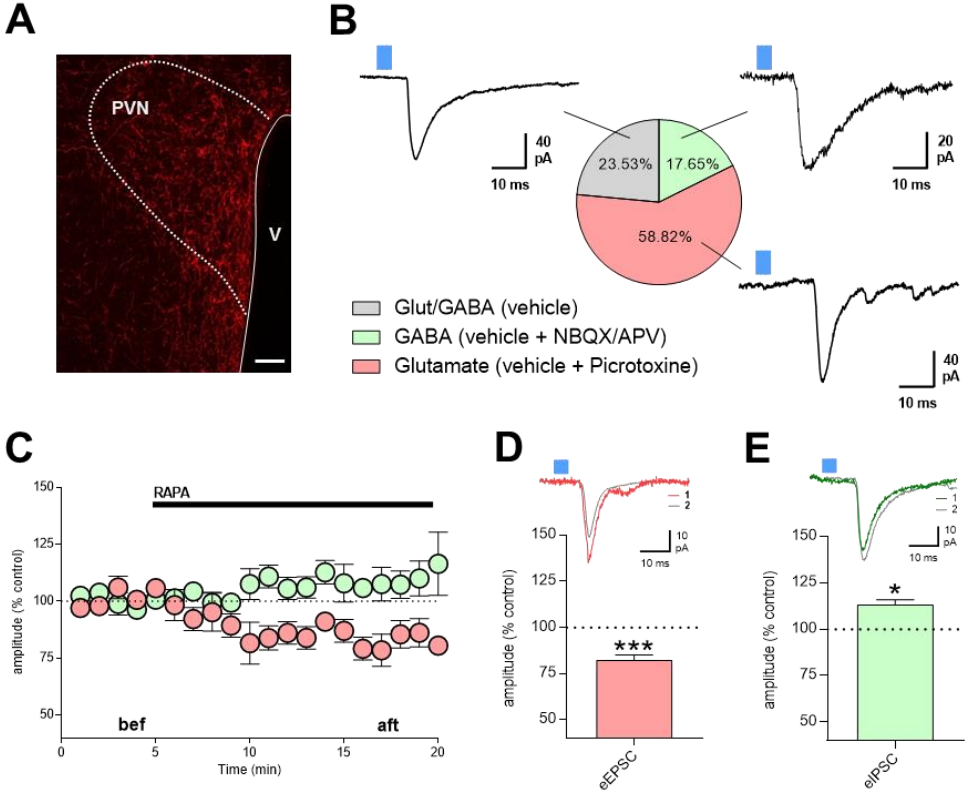
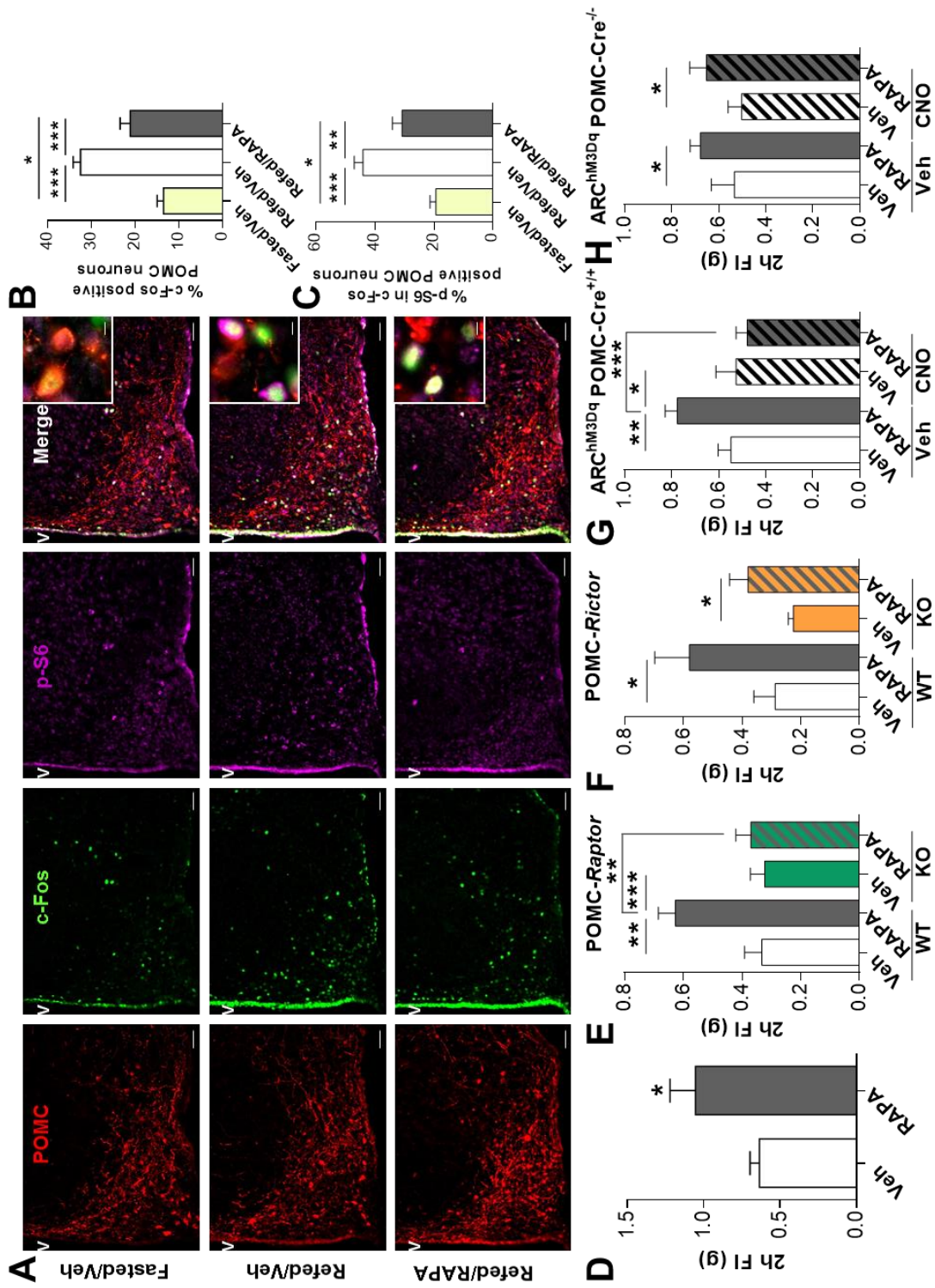
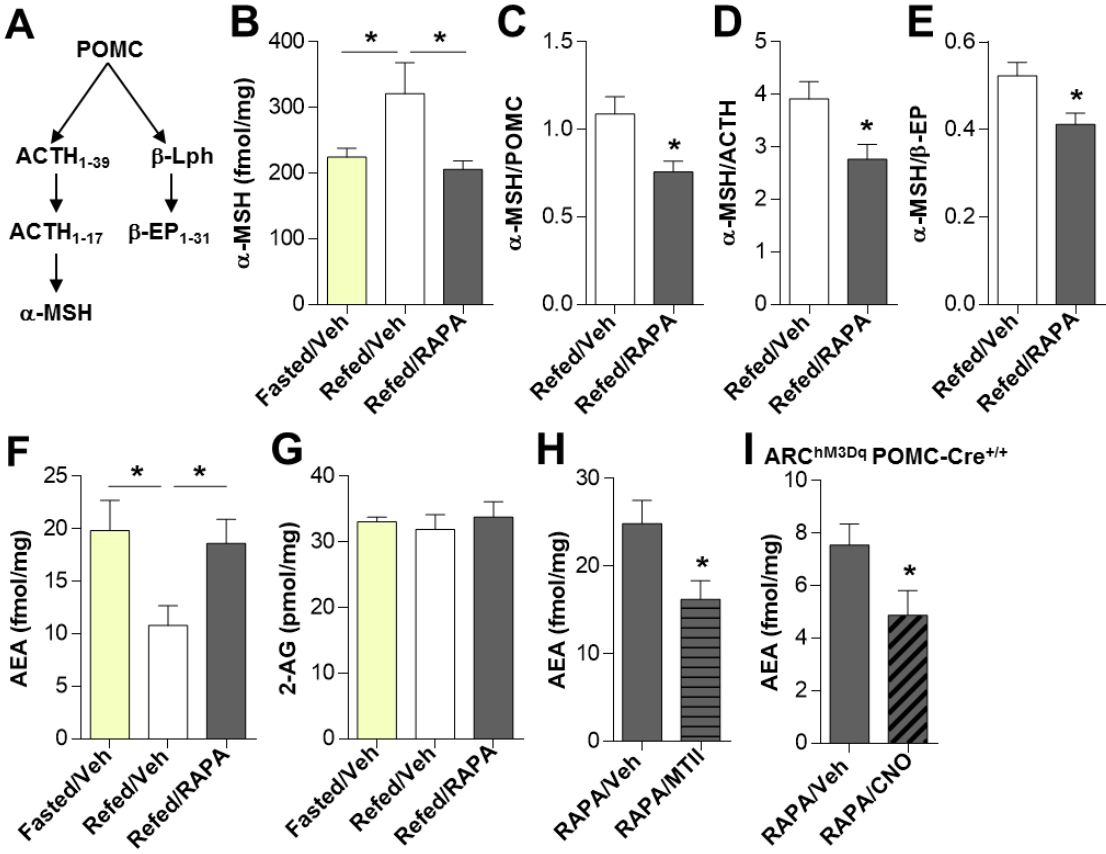


Figure 4



**Figure 5**





**Figure 6**

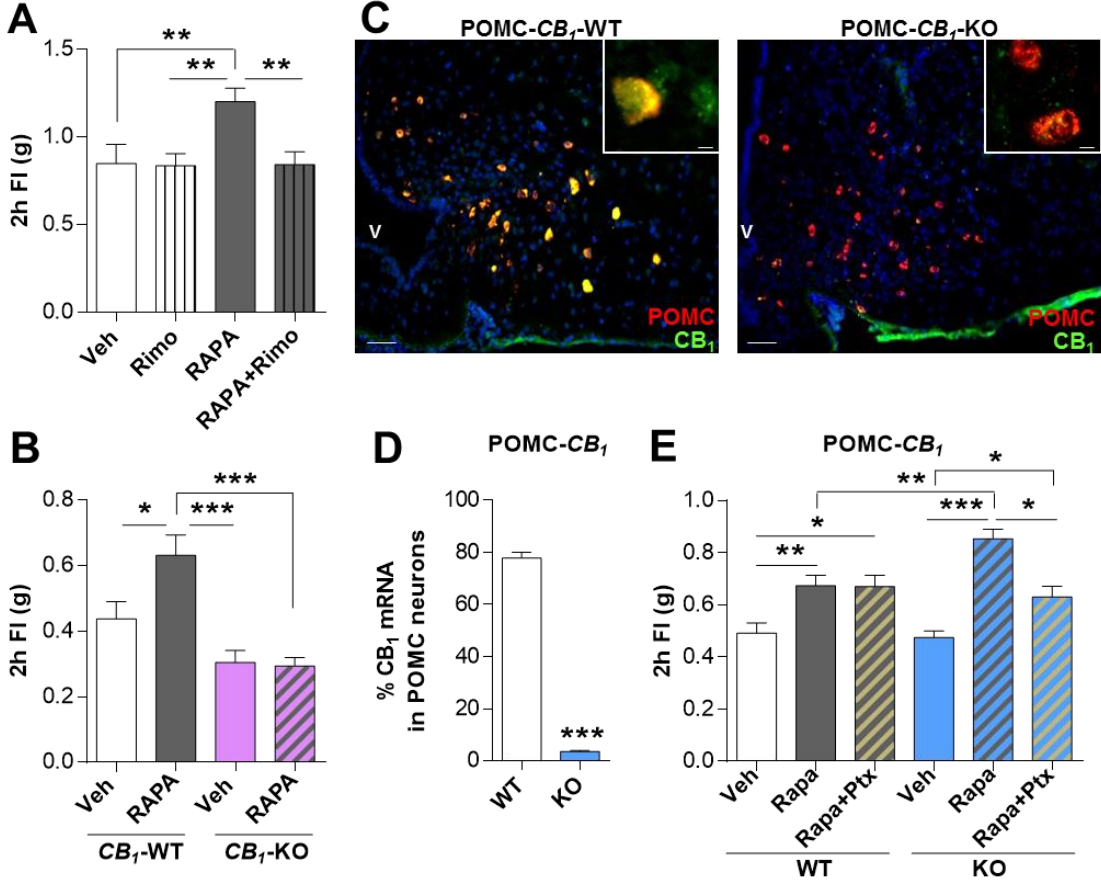
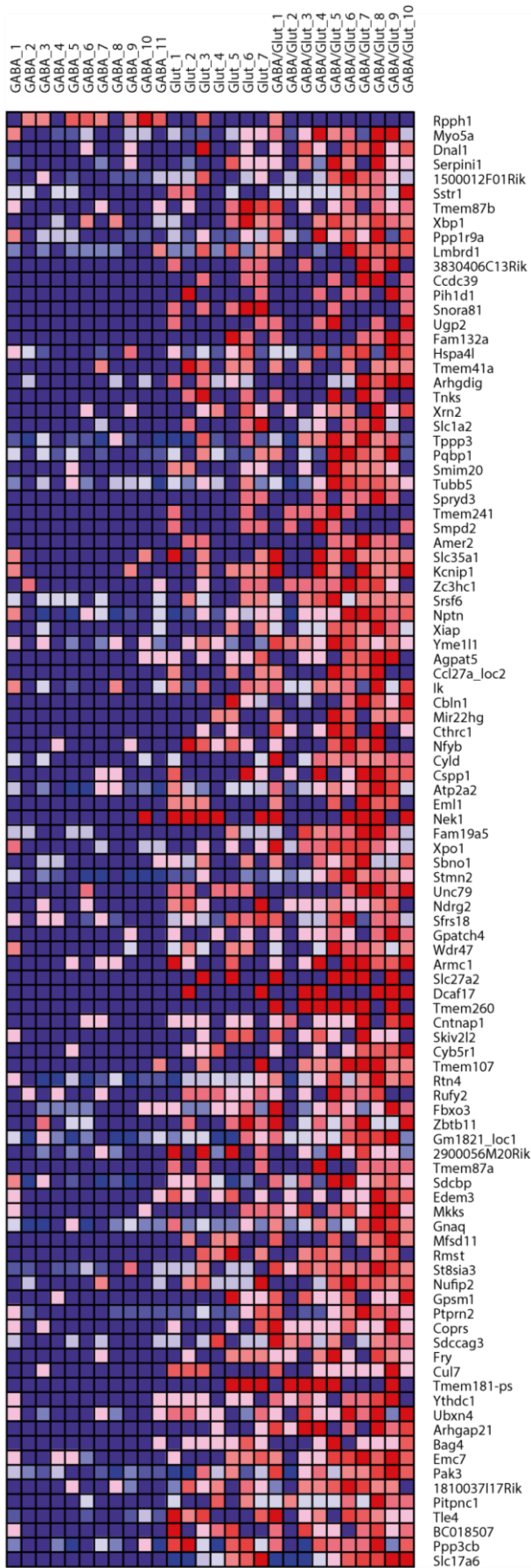
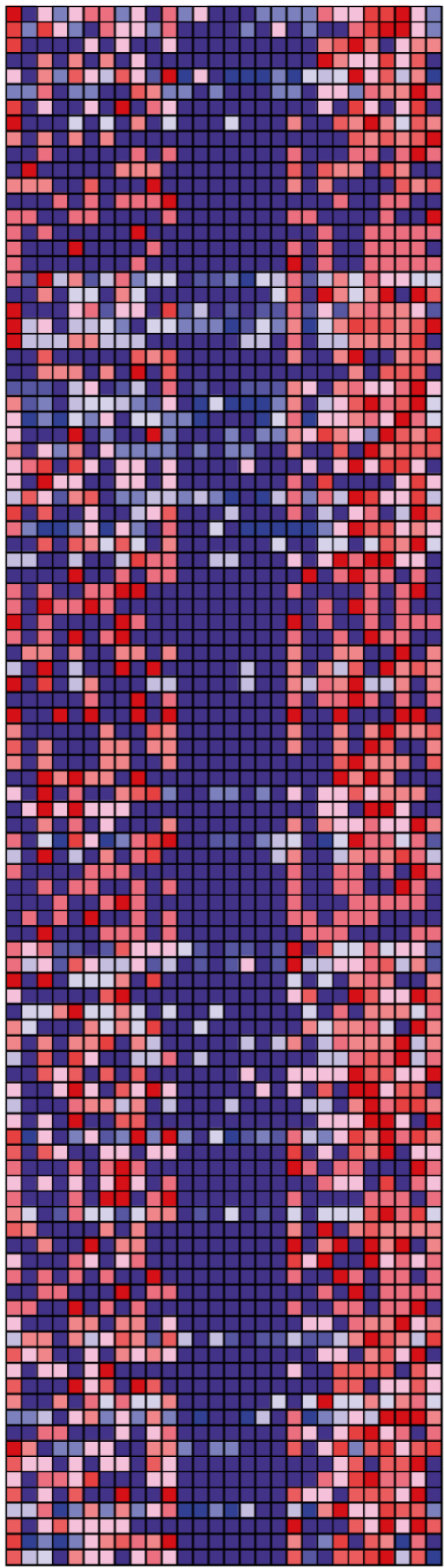


Figure S1

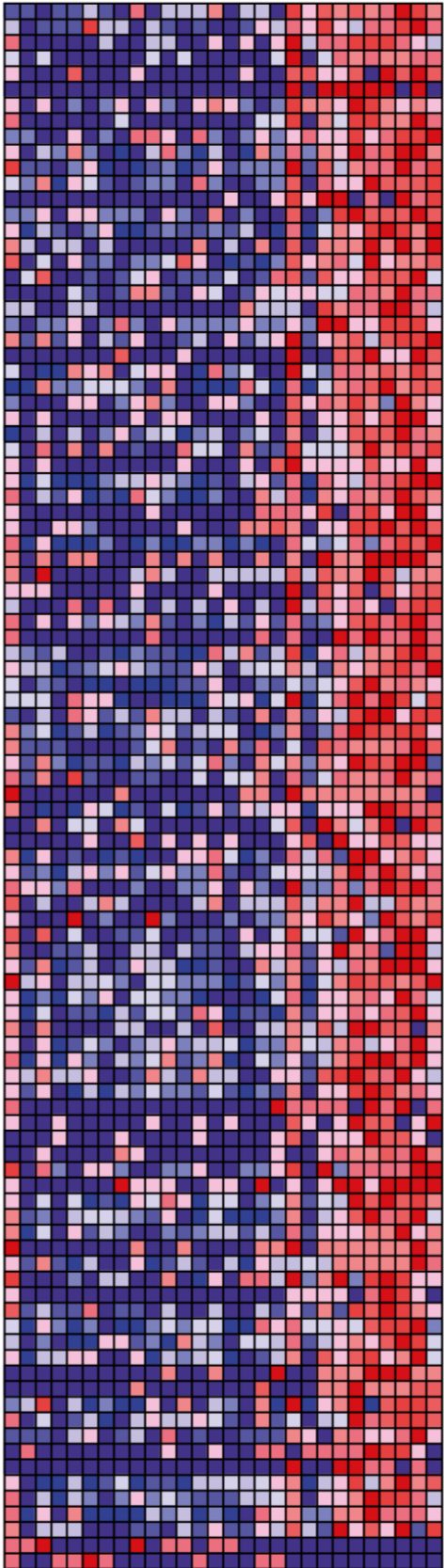


GABA\_1  
 GABA\_2  
 GABA\_3  
 GABA\_4  
 GABA\_5  
 GABA\_6  
 GABA\_7  
 GABA\_8  
 GABA\_9  
 GABA\_10  
 GABA\_11  
 Glut\_1  
 Glut\_2  
 Glut\_3  
 Glut\_4  
 Glut\_5  
 Glut\_6  
 Glut\_7  
 GABA/Glut\_1  
 GABA/Glut\_2  
 GABA/Glut\_3  
 GABA/Glut\_4  
 GABA/Glut\_5  
 GABA/Glut\_6  
 GABA/Glut\_7  
 GABA/Glut\_8  
 GABA/Glut\_9  
 GABA/Glut\_10



Ube2r2  
 Sgta  
 Cntnap2  
 Gfra2  
 H3f3b  
 Mapk9  
 Prkra  
 Tmem128  
 Tbl1x  
 Slc25a16  
 Pkib  
 Ppp1cc  
 Rad54l2  
 Lrrn1  
 42258  
 Nol12  
 Rnf38  
 Wdr6  
 Akirin1  
 Ndufb2  
 Gaa  
 Wdr33  
 Pigx  
 Tpgs1  
 Snrpd3  
 Impact  
 Dnajc5  
 Ssr3  
 Dtna  
 Prr3  
 Rpl7l1  
 Psma5  
 Yaf2  
 Psmb5  
 Tbc1d10b  
 Coq7  
 Snapc3  
 Lysmd1  
 Cih1a  
 Rapgef1  
 Dazap2  
 Ctage5  
 Dusp8  
 Vamp4  
 Snhg10  
 E2f6  
 Pde4d  
 Acvr2a  
 G6pc3  
 Tmpo  
 Chchd6  
 Map4k3  
 Smap1  
 Cox8a  
 Pdp1  
 Neur11a  
 Unc50  
 Mrif  
 Gm8234  
 Pard3  
 Ostc  
 Magee1  
 Prthd1  
 Slc35e3  
 Atp13a2  
 Arl6  
 Ankrd10  
 Moap1  
 Dnajc18  
 1110032A03Rik  
 Gapvd1  
 Kcnk2  
 Nap1l5  
 Fam98b  
 Derl2  
 Ctbp1  
 Klhl12  
 Taf9  
 Gsr  
 Irak1bp1  
 Fgf13  
 4933439C10Rik  
 Smarce1  
 Gatad2a  
 Chchd3  
 Agap3  
 Rnf208  
 Pex19  
 Samd4  
 Cxhc4  
 Serinc3  
 Ddx18  
 Akap6  
 Gnpat  
 Gm14305  
 Rab9  
 Pdia6  
 Ncoa1  
 Gad1  
 Gad2

GABA\_1  
GABA\_2  
GABA\_3  
GABA\_4  
GABA\_5  
GABA\_6  
GABA\_7  
GABA\_8  
GABA\_9  
GABA\_10  
GABA\_11  
Glut\_1  
Glut\_2  
Glut\_3  
Glut\_4  
Glut\_5  
Glut\_6  
Glut\_7  
GABA/Glut\_1  
GABA/Glut\_2  
GABA/Glut\_3  
GABA/Glut\_4  
GABA/Glut\_5  
GABA/Glut\_6  
GABA/Glut\_7  
GABA/Glut\_8  
GABA/Glut\_9  
GABA/Glut\_10



St8sia3  
Ubqln2  
Xpo1  
Cylid  
Tbc1d9  
Tmem260  
Yme11i  
Namp1  
Atf4  
Mbnl2  
Rab6a  
Bex2  
Arhgap21  
Tax1bp1  
Cnntn1  
Cyb5b  
Kif21a  
Raly1  
Atf2  
Fam19a5  
Nus1  
Bex1  
Arhgdia  
Amd2  
Usp34  
Reep1  
Ckap5  
Actg1  
Gabrb3  
Coprs  
Rtn1  
Ywhag  
Mkks  
Emc7  
Eid1  
Wasf1  
Dnajc27  
Zc3h14  
Trim35  
Ywhab  
Utp11i  
Pak3  
Ndn  
Stmn2  
Ddx3x  
Gdi2  
Timm8b  
Map2k4  
Wbp5  
Tpr  
Psme3  
Nptn  
Akirin1  
Rbm17  
Sdcbp  
Ldha  
Casc4  
Ubr3  
Ssr3  
Atad1  
Myo5a  
Ywhah  
Gaa  
Dnajc5  
Ubc  
Bmpr2  
Arf1  
Ndufa4  
Cetn3  
Zcchc18  
Pcsk1  
Chrcl1  
1110059G10Rik  
Them4  
Ppp2ca  
Mal2  
Atp6v1b2  
Impact  
Gnas  
Ube2a  
Metap2  
Dner  
Pnrc1  
Dync1i1  
Gm1821\_loc1  
Atp2a2  
Psm6  
Tmem107  
Hdac6  
Chn1  
Ywhaz  
Snrpd3  
Zc3hc1  
Hps3  
Rtn4  
Matr3  
Ssb  
Ppp1r9a  
Nif3l1  
Smox

Figure S2

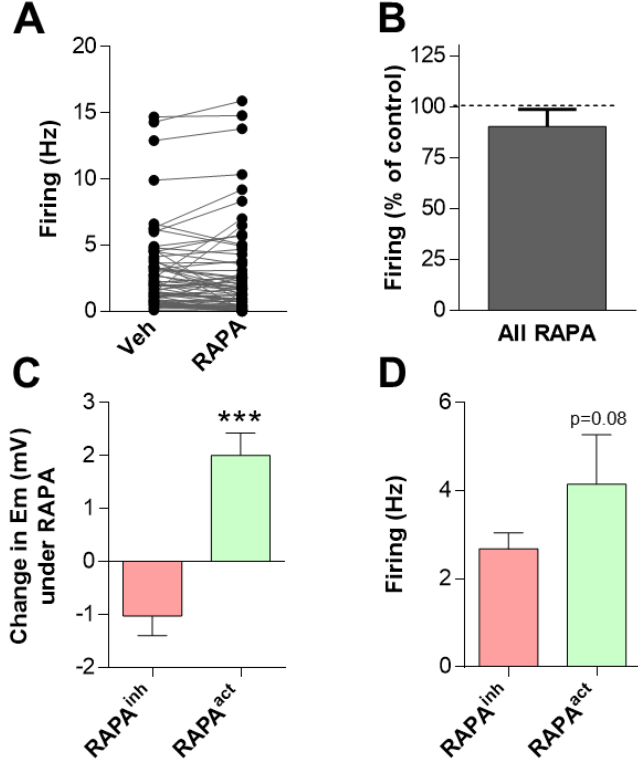


Figure S3

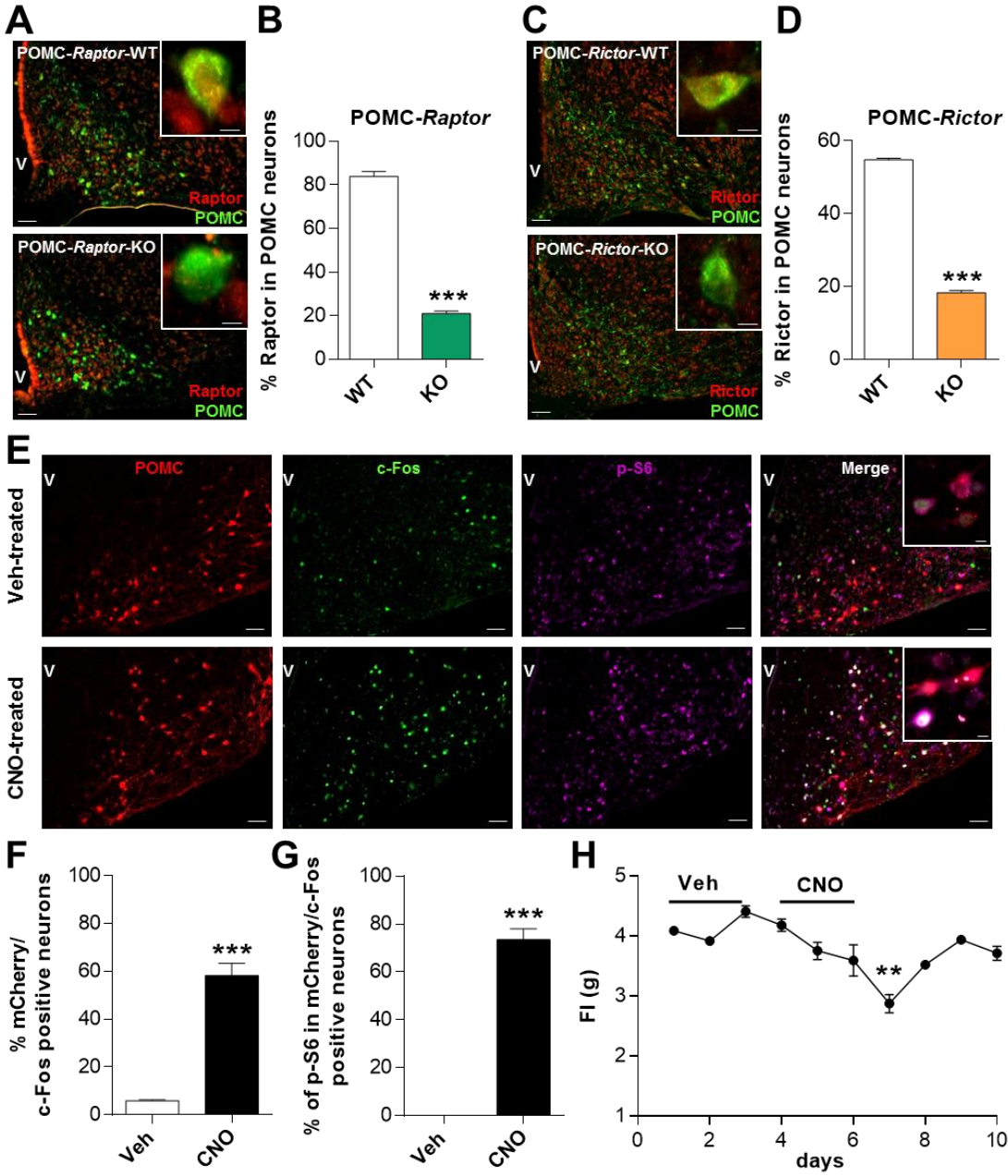


Figure S4

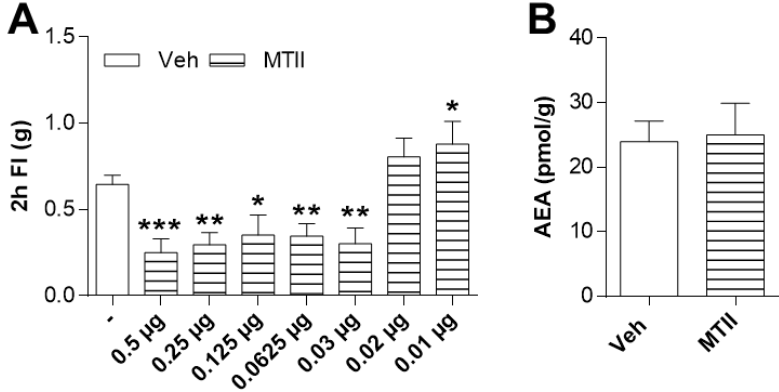
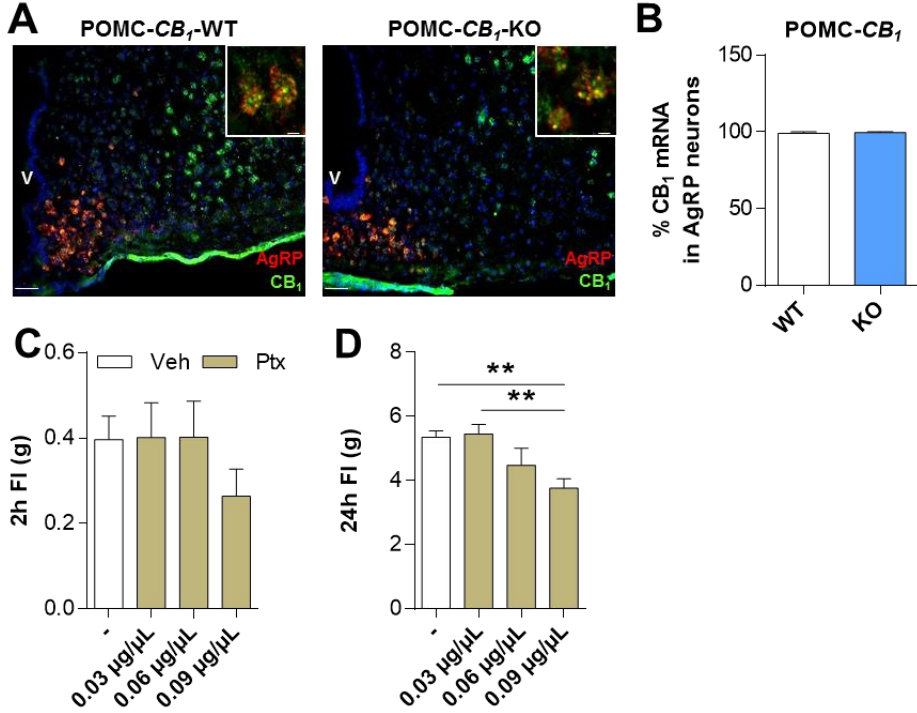


Figure S5







## **Discussion et perspectives**

### *Les neurones à POMC ont un profil hétérogène*

Nos résultats démontrant l'existence de trois sous-populations de neurones à POMC au sein de l'hypothalamus capables de libérer, en plus de POMC, du glutamate, du GABA ou les deux, confirment les études électrophysiologiques et neuroanatomiques décrivant l'hétérogénéité de la population des neurones à POMC au niveau hypothalamique (Hentges et al., 2004 ; Hentges et al., 2009 ; Dicken et al., 2012 ; Jarvie and Hentges, 2012 ; Wittmann et al., 2013).

Cette hétérogénéité ne renseigne cependant pas sur le rôle exact et l'implication de chacune de ces sous-populations neuronales dans la régulation de la balance énergétique ou autres fonctions habituellement impactées par les neurones à POMC. Ces trois sous-populations ont alors été caractérisées de manière plus approfondie en se basant sur leur profil d'expression génétique différentiel en utilisant une analyse de séquençage des RNAs en cellule unique. En particulier, les neurones à POMC GABAergiques présentent une expression enrichie de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides ainsi que la transcription et le catabolisme des protéines. A l'inverse, les neurones à POMC glutamatergiques arborent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la fonction des vésicules synaptiques, le métabolisme des purines et la liaison du GTP. Quant à la sous-population produisant du glutamate et du GABA, elle présente un phénotype intermédiaire, et la RAPA n'a aucun effet significatif sur l'excitabilité de ces neurones.

Ces données transcriptionnelles corrélées à nos données comportementales pourraient indiquer que les neurones à POMC GABAergiques sont à l'initiative de la prise alimentaire, tandis que les neurones à POMC glutamatergiques pourraient constituer un frein via la libération vésiculaire de glutamate. Une prochaine étape de nos études sur le contrôle différentiel des neurones à POMC sur la prise alimentaire pourrait être d'activer sélectivement l'une ou l'autre sous-population neuronale, par une approche pharmacogénétique (DREADD), en association à une inhibition de la transmission GABAergique ou glutamatergique lors d'un paradigme de « refeeding », afin de pouvoir certifier le bien-fondé de notre hypothèse.

### *Les neurones à POMC nécessitent une voie de mTORC1 fonctionnelle afin de réguler la prise alimentaire*

Nous fûmes les premiers à suggérer une possible implication de la voie de mTORC1 dans la régulation hypothalamique de la balance énergétique (Cota et al., 2006). Depuis, certaines équipes de recherche ont notamment étudié l'impact d'une suractivation chronique de la voie

de mTORC1 dans les neurones à POMC et ont observé des changements morphologiques et fonctionnels au sein des neurones à POMC, conduisant à une hyperphagie et une obésité (Mori et al., 2009 ; Yang et al., 2012).

Dans notre cas, nous avons montré que mTORC1 est activé dans les neurones à POMC lors d'un paradigme de « refeeding ». Alors que l'inhibition de mTORC1 par administration centrale de RAPA chez la souris entraîne une hyperphagie lors d'un paradigme de « refeeding », et nécessite une voie de mTORC1 fonctionnelle dans les neurones à POMC. En effet, l'administration centrale de RAPA chez les souris POMC-*Raptor*-KO, dépourvues d'une voie de mTORC1 fonctionnelle, n'altère pas la prise alimentaire. Ces données démontrent pour la première fois que les neurones à POMC recrutent et nécessitent une voie de mTORC1 fonctionnelle afin de moduler la prise alimentaire.

Nos données électrophysiologiques montrent également que l'inhibition de mTORC1 par la RAPA ne module pas uniformément l'excitabilité des neurones à POMC, puisque la RAPA inhibe les neurones à POMC de type glutamatergique, tandis qu'elle active les neurones à POMC de type GABAergique. D'autres études doivent être menées afin de comprendre quels canaux ioniques pourraient être altérés par l'inhibition de mTORC1 et si ces différents canaux ioniques modulés par la RAPA pourraient expliquer la régulation opposée des neurones à POMC de type GABAergique et de type glutamatergique.

Il serait également intéressant d'observer les effets de l'inhibition de mTORC1 sur l'activité et la fonction des neurones à POMC lors du développement d'une DIO afin d'étudier quand et quelles sont les conséquences d'un changement de régime alimentaire calorifique. Nos données préliminaires obtenues chez des souris exposées pendant une semaine à un régime HFD suggèrent des changements très précoces sur la capacité de la RAPA à moduler l'activité électrique ainsi que la transmission synaptique des neurones à POMC, mais également sur la modulation de la prise alimentaire lors d'un paradigme de « refeeding ».

#### *Les neurones à POMC régulent la prise alimentaire via l'action de l'ECS*

L'ECS est depuis longtemps considéré comme jouant un rôle clé dans la régulation de la balance énergétique. Dans notre étude, nous montrons que l'hyperphagie induite par la RAPA est médiée par la diminution des niveaux du peptide anorexigène  $\alpha$ -MSH, mais également par l'augmentation de l'endocannabinoïde orexigène AEA. Ces effets sont bloqués par l'activation spécifique des neurones à POMC par une approche pharmacogénétique. Nos données suggèrent comme d'autres l'ont fait auparavant que l'ECS se situe en aval de l'action des mélanocortines dans la modulation de la prise alimentaire (Verty et al., 2004 ; Matias et al., 2008; Monge-

Roffarello et al., 2014), mais également que les voies de mTORC1 et de l'ECS semblent interconnectées afin de moduler le système mélanocortine et ainsi la prise alimentaire.

Nos premières expériences utilisant un modèle de souris où le gène codant pour les CB1Rs a été délété (souris *CB1*-KO) ainsi que l'administration d'un antagoniste des CB1Rs, le rimonabant avaient permis de confirmer que l'hyperphagie induite par la RAPA était due à une augmentation de l'activité de l'ECS mais ne nous permettait cependant pas de déterminer la localisation d'une telle action. Devant l'augmentation des sources suggérant que les neurones du système mélanocortine expriment eux aussi les CB1Rs et moduleraient la libération des neurotransmetteurs de ces neurones (Hentges et al., 2005 ; Hentges, 2007 ; Koch et al., 2015), nous avons donc décidé de générer un modèle de souris où les CB1Rs sont spécifiquement délétés des neurones à POMC (souris POMC-*CB1*-KO). Ces souris présentent une amplification de l'hyperphagie induite par la RAPA, suggérant que les CB1Rs sur les neurones à POMC pourraient finalement inhiber la prise alimentaire.

Des travaux récents de notre laboratoire ont déjà démontré un effet antagoniste des CB1Rs sur la prise alimentaire en fonction de la nature des neurones sur lesquels ils sont exprimés. En effet, l'activation des CB1Rs sur les neurones GABAergiques entraîne une hypophagie, tandis que l'activation des CB1Rs sur les neurones glutamatergiques augmente la prise alimentaire (Bellocchio et al., 2010). Dans notre cas, l'administration simultanée de RAPA et de Ptx bloque l'hyperphagie induite par la RAPA chez les souris POMC-*CB1*-KO, suggérant que les CB1Rs exprimés par les neurones à POMC GABAergiques déterminent l'amplitude de l'hyperphagie induite par la RAPA. Il serait intéressant de voir si l'administration d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques à N-méthyl-D-aspartate (NMDA) ou à acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) associée à l'administration de RAPA entraînerait, à l'inverse, une stimulation encore plus importante de l'hyperphagie induite par la RAPA.

Enfin, il serait également intéressant d'observer les effets de l'administration d'agonistes ou antagonistes des CB1Rs chez les souris POMC-*CB1*-KO sur la prise alimentaire. Nos données préliminaires ne montrent pour l'instant aucun effet du THC sur la prise alimentaire des souris POMC-*CB1*.

Au final, nos données ont permis d'identifier que l'activité de mTORC1 exerce un contrôle critique de la fonction des neurones à POMC dans la régulation de la prise alimentaire, en faisant notamment intervenir l'ECS et le système mélanocortine, et remettent en question les notions classiques sur la fonction des neurones à POMC dans la balance énergétique en démontrant l'existence de deux sous-populations fonctionnellement distinctes, régulant de façon opposée la prise alimentaire. De nombreuses questions subsistent concernant les circuits neuronaux ciblés par les neurones à POMC et comment ces sous-populations neuronales répondent de façon différentielle aux différents signaux endogènes afin de réguler la prise alimentaire. Des données électrophysiologiques préliminaires sur l'étude de la transmission synaptique entre les neurones à POMC et les neurones parvocellulaires du PVN corroborent les effets observés décrits dans cette publication, ne serait-ce que pour la transmission glutamatergique, où la RAPA inhiberait la libération d' $\alpha$ -MSH, ce qui en réponse stimulerait la synthèse et libération d'endocannabinoïdes, qui en activant les CB1Rs, inhiberaient la libération de glutamate par les neurones à POMC et ainsi les courants post-synaptiques excitateurs exercés sur les neurones parvocellulaires. Il reste à savoir ce qu'il en est pour la transmission GABAergique et ainsi voir si la RAPA en entraînant l'inhibition du système mélanocortine et l'activation de l'ECS, favoriserait la libération de GABA par les neurones à POMC et ainsi les courants post-synaptiques inhibiteurs sur les neurones parvocellulaires. Enfin, il pourrait également être intéressant d'observer si les neurones à POMC GABAergiques ne favoriseraient pas la libération de  $\beta$ -endorphine (également produit du clivage de POMC) plutôt que d' $\alpha$ -MSH, puisqu'à l'inverse de l' $\alpha$ -MSH, la  $\beta$ -endorphine stimule la prise alimentaire (Grandison and Guidotti, 1977) et qu'une activation des neurones produisant la  $\beta$ -endorphine est associée à une activation de l'ECS (Bakkali-Kassem et al., 2011) et pourrait également expliquer l'augmentation de l'hyperphagie observée après administration de RAPA chez les souris POMC-*CB1*-KO.

## Etude II



## **Le dérèglement de l'autophagie au sein des neurones à POMC altère la balance énergétique et perturbe les voies de signalisation de mTORC1 et de STAT3, ainsi que la morphologie des neurones à POMC**

### **Contexte de l'étude**

Nous venons d'établir le rôle joué par la voie de mTORC1 dans la régulation de la fonction des neurones à POMC, et ainsi dans la régulation de la prise alimentaire. Nous venons de montrer que l'inhibition de mTORC1 au sein des neurones à POMC affecte la prise alimentaire et des données antérieures de notre laboratoire ont démontré qu'une dysrégulation de la voie participe au développement de l'obésité (Cota et al., 2008). Néanmoins, nous ne connaissons pas encore les mécanismes moléculaires mis en place par mTORC1 dans la modulation de l'activité des neurones à POMC. Nous savons, cependant, que mTORC1 régule de nombreuses fonctions cellulaires nécessaires à la survie de l'organisme, telles que la synthèse protéique, la croissance cellulaire, mais également la biogenèse des lysosomes et l'autophagie (Laplante and Sabatini, 2012).

L'autophagie est un processus nécessaire au recyclage des organites et protéines intracellulaires endommagés ciblés par des protéines adaptatrices telles que p62/SQSTM1, et pour l'adaptation de la cellule à un environnement déprivé en nutriments (Laplante and Sabatini, 2012). Des études récentes ont rapporté des liens importants entre l'autophagie et le contrôle hypothalamique de la balance énergétique, notamment au niveau des neurones à POMC. En effet, la suppression de l'autophagie dans les neurones à POMC entraîne une hyperphagie et une obésité associées à des altérations du métabolisme (Coupe et al., 2012 ; Quan et al., 2012). Au niveau cellulaire, ceci s'accompagne de malformations neuronales et d'une accumulation de p62/SQSTM1 (Coupe et al., 2012; Quan et al., 2012). Enfin, la délétion de *p62/SQSTM1* au niveau cérébral entraîne une obésité s'accompagnant d'une résistance centrale à la leptine (Rodriguez et al., 2006 ; Harada et al., 2013).

De plus, la liaison de p62/SQSTM1 à mTORC1 entraîne l'activation de mTORC1, inhibant ainsi l'autophagie et favorisant une synthèse accrue de p62/SQSTM1 (Duran et al., 2011). L'inhibition de mTORC1 par la RAPA entraîne l'activation de l'autophagie (Laplante and Sabatini, 2012), tandis qu'un jeûne et une réexposition à la nourriture après un jeûne lors d'un paradigme de « refeeding » sont connus pour modifier très rapidement l'expression de marqueurs autophagiques, dont p62/SQSTM1 (Moscat and Diaz-Meco, 2011). Des données préliminaires de notre laboratoire ont confirmé par Western blot que l'expression de p62/SQSTM1 est augmentée dans l'hypothalamus de souris réexposées à la nourriture après un



jeûne. Ces données suggèrent que l'autophagie et p62/SQSTM1 jouent un rôle important dans la régulation de la balance énergétique au niveau cérébral. Cependant, le rôle de p62/SQSTM1 sur l'activité neuronale et la fonction des neurones à POMC et l'implication éventuelle de mTORC1 restent à élucider.

### **But de l'étude et approches**

Nous avons cherché à fournir de nouvelles informations sur le rôle de p62/SQSTM1 dans la régulation de l'activité et la fonction des neurones à POMC, et ainsi dans la régulation de la prise alimentaire chez la souris.

Pour cela, nous avons généré, par mutagenèse conditionnelle, des souris dépourvues de la protéine p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC (POMC-*p62*-KO), une protéine sensée être responsable de l'activation de mTORC1, et inhiber l'autophagie. Cette mutagenèse a pu être réalisée grâce à l'aimable don de souris *p62<sup>flox/flox</sup>* de la part du Dr. Jorge Moscat (Sanford-Burnham Medical Research Institute, USA) et au travail exceptionnel de notre plateforme de génotypage dirigée par Delphine Gonzales.

Nous avons commencé, dans un premier temps, par établir le phénotype des souris POMC-*p62*-KO en étudiant leur prise alimentaire et leur poids corporel sur plusieurs semaines en régime standard, ainsi qu'en analysant leur adiposité par imagerie par résonance magnétique quantitative (EchoMRI) à différents temps donnés. Cette technique permet de dissocier la quantité de masse maigre et la quantité de masse grasse d'un animal grâce aux propriétés physico-chimiques des ions hydrogènes contenus dans l'eau et présents à différentes concentrations dans ces tissus.

Nous avons, dans un second temps, caractérisé l'impact de la suppression de *p62/SQSTM1* dans les neurones à POMC sur la dépense énergétique et le métabolisme de ces animaux. Nous avons tout d'abord étudié leur dépense énergétique pendant 48h grâce à des expériences de calorimétrie indirecte (TSE Systems GmbH, Germany), permettant de renseigner sur la prise alimentaire et hydrique, l'activité locomotrice ainsi que sur les échanges gazeux respiratoires (consommation d'oxygène et production de dioxyde de carbone), en régime standard, puis en régime riche en graisses (HFD, 60% de calories provenant des lipides). Nous avons par la suite étudié le phénotype de ces souris lors d'une exposition prolongée à un régime HFD. Enfin, nous avons étudié les voies de signalisation de la leptine et de mTORC1. Nous avons, pour cela, administré de la leptine (2,5 µg dans 1 µL de saline, icv) à ces souris et étudié la prise alimentaire et la perte de poids induite par la leptine. Puis, nous avons quantifié par Western blot l'activité des voies de signalisation de la leptine et de mTORC1 au niveau hypothalamique,

qui est notamment recrutée par les hormones, telles que la leptine afin de diminuer la prise alimentaire (Cota et al., 2006).

Dans un troisième et dernier temps, nous avons évalué l'impact la délétion de *p62/SQSTM1* dans les neurones à POMC, et ainsi de l'inhibition de l'autophagie, sur la morphologie de ces neurones. Nous avons étudié le nombre et la taille des neurones à POMC au sein du noyau arqué (ARC). Dans le même temps, nous avons quantifié les projections axonales de ces neurones sur le noyau paraventriculaire (PVN), une des principales cibles impliquées dans la régulation de la balance énergétique (Belgardt and Bruning, 2010). Ces analyses vont permettre de confirmer de la nécessité ou non d'une autophagie intacte au sein des neurones à POMC dans le maintien de l'intégrité neuronale et de définir le rôle éventuel de tels changements morphologiques sur les modifications métaboliques et phénotypiques observées chez les souris POMC-*p62*-KO.

## Résultats

L'analyse phénotypique des souris POMC-*p62*-KO nourries en régime standard a montré que ces souris développent une obésité marquée par une augmentation de la prise de poids et de l'adiposité au fil des semaines. Cette obésité est associée à une augmentation de la prise alimentaire, qui devient plus prononcée plus les animaux prennent du poids.

Par ailleurs, nous démontrons que les souris POMC-*p62*-KO nourries en régime standard présentent une altération de l'utilisation des substrats énergétiques et de la dépense énergétique. Ces souris nourries par un régime HFD pendant 48h présentent une altération de la dépense énergétique et de leur prise alimentaire, qui ne semblent cependant pas entraîner d'augmentation de leur sensibilité à une obésité induite par l'alimentation (DIO).

En outre, les souris POMC-*p62*-KO deviennent résistantes à l'action anorexigène de la leptine et montrent une diminution de l'activité hypothalamique de mTORC1, évaluée par la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, et de la voie de signalisation de la leptine, évaluée par la phosphorylation de STAT3.

Enfin, ces changements moléculaires sont associés à des changements morphologiques des neurones à POMC, caractérisés par une diminution de la taille du soma et des projections axonales sur le PVN, qui deviennent plus évidents chez les souris âgées.

Ces résultats démontrent donc que :

- la présence de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC est importante dans la régulation de la balance énergétique, en modulant notamment la prise alimentaire et la dépense énergétique.
- p62/SQSTM1 module l'action anorexigène de la leptine au niveau hypothalamique.
- l'absence de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC entraîne des modifications morphologiques, possiblement dues à une altération de la voie de mTORC1.
- la présence de p62/SQSTM1 et d'un processus autophagique intacts dans les neurones à POMC sont importants dans la régulation de la balance énergétique et protègent des perturbations métaboliques et l'apparition de l'obésité tout au long de la vie.

**Disruption of autophagy in POMC neurons alters energy balance and impairs both mTOR/STAT3 signaling pathways and POMC neuronal morphology.**

Nicolas Saucisse<sup>1,2,4</sup>, Vincent Simon<sup>1,2,4</sup>, Delphine Gonzales<sup>1,2</sup>, Samantha Clark<sup>1,2</sup>, Jorge Moscat<sup>3</sup>, Daniela Cota<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, U1215, F-33000 Bordeaux, France; <sup>2</sup>University of Bordeaux, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, U1215, F-33000 Bordeaux, France; <sup>3</sup>Cell Death and Survival Networks Program, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, 10901 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA.

<sup>4</sup>These authors share first authorship

**\*Correspondence:** e-mail: [daniela.cota@inserm.fr](mailto:daniela.cota@inserm.fr)

## Summary

Food intake in mammals is regulated by complex hypothalamic neuronal networks, whose detailed mechanisms of action are still elusive. Among the different hypothalamic neuronal populations, pro-opiomelanocortin (POMC)-producing neurons of the arcuate nucleus (ARC) critically participate in the regulation of energy balance and represent a potential therapeutic target for obesity. The mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway is an intracellular fuel sensing cascade that integrates the actions of hormones and nutrients in the hypothalamus and that regulates several cellular functions necessary for organism's survival, including autophagy. By using conditional mutagenesis, we generated mice lacking functional mTORC1 in POMC cells by deleting the protein p62/SQSTM1 (POMC-*p62*-KO), which drives mTORC1 activation and inhibits autophagy. This study shows that deletion of *p62/SQSTM1* in POMC neurons causes morphological changes associated with altered mTORC1/STAT3 signaling. This in turn leads to hyperphagia, leptin resistance, altered use of energy substrates and obesity. Altogether, these findings pinpoint the important role of p62/SQSTM1 and autophagy in POMC neurons for the regulation of energy balance.

## Introduction

Food intake and body weight are regulated by the central nervous system (CNS), particularly at the level of the hypothalamus. This structure encompasses a number of neuronal populations involved in the regulation of energy balance. In particular, the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) includes the pro-opiomelanocortin (POMC) expressing neurons and the agouti-related peptide (AgRP) expressing neurons (Cone, 2005; Koch and Horvath, 2014; Gautron et al., 2015). These neurons provide extensive projections to the same brain areas, such as the paraventricular nucleus (PVN), which expresses melanocortin-4 receptors (MC4R), and exert an opposite action on food intake and body weight (Cone, 2005; Koch and Horvath, 2014; Gautron et al., 2015). While activation of AgRP neurons promote food intake through the release of AgRP, which is the endogenous inverse agonist of MC4Rs (Fan et al., 1997; Ollmann et al., 1997; Tong et al., 2008), POMC neurons trigger satiety and increase energy expenditure by releasing  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone (aMSH), a product of POMC cleavage and a potent appetite-suppressant neuropeptide exerting its action through the activation of the MC4Rs (Boston et al., 1997; Fan et al., 1997; Cowley et al., 2001). These two neuronal types, which also constitute the melanocortin system through their opposite effects onto melanocortin receptors (Cone, 2005; Koch and Horvath, 2014; Gautron et al., 2015), are the targets of several peripheral signals regulating their functions (Cota et al., 2007; Williams and Elmquist, 2012). In particular, several studies have shown the importance of POMC neurons in mediating the physiological actions of leptin, an adipokine produced by the adipose tissue (Cota et al., 2007; Allison and Myers, 2014), and in determining the first-phase satiety response after a fast (Singru et al., 2007; Fekete et al., 2012). However, the intracellular pathways underlying these responses remain unclear.

Recently, the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) has emerged as a key intracellular actor involved in the regulation of energy balance, whose dysregulation participates to the development of obesity (Cota et al., 2006; Cota et al., 2008). mTORC1 is a serine/threonine kinase that works as an intracellular fuel sensing mechanism, whose activity relies on the level of energy available in the cell (Cota et al., 2007; Blouet and Schwartz, 2010; Lopez et al., 2016). Consequently, the mTORC1 pathway regulates protein and lipid synthesis, lysosome biogenesis, autophagy and neuronal morphology and activity (Laplante and Sabatini, 2012), and integrates the actions of nutrients, growth factors and hormones in the hypothalamus (Cota et al., 2006; Blouet et al., 2008; Dagon et al., 2012). Hypothalamic activation of mTORC1 suppresses food intake through modulation POMC neuron activity and critically mediates the appetite-suppressant action of leptin (Cota et al., 2006; Saucisse et al., 2016). However, the cellular mechanisms or functions engaged by mTORC1 to match POMC neuronal activity with behavioral and metabolic responses remain unknown.

True to its function of a sensor of energy availability, mTORC1 activation inhibits autophagy, an ubiquitous process in which cytoplasmic materials, including organelles and misfolded proteins, are recycled by lysosomes, especially in a context of low energy (Laplante and Sabatini, 2012). Interestingly, autophagy has been recently involved in the hypothalamic control of energy balance. In particular, mice lacking autophagy in AgRP neurons display reduced body weight, adiposity and refeeding response to a fast (Kaushik et al., 2011). Moreover, when autophagy is permanently suppressed in POMC neurons by preventing the expression of the *autophagy-related gene 7* (*Atg7*), mice become hyperphagic and obese and display an impaired glucose tolerance and leptin response (Coupe et al., 2012; Quan et al., 2012). At cellular level, POMC neurons lacking autophagy have structural abnormalities such as an altered

axonal growth and starts accumulating p62/SQSTM1, a polyubiquitin-binding protein that facilitates the formation of autophagosomes and that is normally degraded by autophagy (Vadlamudi et al., 1996; Komatsu et al., 2007; Klionsky et al., 2012). Importantly, p62/SQSTM1 binding to mTORC1 leads to mTORC1 activation and subsequent inhibition of autophagy (Duran et al., 2011). p62/SQSTM1 has previously been suggested to regulate energy balance (Duran et al., 2008; Ramesh Babu et al., 2008; Jain et al., 2010), and its absence in full *p62*-KO mice causes insulin resistance and mature-onset obesity (Rodriguez et al., 2006). Recently, it has been shown that mature-onset obesity in full *p62*-KO mice was due to central leptin resistance (Harada et al., 2013). These studies suggest that autophagy and p62/SQSTM1 play an important role in the hypothalamic regulation of energy balance. However, the role of p62/SQSTM1 in POMC neurons has not been studied yet and the precise mechanisms and possible involvement of the mTORC1 pathway remain to be elucidated.

In the present study, we aimed at providing novel information on the role of p62/SQSTM1 in energy balance regulation, by using conditional knockout mice in which POMC neurons are lacking a functional p62/SQSTM1 (deletion of *p62/SQSTM1* in POMC neurons, POMC-*p62*-KO). Here, we found that POMC-*p62*-KO mice exhibit late-onset obesity associated with hyperphagia. Moreover, we found that specific p62/SQSTM1 deficiency in POMC neurons caused alteration of fuel substrates utilization and energy expenditure in POMC-*p62*-KO mice, suggesting that p62/SQSTM1 in POMC neurons is important for the regulation of both food intake and energy expenditure. We also observed molecular and behavioral leptin resistance, and a defect in phosphorylation of ribosomal protein S6, a downstream target of mTORC1, in POMC-*p62*-KO mice. Finally, deletion of *p62/SQSTM1* in POMC neurons caused



morphological alterations of cell body size and POMC axonal projections in the PVN. These results indicate that p62/SQSTM1 and an intact autophagic process in POMC neurons are important in the regulation of energy homeostasis and protect from lifelong metabolic disturbances and the onset of obesity.

## Results

### ***POMC-p62-KO mice on standard chow become hyperphagic and obese***

POMC-*p62*-WT and POMC-*p62*-KO male littermates were obtained as previously described in (Bellocchio et al., 2013). The neuroanatomical analysis revealed the absence of p62/SQSTM1 within POMC neurons of the ARC in POMC-*p62*-KO mice but not in POMC-*p62*-WT mice (Figure 1A). Thus, POMC-*p62*-KO mice carry a deletion of the protein p62/SQSTM1 in ARC POMC neurons, thereby representing a tool to study the roles of autophagy in these cells and in turn on energy balance regulation.

As measured from 6 until 12 weeks of age, *p62/SQSTM1* deletion in POMC-expressing neurons did not affect body weight in male mice maintained on a normocaloric, standard chow. However, starting at 13 weeks of age, POMC-*p62*-KO mice gained significantly more weight than their WT littermates (Figure 1B) [repeated measures ANOVA, genotype effect:  $P < 0.001$ ;  $F(1) = 17.404$ , genotype\*time effect:  $P < 0.001$ ;  $F(23) = 16.242$ ]. Body composition analysis revealed that at 7 and 13 weeks of age, POMC-*p62*-KO mice had fat mass (expressed as % of BW, Figure 1C) and lean mass comparable to WT mice (expressed as % of BW, Figure 1D). However, when the weight difference became more important, at 22 weeks and 29 weeks of age, POMC-*p62*-KO mice displayed a significantly increased fat mass (Figure 1C) [repeated measures ANOVA, genotype effect:  $P < 0.001$ ;  $F(1) = 17.758$ , genotype\*time effect:  $P < 0.001$ ;  $F(3) = 20.334$ ], associated to a significantly reduced lean mass (Figure 1D)

[repeated measures ANOVA, genotype effect:  $P = 0.005$ ;  $F(1) = 10.64$ , genotype\*time effect:  $P < 0.001$ ;  $F(3) = 14.01$ ]. Thus, over time, POMC-*p62*-KO develop obesity. This increase in body weight and adiposity is associated with an increase in food intake (Figure 1E), which becomes more pronounced as animals gain body weight [repeated measures ANOVA, genotype effect:  $P = 0.027$ ;  $F(1) = 6.050$ , genotype\*time effect:  $P = 0.086$ ;  $F(22) = 1.46$ ].

### ***Deletion of p62/SQSTM1 in POMC neurons leads to altered use of fuel substrates and energy expenditure***

Since alterations in food intake were minimal, this alone couldn't explain the increased body weight and adiposity of POMC-*p62*-KO mice. Thus, we assessed whether this phenomenon could be due to changes in locomotor activity or in the use of energy substrates. Chow-fed POMC-*p62*-KO and WT littermates had similar activity (Figure 2A) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.544$ ;  $F(1) = 0.374$ , phase effect:  $P < 0.001$ ;  $F(1) = 60.052$ , genotype\*phase effect:  $P = 0.777$ ;  $F(1) = 0.081$ ] and energy expenditure (Figure 2B) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.850$ ;  $F(1) = 0.036$ , phase effect:  $P < 0.001$ ;  $F(1) = 25.261$ , genotype\*phase effect:  $P = 0.829$ ;  $F(1) = 0.047$ ], but POMC-*p62*-KO mice showed increased respiratory quotient (RQ, Figure 2C) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.010$ ;  $F(1) = 7.190$ , phase effect:  $P < 0.001$ ;  $F(1) = 52.26$ , genotype\*phase effect:  $P = 0.749$ ;  $F(1) = 0.10$ ], suggesting a higher consumption rate of carbohydrates as energy source, which in turn would favor accumulation of fat mass. Detailed 24h analysis of food intake revealed an increase in food intake in POMC-*p62*-KO mice as compared to WT mice (Figure 2D) [repeated measures ANOVA, genotype effect:  $P = 0.049$ ;  $F(1) = 4.324$ , time effect:  $P < 0.001$ ;

$F(23) = 420.010$ , genotype\*time effect:  $P < 0.001$ ;  $F(23) = 2.225$ ], which would in turn explain the observed increase in RQ.

We then tested metabolic flexibility by acutely exposing POMC-*p62*-KO mice and their WT littermates to a high-fat diet (HFD) with 60% of calories from fat. Under this condition, POMC-*p62*-KO mice showed a decrease in energy expenditure (Figure 4E) [HFD Day 1, two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.028$ ;  $F(1) = 5.736$ , phase effect:  $P < 0.001$ ;  $F(1) = 27.639$ , genotype\*phase effect:  $P = 0.953$ ;  $F(1) = 0.004$ ; HFD Day 2, two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.076$ ;  $F(1) = 3.553$ , phase effect:  $P = 0.001$ ;  $F(1) = 15.085$ , genotype\*phase effect:  $P = 0.378$ ;  $F(1) = 0.817$ ] and had again an increase in food intake (Figure 4F) [repeated measures ANOVA, genotype effect:  $P = 0.086$ ;  $F(1) = 3.840$ , time effect:  $P = 0.017$ ;  $F(1) = 8.927$ , genotype\*time effect:  $P = 0.812$ ;  $F(1) = 0.061$ ], suggesting that they were unable to quickly adapt to the change of diet and overall setting in place metabolic and behavioral responses that would favor body weight gain. No differences were detected between genotype in either locomotor activity or RQ, which was strongly reduced in both POMC-*p62*-WT and POMC-*p62*-KO due to the important increase in lipid intake (data not shown). To evaluate the specific role of *p62/SQSTM1* deletion in POMC neurons in DIO, male POMC-*p62*-KO and their WT littermates were maintained for 9 weeks on HFD. Surprisingly, POMC-*p62*-KO mice gained as much weight as their POMC-*p62*-WT controls (Figure 2G) [genotype effect:  $P = 0.750$ ;  $F(1) = 0.107$ , time effect:  $P < 0.001$ ;  $F(10) = 191.608$ , genotype\*time effect:  $P = 0.674$ ;  $F(10) = 0.752$ ] and displayed similar food intake and adiposity (data not shown).

### ***Deletion of p62/SQSTM1 in POMC neurons leads to leptin resistance and altered mTORC1 signaling***

Knowing that POMC-expressing neurons of the ARC critically mediate the appetite-suppressant action of leptin (Hill et al., 2010), we investigated the effects of the hormone in chow-fed POMC-*p62*-KO and their WT littermates comparable in body weight. As expected, central administration of leptin (2.5 µg/µL, icv) significantly decreased 24h food intake in POMC-*p62*-WT mice but this effect was abolished in POMC-*p62*-KO mice (Figure 3A) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.144$ ;  $F(1) = 2.297$ , treatment effect:  $P < 0.001$ ;  $F(1) = 16.562$ , genotype\*treatment effect:  $P = 0.036$ ;  $F(1) = 4.961$ ]. Accordingly, there was a significant decrease in body weight in POMC-*p62*-WT but not in POMC-*p62*-KO mice (Figure 3B) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.839$ ;  $F(1) = 0.042$ , treatment effect:  $P = 0.161$ ;  $F(1) = 2.106$ , genotype\*treatment effect:  $P = 0.029$ ;  $F(1) = 5.485$ ], implying that p62/SQSTM1 in POMC neurons is required for leptin's ability to reduce food intake. We therefore assessed hypothalamic protein expression of leptin's downstream target STAT3 in POMC-*p62*-WT and POMC-*p62*-KO mice 2 hours after central administration of leptin (2.5 µg/µL, icv) or its vehicle by Western blot analysis. Leptin administration led to a strong increase in STAT3 phosphorylation (p-STAT3) in the hypothalamus of POMC-*p62*-WT mice, but this effect was significantly blunted in the hypothalamus of POMC-*p62*-KO mice (Figure 3C) [one-way ANOVA, treatment effect:  $P = 0.010$ ;  $F(2) = 8.543$ ]. Thus, deletion of p62/SQSTM1 in POMC cells leads to molecular and behavioral resistance to the central actions of leptin.

Leptin and p62/SQSTM1 are known to drive mTORC1 signaling, an energy sensing pathway, whose activity has been shown to be necessary for POMC neuronal functions in the regulation of food intake (Saucisse et al., 2016). Moreover, p62/SQSTM1 is

required for the activation of mTORC1 (Duran et al., 2011). We therefore evaluated hypothalamic expression of phosphorylation of S6 (p-S6), a protein downstream of mTORC1 used as a classical marker of mTORC1 activation (Cota et al., 2006). Consistent with the changes observed for p-STAT3, p-S6 was increased in the hypothalamus of leptin-treated POMC-*p62*-WT mice but blunted in the hypothalamus of leptin-treated POMC-*p62*-KO mice (Figure 3D) [one-way ANOVA, treatment effect:  $P = 0.050$ ;  $F(2) = 4.478$ ], highlighting an impairment of mTORC1 signaling in these mice. We have shown that pharmacological inhibition of mTORC1 by injecting RAPA icv to 24-h fasted animals induces hyperphagia (Cota et al., 2006; Saucisse et al., 2016). We therefore used this approach and monitored food intake of refed POMC-*p62*-KO mice and their WT littermates after injection of RAPA or its vehicle. As expected, RAPA significantly increased fasting-induced food intake in POMC-*p62*-WT mice while it failed to increase food intake in POMC-*p62*-KO mice (Figure 4) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P < 0.001$ ;  $F(1) = 21.017$ , treatment effect:  $P = 0.043$ ;  $F(1) = 4.511$ , genotype\*treatment effect:  $P = 0.341$ ;  $F(1) = 0.942$ ], implying that mTORC1 signaling may be altered in POMC neurons due to the deletion of *p62/SQSTM1*. Moreover, and somehow surprisingly, in response to refeeding, POMC-*p62*-KO mice actually showed a hypophagic phenotype (Figure 3E), which, however, was not found in younger animals (data not shown).

Overall, these findings imply that *p62/SQSTM1* in POMC neurons may specifically modulate the sensitivity of POMC neurons to the action of leptin and determine leptin's ability to decrease food intake, which is altered in POMC-*p62*-KO mice probably due to alterations in mTORC1 signaling.

### ***Deletion of p62/SQSTM1 in POMC neurons leads to alterations of POMC neuronal morphology***

One major function of mTORC1 is to regulate cell body size and suppression of autophagy in POMC neurons leads to p62/SQSTM1-positive aggregates in the hypothalamus and a defect in POMC axonal projections (Coupe et al., 2012). As our previous results suggested that the deletion of *p62/SQSTM1* in POMC neurons affect mTORC1 signaling, we went on to characterize POMC neuronal morphology. We therefore compared POMC-*p62*-KO and their WT littermates at 11 weeks, before the onset of a phenotypic difference (hereafter referred as “young”) and 30 weeks of age (hereafter referred as “old”). We observed that while POMC cell number in the ARC was comparable between genotypes [“young” POMC-*p62*-WT ( $n = 4$ ):  $19.3 \pm 2.3$  POMC cells per ARC hemisection vs. “young” POMC-*p62*-KO ( $n = 5$ ):  $20.0 \pm 5.2$  POMC cells per ARC hemisection vs. “old” POMC-*p62*-WT ( $n = 4$ ):  $22.9 \pm 4.1$  POMC cells per ARC hemisection vs. “old” POMC-*p62*-KO ( $n = 5$ ):  $25.6 \pm 3.9$  POMC cells per ARC hemisection, two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.712$ ;  $F(1) = 0.143$ , age effect:  $P = 0.327$ ;  $F(1) = 1.036$ , genotype\*age:  $P = 0.822$ ;  $F(1) = 0.052$ ], POMC-*p62*-KO mice had significantly smaller POMC cell bodies (Figure 5A-B) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.005$ ;  $F(1) = 11.055$ , age effect:  $P = 0.617$ ;  $F(1) = 0.263$ , genotype\*age:  $P = 0.226$ ;  $F(1) = 1.616$ ]. The study of POMC projections to the paraventricular nucleus (PVN), a main target of POMC neurons, further revealed that projections in POMC-*p62*-KO mice were also reduced as compared to WT littermates (Figure 5C-D) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.011$ ;  $F(1) = 8.577$ , age effect:  $P = 0.003$ ;  $F(1) = 12.693$ , genotype\*age:  $P = 0.934$ ;  $F(1) = 0.007$ ]. Same reduction was observed with POMC cleavage products such as  $\alpha$ -MSH (Figure 5E) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.016$ ;  $F(1) = 7.487$ , age effect:  $P = 0.054$ ;  $F(1) = 4.436$ , genotype\*age:

$P = 0.257$ ;  $F(1) = 1.398$ ] and  $\beta$ -endorphin (Figure 5F) [two-way ANOVA, genotype effect:  $P = 0.077$ ;  $F(1) = 3.631$ , age effect:  $P = 0.039$ ;  $F(1) = 5.190$ , genotype\*age:  $P = 0.591$ ;  $F(1) = 0.303$ ]. Together, these data indicate that POMC-*p62*-KO mice display an abnormal development of POMC neuron body size and neuronal projections, an effect that could in turn participate to the observed hyperphagia and the mature-onset obesity.

Collectively, our data demonstrate that p62/SQSTM1 and modulation of autophagy in POMC neurons critically controls feeding responses and leptin signaling, probably through the mTORC1 pathway.

## **Discussion**

In this study, we demonstrated that p62/SQSTM1 is necessary for the physiologic function of POMC neurons in the regulation of feeding behavior and energy expenditure. The deficiency of p62 specifically in POMC neurons leads to hyperphagia, altered energy expenditure and late-onset obesity in chow-fed mice. Given the important role of central leptin signaling in the control of feeding responses and energy expenditure (Minokoshi et al., 2004), changes of body weight, food intake and energy expenditure in POMC-*p62*-KO mice may be largely due to the observed defect in the activation of STAT3, a downstream target of leptin action. Further neuroanatomical studies will be needed in order to assess whether the changes in the phosphorylation of STAT3 occur within POMC neurons or are localized in other hypothalamic areas, such as the ventromedial and lateral hypothalamus, that are direct target of leptin actions and that receive projections from POMC neurons (Allison and Myers, 2014). Since chow-fed POMC-*p62*-KO mice become obese and display altered leptin signaling, we reasoned that the chronic consumption of a HFD would be expected to

accelerate the appearance of obesity and that sympathetic-related responses, such as brown adipose tissue thermogenesis, would be altered in this animal model. Although there was no difference in energy expenditure between POMC-*p62*-KO mice and POMC-*p62*-WT mice fed normal chow diet, energy expenditure of POMC-*p62*-KO mice acutely fed HFD was significantly lower than that of POMC-*p62*-WT mice fed HFD, again associated to an increase in food intake. In contrast, weight gain after chronic exposure to HFD was not different between POMC-*p62*-KO and POMC-*p62*-WT mice. These results suggest that deficiency of p62/SQSTM1 in POMC neurons causes rapid maladaptive metabolic responses to dietary change, but does not lead to increased sensitivity to diet-induced obesity.

mTORC1 is a well-known negative regulator of autophagy (Kim et al., 2011) and loss of autophagy in POMC neurons or deletion of *p62/SQSTM1*, which drives mTORC1 activation and inhibits autophagy, lead to hyperphagia, increased body weight and adiposity, and leptin resistance or glucose intolerance (Rodriguez et al., 2006; Coupe et al., 2012; Quan et al., 2012; Harada et al., 2013). Thus, our data show that rapamycin does not induce hyperphagia and that leptin does not increase the phosphorylation of ribosomal protein S6, a downstream target of mTORC1, in POMC-*p62*-KO mice. These results are consistent with the above-cited set of experiments and highlight the role of p62/SQSTM1 and autophagy in POMC neurons in the control of energy balance through an intact mTORC1 signaling. Further neuroanatomical studies will be needed in order to assess the basal activity of the mTORC1 pathway in the presence or absence of p62/SQSTM1 in POMC neurons.

In addition to the modulation of autophagy, mTORC1 is also essential for the regulation of protein synthesis, which is required for cell growth (Laplante and Sabatini, 2012). Loss of autophagy in the CNS is usually associated with neurodegenerative diseases



(Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006) and deletion of *Atg7* or over-activation of mTORC1 in POMC neurons leads to marked structural defects in the maturation of POMC axonal projections (Mori et al., 2009; Coupe et al., 2012). We therefore performed morphological analysis in POMC-*p62*-KO and their WT littermates to see whether deletion of *p62/SQSTM1* in POMC neurons leads to morphological alterations that can be the underlying cause of the observed metabolic dysregulation. Despite POMC cell number was not different between POMC-*p62*-KO and their WT littermates, POMC cells were significantly smaller in POMC-*p62*-KO mice, which is consistent with a downregulated mTORC1 pathway. The PVN neurons expressing MC4Rs critically mediate the appetite-suppressant signal from POMC neurons (Woods, 2005). The density of POMC-IR fibers is markedly attenuated in the PVN of POMC-*p62*-KO mice, suggesting that *p62/SQSTM1* and autophagy in POMC neurons is an important intracellular process for the normal development of neural projections derived from POMC neurons to their target nuclei. However, we cannot rule out the possibility that the reduction of axonal projections observed in POMC-*p62*-KO mice is not due to a decrease in peptide release or to an alteration of POMC peptide processing. We observed reduction of both  $\alpha$ -MSH- and  $\beta$ -endorphin-IR fibers in the PVN of POMC-*p62*-KO mice, supporting the idea that *p62/SQSTM1* deficiency in POMC neurons does not alter the pattern of POMC peptide processing. However, further analysis is required to assess whether these reductions of POMC cell body size and axonal projections in the PVN can be attributed to reduction in structural shape of POMC cells and axon growth and not to decreased levels of *Pomc* expression, using other specific structural markers.

In addition, further studies are needed in order to localize leptin resistance at cellular level (decreased pSTAT3 in POMC neurons?) and to investigate the impact of

p62/SQSTM1 deletion on the autophagy process. Overall, the present findings have established that p62/SQSTM1 and constitutive autophagy are important for proper function of POMC neurons, and that p62/SQSTM1 in POMC neurons plays a role in the regulation of energy balance and leptin sensitivity.

## Experimental Procedures

### *Animals*

All experiments were conducted in strict compliance with the European Union recommendations (2013/63/EU) and were approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries (animal experimentation authorization n°3309004) and the local ethical committee of the University of Bordeaux (DIR1354). Maximal efforts were made to reduce any suffering and the number of animals used. Conditional mutant mice lacking the *p62/SQSTM1* gene in POMC-expressing cells, hereafter called POMC-*p62*-KO, were generated by crossing *p62*-flox mice (kind gift of Dr. Jorge Moscat, Sanford-Burnham Medical Research Institute), with POMC-*Cre*<sup>+/+</sup> mice [Tg(Pomc1-cre)16Lowl/J, JAX Stock #005965, The Jackson Laboratory, USA], as previously done in (Bellocchio et al., 2013). Male POMC-*p62*-KO and their wild-type (WT) littermates were all generated in the Neurocentre Magendie breeding facility and were on C57Bl6/N genetic background. Male mice, aged 6 to 30 weeks, were housed individually in standard plastic rodent cages, maintained on a 12-h light-dark cycle (lights off at 1300 h) with *ad libitum* access to pelleted chow (A03, SAFE, France) and water, unless otherwise specified. For high-fat diet (HFD) studies, 17-weeks old male mice were placed on an HFD with 60% of calories from fat (60% HFD, Research Diets, 5.24 kcal/g, USA). Food intake and body weight were recorded daily for genotype characterization. Number of animals used in the study is indicated in the figure legends. Mice were genotyped from genomic DNA purified from tail biopsies by PCR using specific primers (see further below). Tails were incubated overnight at 56°C in Proteinase K buffer (100mM Tris-HCl pH8, 5mM EDTA, 0.2 % SDS, 200mM NaCl, 0,2mg/mL PK). After 10 min at 13200 rpm, the supernatants were purified on silica columns, according to the manufacturer protocol (Macherey nagel kit), on a zephyr

automatic station. PCR assay was carried out using a Biorad C1000 thermal cycler, with GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega), and 0.3 to 0.6 $\mu$ M of each primer in a 25 $\mu$ L volume. PCR conditions were as follows: 1 cycle, 5 min at 95°C; 37 cycles, 30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C for, 1 min at 72°C; 1 cycle, 5 min at 72°C. PCR products was analyzed on a Labchip GX microfluidic electrophoresis system (Caliper) using the DNA5k kit.

Primers for genotype analysis.

Mouse line	Primer	sequence 5'3'	expected fragment	
p62-Flox	P396d-P62	TCTCGACCCCGTACCTTTCA	Flox	680 pb
	P397d-P62	TCCGGGGCTTTAACTGAACC	wt	600 pb

### ***Body composition analysis***

Assessment of lean and fat mass in conscious male mice was performed using a nuclear echo magnetic resonance imaging whole-body composition analyzer (Echo MRI 900; EchoMedical Systems, USA), as in (Cardinal et al., 2014).

### ***Indirect calorimetry***

Indirect calorimetry, in-cage locomotor activity and gas exchange analysis were carried out in calorimetric chambers (TSE systems, Germany) after 72 h of acclimatization on 13-weeks old mice fed chow or a high-fat diet (60% HFD, Research Diets, 5.24 kcal/g, USA), as previously described in (Cardinal et al., 2014). O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production were measured every 20 minutes (mean over 60 minutes) to measure the gas exchange, respiratory quotient and energy expenditure. Simultaneously, in-cage locomotor activity was determined using tridimensional infrared light beam system.

### ***Stereotaxic surgery***

Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg, ip) and xylazine (10 mg/kg, ip), placed in a stereotaxic holder (David Kopf Instruments, USA) and implanted with a cannula in the lateral cerebral ventricle (coordinate AP/DV/ML = -0.5/-2.1/-1.2 mm). Cannula placement was verified by administering 5 µg of neuropeptide Y (NPY) (Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA) in 0.1 M PBS (pH 7.4) and by assessing subsequent food intake, as in (Brown et al., 2006).

### ***Fasting-induced food intake studies***

All mice were singly housed for at least 7 days before the fasting-induced food intake experiments. The day before the experiment, food was removed from the cages for 24 hours. Fasted mice received an icv injection of RAPA (25 µg in 1 µl DMSO, EMD Millipore, USA) or its vehicle, which were administered 4 h before dark onset. Food was returned immediately after the drug injection and intake was recorded after 1, 2 and after 24 h. Body weight was measured immediately before and 24 h after the treatment.

### ***Food intake response to leptin***

Hoppers containing chow were removed from the cages 1 h before the administration of leptin [2.5 µg/µL, icv; mouse recombinant leptin obtained from Dr. A.F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program (Torrance, USA)] or its vehicle (saline), which occurred 4 h before the onset of the dark phase, when food hoppers were returned to the cages, as in (Cardinal et al., 2014). Food intake was recorded 24 h afterwards. Body weight was measured immediately before and 24 h after the treatment. The leptin food intake studies were performed using a within subjects design in which mice received both vehicle and leptin in counterbalanced order.

### ***Immunohistochemistry***

Mice were deeply anesthetized using pentobarbital given ip and then perfused transcardially with ice-cold PBS, pH 7.4, followed by 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, France) in PBS with 0.2% picric acid. Brains were extracted and postfixed in 4% PFA overnight at 4°C, then cryoprotected with 30% sucrose in PBS at 4°C. Coronal sections (30 µm) were cut with a cryostat (CM1950, Leica, Germany), collected in PBS and stored in antifreeze solution (30% ethylene glycol, 30% glycerol in KPBS) at -20°C until further used.

**Double-labeling immunohistochemistry.** Sections were first incubated with 10% normal goat serum (Dako, Denmark) and then with guinea pig anti-p62 antibody (1:1000, Progen, Germany) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A488-conjugated secondary goat anti-guinea pig antibody (1:500, EMD Millipore, USA). Sections were then washed in PBS and blocked with 10% normal goat serum (Dako) and then incubated with rabbit anti-POMC antibody (1:2000; Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A647-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (1:500, Cell Signaling, USA). Sections were then mounted and cover-slipped.

**Triple-labeling immunohistochemistry.** Sections were first incubated with 10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) and then with sheep anti- $\alpha$ -MSH antibody (1:5000; EMD Millipore, USA) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A568-conjugated secondary donkey anti-sheep antibody (1:500, EMD Millipore, USA). Sections were then washed in PBS and blocked with 10% normal goat serum (Dako, Denmark) and then incubated with rabbit  $\beta$ -endorphin antibody (1:100; Cell Signalling, USA) overnight

at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h incubated for 1 h with A647-conjugated secondary donkey anti-sheep antibody (1:500, Cell Signaling, USA). Finally, sections were washed in PBS and incubated with Goat Fab Fragment Anti-Rabbit IgG (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) to avoid cross-reactivity. Sections were then washed in PBS and blocked with 10% normal goat serum (Dako) and then incubated with rabbit anti-POMC antibody (1:2000, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A488-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (1:500, Cell Signaling, USA). Sections were then mounted and cover-slipped. Sections were first incubated with 10% normal goat serum (Dako, Denmark) and then with guinea pig anti-p62 antibody (1:1000, Progen, Germany) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A488-conjugated secondary goat anti-guinea pig antibody (1:500, EMD Millipore, USA). Sections were then washed in PBS and blocked with 10% normal goat serum (Dako) and then incubated with rabbit anti-POMC antibody (1:2000; Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA) overnight at 4°C. The next day sections were washed in PBS and incubated for 1 h with A647-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (1:500, Cell Signaling, USA). Sections were then mounted and cover-slipped.

Fluorescent images were acquired with a confocal microscope (SP8-STED, Leica, Germany) and all sections containing the ARC were rostro-caudally analyzed using ImageJ. Briefly, for each image, the background was subtracted and the image binarized. Then, particles' area (for POMC cell body size) or fiber's area (for POMC,  $\alpha$ -MSH or  $\beta$ -endorphin projections) was quantified.

### ***Western blot analysis***

Western blot analysis was carried out in chow-fed mice injected with leptin (2.5 µg/µL, icv) or its vehicle in the light phase, 4h before the onset of the dark. Mouse brains were rapidly removed 2 hours after leptin injection and the whole hypothalamus excised. Samples were lysed and proteins extracted and quantified and western blots carried out as in (Cardinal et al., 2014). Membranes were incubated with the following primary antibodies: phospho-S6 (Ser240/244) (1:1000, Cell Signaling, USA), S6 (1:1000, Cell Signaling), phospho-STAT3 (Tyr705) (1:1000, Cell Signaling), STAT3 (1:1000, Cell Signaling) and β-actin (1:4000, Cell Signaling). β-actin was used as loading control. Immunoreactive bands were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL plus, PerkinElmer, USA) then exposed on radiographic films (Amersham hyperfilm ECL, GE Healthcare, UK). Bands quantification was performed using ImageJ software.

### ***Statistical analyses***

Statistical analyses were performed using Prism (Graphpad, USA). All values are reported as means ± SEM. Data were analyzed by unpaired Student's t-tests or by 1-way, 2-way or repeated measures ANOVAs as appropriate. Significant ANOVAs were followed by Fisher LSD post-hoc test. P values less than 0.05 denote statistical significance.

### ***Acknowledgements***

We thank N. Aubailly, S. Laumond and the animal facility personnel of the NeuroCentre Magendie for animal care, the Genotyping Platform of the NeuroCentre Magendie for mouse genotyping. The microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national



infrastructure France BioImaging. The help of Fabrice Cordelières is acknowledged. Supported by INSERM (to D.C.), Aquitaine Region (to D.C), INSERM/Aquitaine Region PhD fellowship and FRM fellowship FDT20150532545 (to N.S.), French Ministry of Higher Education and Research PhD fellowship (to V.S.), ANR-2010-1414-01 (to D.C.), ANR-13-BSV4-0006 (to D.C.), Labex BRAIN ANR-10-LABX-43 (D.C.), ANR-10-EQX-008-1 OPTOPATH (to D.C.) and FFRD (to D.C.).

### **Disclosure Summary**

The authors have nothing to disclose.

### **References**

Allison, M.B., and Myers, M.G., Jr. (2014). 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *The Journal of endocrinology* 223, T25-35.

Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Quarta, C., Metna-Laurent, M., Cardinal, P., Binder, E., Cannich, A., Delamarre, A., Haring, M., Martin-Fontecha, M., *et al.* (2013). Activation of the sympathetic nervous system mediates hypophagic and anxiety-like effects of CB(1) receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 4786-4791.

Blouet, C., Ono, H., and Schwartz, G.J. (2008). Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell metabolism* 8, 459-467.

Blouet, C., and Schwartz, G.J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural brain research* 209, 1-12.

Boston, B.A., Blaydon, K.M., Varnerin, J., and Cone, R.D. (1997). Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. *Science* 278, 1641-1644.

Brown, L.M., Clegg, D.J., Benoit, S.C., and Woods, S.C. (2006). Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiology & behavior* 89, 687-691.

Cardinal, P., Andre, C., Quarta, C., Bellocchio, L., Clark, S., Elie, M., Leste-Lasserre, T., Maitre, M., Gonzales, D., Cannich, A., *et al.* (2014). CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Molecular metabolism* 3, 705-716.

Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature neuroscience* 8, 571-578.

Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312, 927-930.

Cota, D., Proulx, K., and Seeley, R.J. (2007). The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology* 132, 2158-2168.

Cota, D., Matter, E.K., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2008). The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 7202-7208.

Coupe, B., Ishii, Y., Dietrich, M.O., Komatsu, M., Horvath, T.L., and Bouret, S.G. (2012). Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell metabolism* 15, 247-255.

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480-484.

Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., and Kahn, B.B. (2012). p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell metabolism* 16, 104-112.

Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K., Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2008). The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer cell* 13, 343-354.

Duran, A., Amanchy, R., Linares, J.F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., Hansen, M., Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2011). p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Molecular cell* 44, 134-146.

Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165-168.

Fekete, C., Zseli, G., Singru, P.S., Kadar, A., Wittmann, G., Fuzesi, T., El-Bermani, W., and Lechan, R.M. (2012). Activation of anorexigenic pro-opiomelanocortin neurones during refeeding is independent of vagal and brainstem inputs. *Journal of neuroendocrinology* 24, 1423-1431.

Gautron, L., Elmquist, J.K., and Williams, K.W. (2015). Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. *Cell* 161, 133-145.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889.

Harada, H., Warabi, E., Matsuki, T., Yanagawa, T., Okada, K., Uwayama, J., Ikeda, A., Nakaso, K., Kirii, K., Noguchi, N., *et al.* (2013). Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 14767-14777.

Hill, J.W., Elias, C.F., Fukuda, M., Williams, K.W., Berglund, E.D., Holland, W.L., Cho, Y.R., Chuang, J.C., Xu, Y., Choi, M., *et al.* (2010). Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell metabolism* 11, 286-297.

Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Overvatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., and Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *The Journal of biological chemistry* 285, 22576-22591.

Kaushik, S., Rodriguez-Navarro, J.A., Arias, E., Kiffin, R., Sahu, S., Schwartz, G.J., Cuervo, A.M., and Singh, R. (2011). Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell metabolism* 14, 173-183.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13, 132-141.

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., *et al.* (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544.

Koch, M., and Horvath, T.L. (2014). Molecular and cellular regulation of hypothalamic melanocortin neurons controlling food intake and energy metabolism. *Molecular psychiatry* 19, 752-761.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., *et al.* (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.

Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., *et al.* (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.

Lopez, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., and Dieguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nature reviews Endocrinology* 12, 421-432.

Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., *et al.* (2004). AMP-kinase regulates food intake by

responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569-574.

Mori, H., Inoki, K., Munzberg, H., Opland, D., Faouzi, M., Villanueva, E.C., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D., MacDougald, O.A., Myers, M.G., Jr., *et al.* (2009). Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell metabolism* 9, 362-374.

Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.

Quan, W., Kim, H.K., Moon, E.Y., Kim, S.S., Choi, C.S., Komatsu, M., Jeong, Y.T., Lee, M.K., Kim, K.W., Kim, M.S., *et al.* (2012). Role of hypothalamic proopiomelanocortin neuron autophagy in the control of appetite and leptin response. *Endocrinology* 153, 1817-1826.

Ramesh Babu, J., Lamar Seibenhener, M., Peng, J., Strom, A.L., Kemppainen, R., Cox, N., Zhu, H., Wooten, M.C., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., *et al.* (2008). Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* 106, 107-120.

Rodriguez, A., Duran, A., Selloum, M., Champy, M.F., Diez-Guerra, F.J., Flores, J.M., Serrano, M., Auwerx, J., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2006). Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell metabolism* 3, 211-222.

Saucisse, N., Mazier, W., Catania, C., Binder, E., Bellocchio, L., Romanov, R.A., Cannich, A., Simon, V., Matias, I., Meece, K., *et al.* (2016). Bidirectional control of food intake by hypothalamic POMC neurons. Submitted.

Singru, P.S., Sanchez, E., Fekete, C., and Lechan, R.M. (2007). Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety. *Endocrinology* 148, 638-646.

Tong, Q., Ye, C.P., Jones, J.E., Elmquist, J.K., and Lowell, B.B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature neuroscience* 11, 998-1000.

Vadlamudi, R.K., Joung, I., Strominger, J.L., and Shin, J. (1996). p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 271, 20235-20237.

Williams, K.W., and Elmquist, J.K. (2012). From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature neuroscience* 15, 1350-1355.

Woods, S.C. (2005). Signals that influence food intake and body weight. *Physiology & behavior* 86, 709-716.

## Figure Legends

### Figure 1. POMC-p62-KO mice are hyperphagic and obese.

(A) Representative images of POMC neurons in POMC-p62-WT and POMC-p62-KO mice. POMC (red) and p62/SQSTM1 (green); scale bar: 5  $\mu$ m. (B) Weekly body weight gain, (C) fat mass (expressed in % of body weight) (D) lean mass (expressed in % of body weight) and (E) average daily food intake in chow-fed male POMC-p62-WT and POMC-p62-KO littermates from 6 to 29 weeks of age (n = 8-10). Data are mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05; \*\*p< 0.01; \*\*\*p<0.001.

### Figure 2. Altered use of fuel substrates and energy expenditure in POMC-p62-KO mice.

(A) In-cage locomotor activity, (B) energy expenditure and (C) respiratory quotient (RQ) during the dark and light phases determined in 16-weeks old chow-fed male POMC-p62-WT and POMC-p62-KO mice (n = 11-13). (D) Cumulative food intake analysis; the grey box represents the dark phase. (E) Energy expenditure and (F) food intake during the dark and light phases assessed in 16-weeks old male POMC-p62-WT and POMC-p62-KO mice exposed to a HFD (60% calories from fat) (n = 5-6). (G) Weekly body weight gain in male POMC-p62-WT and POMC-p62-KO littermates exposed to HFD at the age of 17 weeks and maintained on HFD for 9 weeks (n = 5-7). Data are mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

### Figure 3. Leptin resistance and altered mTORC1 signaling in POMC-p62-KO mice.

(A) 24h food intake and (B) body weight change of chow-fed male POMC-p62-WT and POMC-p62-KO mice treated with leptin (2.5  $\mu$ g/ $\mu$ L, icv) or its vehicle (n = 4-9).



Representative western blot scans and quantification of (C) p-STAT3/STAT3 ratios and (D) p-S6/S6 ratios normalized by  $\beta$ -actin levels (arbitrary unit) in the hypothalamus of leptin-treated (2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , icv) chow-fed male POMC-p62-WT and POMC-p62-KO mice (n = 4 per groups).

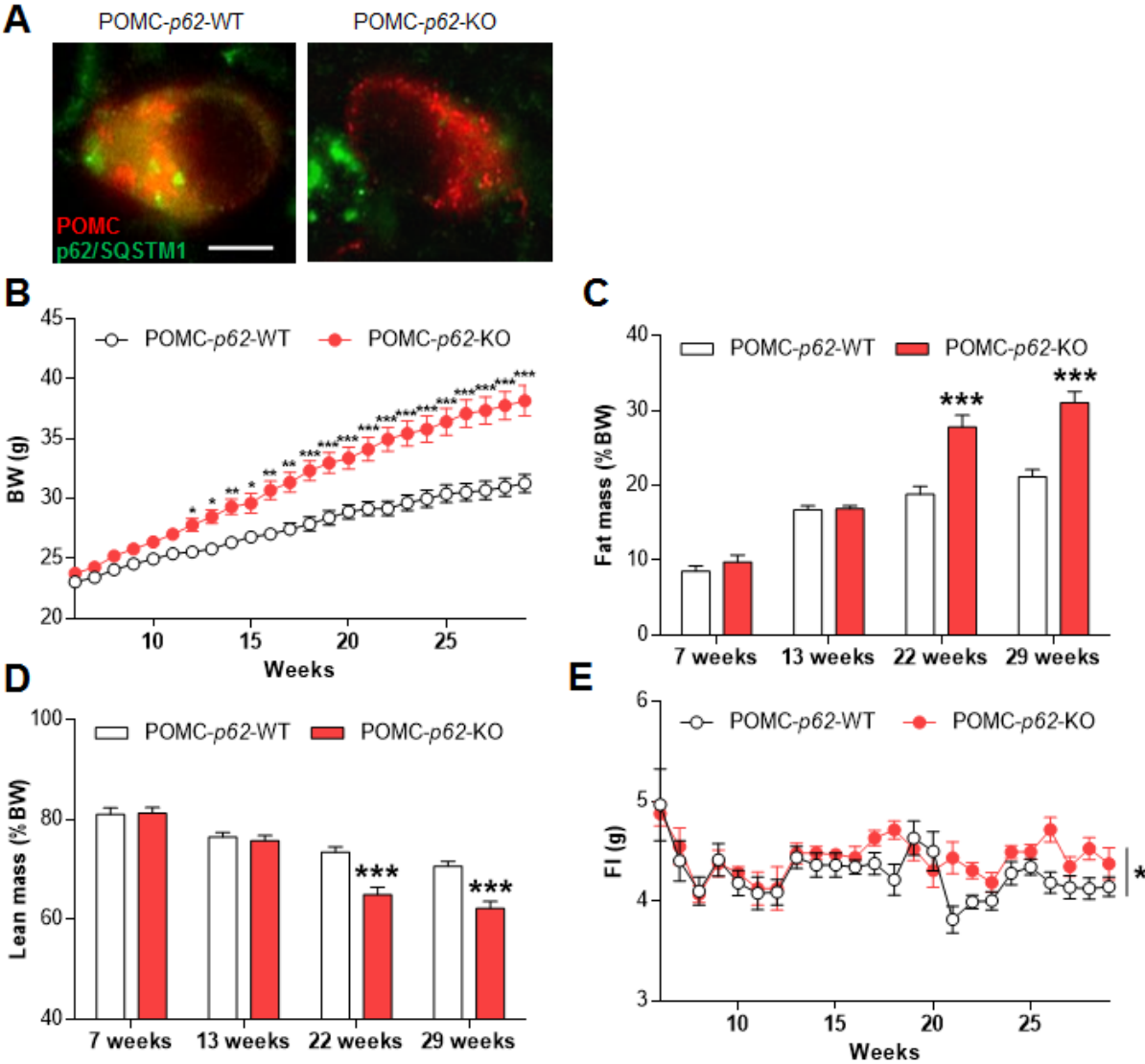
**Figure 4. Altered rapamycin-induced hyperphagia in POMC-p62-KO mice.**

Fasting-induced 2-h food intake in POMC-p62-WT and POMC-p62-KO littermates (n = 6-10) treated with vehicle or RAPA (25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , icv). Data are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

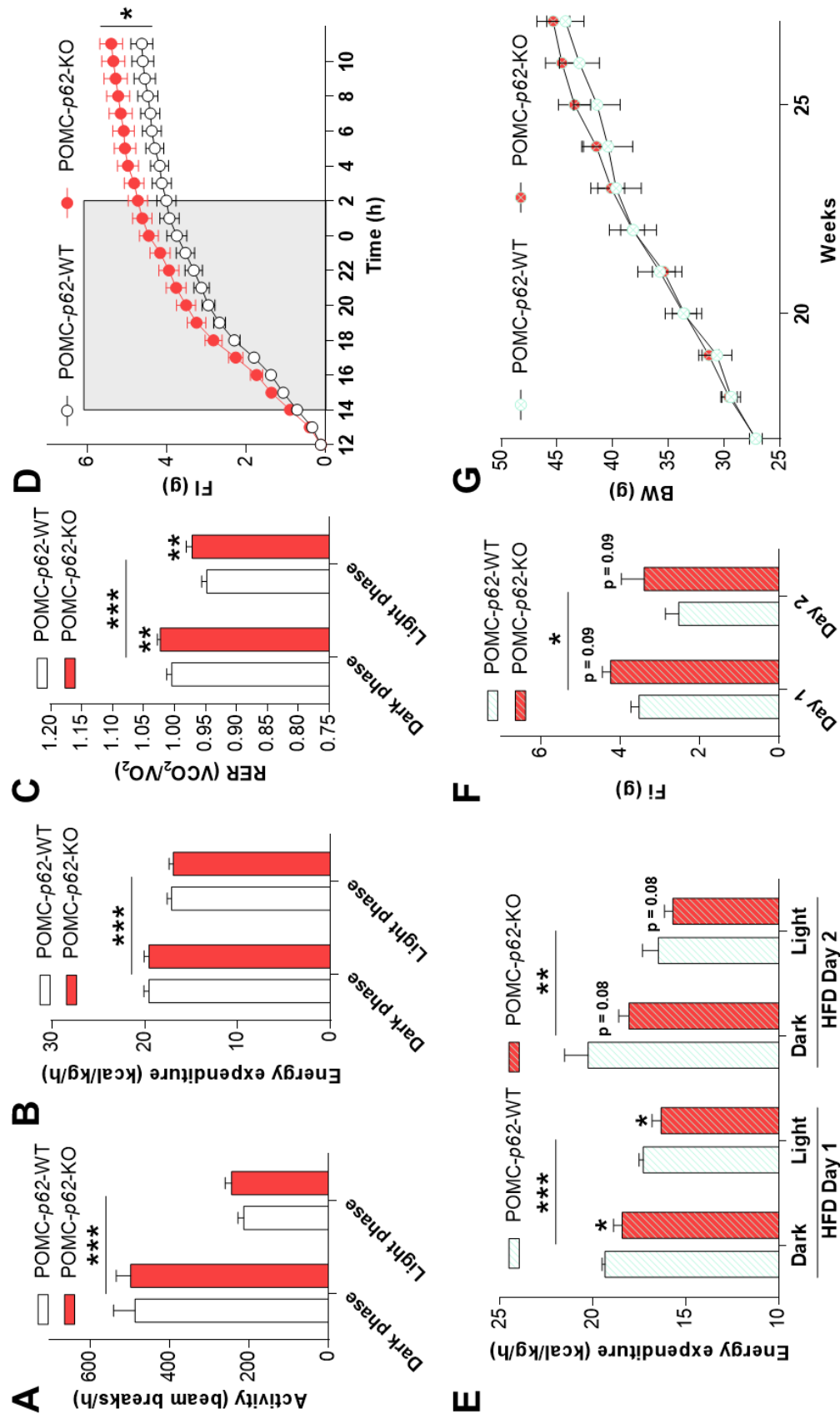
**Figure 5. Altered POMC neuronal morphology in POMC-p62-KO mice.**

(A) Representative images and (B) quantification of POMC-IR neurons in “old” mice (30 weeks of age, n = 4-5 mice per group) mice. POMC (red); scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . (C) Representative images and (D) quantification of POMC-IR fibers’ area in the PVN of “young” mice (11 weeks of age, n = 4-5 mice per group). (E) quantification of  $\alpha$ -MSH-IR fibers’ area and (F)  $\beta$ -endorphin-IR fibers’ area in the PVN of “young” (11 weeks of age) and “old” (30 weeks of age) mice (n = 4-5 mice per group). POMC (red); scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ; V: third ventricle. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

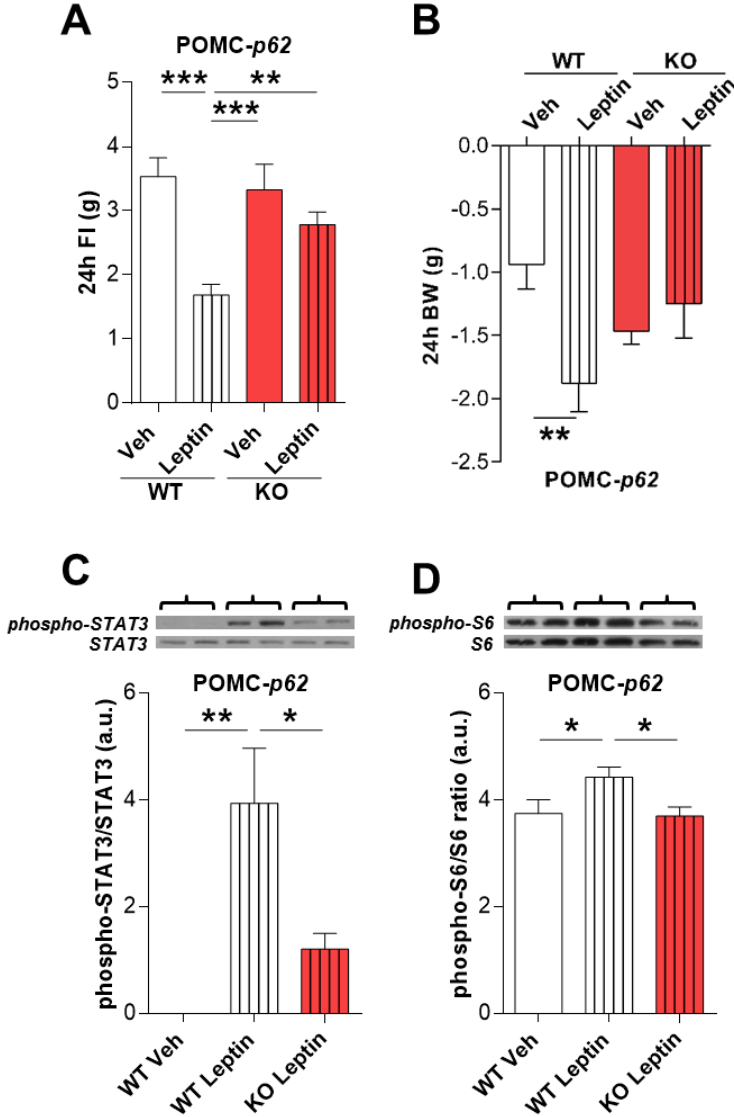
**Figure 1**



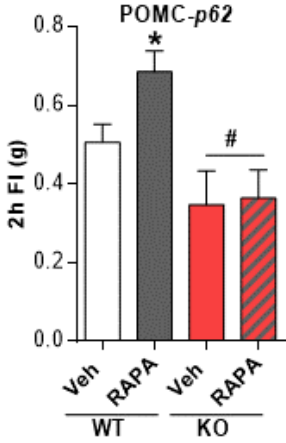
**Figure 2**



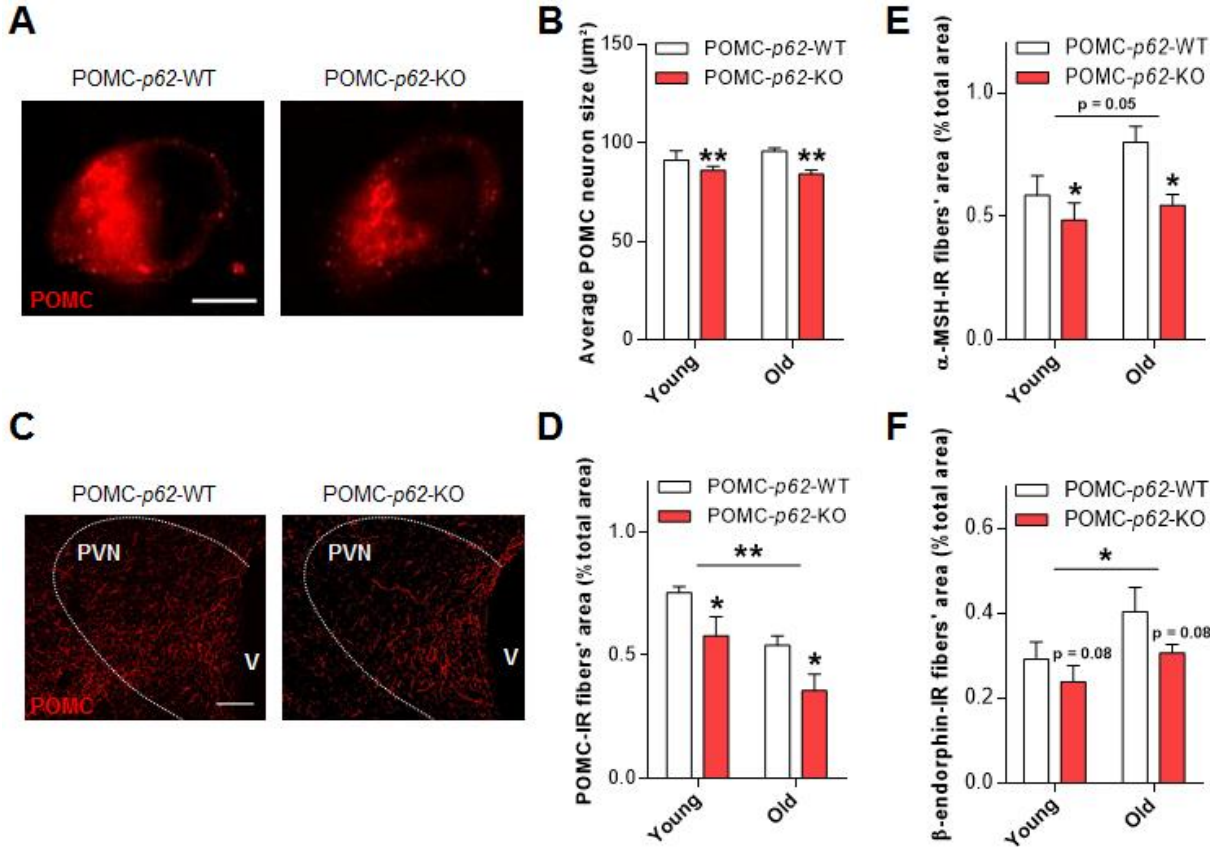
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**





## Discussion et perspectives

*La délétion de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC entraîne une obésité associée à une hyperphagie, ainsi qu'une altération de l'utilisation des substrats énergétiques et de la dépense énergétique*

Nos résultats démontrent que les souris POMC-*p62*-KO nourries en régime standard, bien qu'initialement similaires à leurs congénères de type sauvage, développent une obésité tardive, caractérisée par une augmentation de l'adiposité et de la prise alimentaire. Ces résultats rejoignent une littérature déjà abondante sur le fait que la protéine p62/SQSTM1 est importante dans la régulation de la balance énergétique et le développement de l'obésité (Rodriguez et al., 2006 ; Duran et al., 2008 ; Ramesh Babu et al., 2008 ; Jain et al., 2010).

De façon intéressante, avant même que les changements d'adiposité n'apparaissent, les souris POMC-*p62*-KO présentent déjà une augmentation de leur prise alimentaire. Ceci pourrait expliquer l'augmentation du quotient respiratoire et possiblement la prise de poids corporel observée au fil des semaines. De plus, les souris POMC-*p62*-KO nourries en régime standard présentent une dépense énergétique identique à celle de leurs congénères de type sauvage, soulignant le rôle crucial joué par la prise alimentaire dans le développement de cette obésité au cours du temps.

Cependant, la délétion de *p62/SQSTM1* dans les neurones à POMC entraîne également des réponses métaboliques inadaptées en réponse à la consommation d'un régime HFD pendant 48h, suggérant une altération de leur flexibilité métabolique qui favoriserait la prise de poids corporel. En effet, les souris POMC-*p62*-KO montrent une diminution de leur dépense énergétique et présentent toujours une augmentation de leur prise alimentaire. De façon surprenante, les souris POMC-*p62*-KO ne semblent pas plus affectées que leurs congénères de type sauvage par un régime HFD sur le long-terme, puisqu'elles prennent autant de poids et présentent une prise alimentaire et une adiposité similaires. Il serait donc pertinent d'évaluer comment des souris POMC-*p62*-KO plus jeunes s'adaptent à la consommation chronique d'un régime HFD, et si les réponses sympathiques associées, telles que la thermogénèse, sont modifiées dans ces conditions. Nous pourrions éventuellement tester un régime HFD un peu moins drastique en utilisant un régime HFD, dont seulement 40% des calories proviendraient des lipides. En effet, ces deux types de régime devraient, en principe, accélérer l'apparition de l'obésité chez ce modèle animal.

Enfin, sachant que les neurones à POMC contrôlent le métabolisme du glucose via le système nerveux sympathique (Saltiel and Kahn, 2001), il serait également intéressant d'évaluer, à l'aide des tests de tolérance au glucose de tolérance à l'insuline, si la délétion de



*p62/SQSTM1* dans les neurones à POMC modifie le métabolisme du glucose, avant même le développement de l'obésité chez ces souris. Nos données préliminaires ne montrent aucune altération chez des souris de poids similaires, suggérant que des modifications potentielles du métabolisme du glucose seraient une possible conséquence de l'apparition de l'obésité.

*La délétion de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC entraîne une résistance à la leptine et une altération de la voie de signalisation de mTORC1*

Les souris POMC-*p62*-KO nourries en régime standard développent une résistance à la leptine. Cette hormone est connue pour réduire la prise alimentaire et augmenter la dépense énergétique via les neurones à POMC, qui expriment des récepteurs à la leptine (Hill et al., 2010 ; Allison and Myers, 2014). Nos études étant effectuées avant l'apparition de l'obésité, il est probable que la résistance à la leptine observée chez les souris POMC-*p62*-KO soit une des causes du développement de l'obésité.

D'autre part, notre analyse moléculaire montrant des modifications sur la sensibilité de la voie de signalisation de la leptine, dénotant notamment une altération de la phosphorylation de STAT3, ont été réalisées sur des échantillons hypothalamiques entiers. Ces données ne renseignent en aucun cas sur la localisation de tels changements moléculaires. Nos futures études neuro-anatomiques consisteront à évaluer si ces altérations s'opèrent spécifiquement au sein des neurones à POMC ou aussi dans d'autres régions hypothalamiques telles que l'hypothalamus ventromédian et latéral, qui sont des cibles directes des actions de la leptine et qui reçoivent des projections axonales des neurones à POMC (Allison and Myers, 2014).

De façon similaire, des études neuro-anatomiques plus poussées sont nécessaires afin de confirmer que la voie de signalisation de mTORC1 est bien altérée au sein des neurones à POMC, en évaluant la phosphorylation de la protéine ribosomale S6. Nous pourrions éventuellement coupler cet immunomarquage à une évaluation de l'activité neuronale, telle qu'un marquage de c-Fos, puisque ces deux marqueurs ont récemment été montrés comme fortement colocalisés lors de l'activation neuronale (Knight et al., 2012). Nos données initiales ne démontrent cependant aucune modification de l'activité des neurones à POMC chez les souris POMC-*p62*-KO en réponse à un paradigme de « refeeding », connu pour induire l'activation de ces neurones et nécessitant une voie de mTORC1 fonctionnelle (Cota et al., 2006 ; Saucisse et al., 2016).

Enfin, la quantification de marqueurs de l'autophagie, tels que LC3 et Atg7 au sein des neurones à POMC sera nécessaire afin d'évaluer pleinement l'impact de la délétion de

*p62/SQSTM1* sur le processus autophagique et de son implication potentielle dans le développement de l'obésité et des altérations métaboliques associées.

*La délétion de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC entraîne une altération de la morphologie neuronale*

Les souris POMC-*p62*-KO présentent également des altérations morphologiques des neurones à POMC, qui pourraient, en association à une activité neuronale réduite, être une des causes probables du dérèglement métabolique observé chez ces souris. Les souris POMC-*p62*-KO possèdent moins de projections axonales des neurones à POMC au sein du PVN, qui médie les effets de satiété induits par l'activation des neurones à POMC (Singru et al., 2012). Des études électrophysiologiques sur l'étude de la transmission synaptique entre les neurones à POMC et les neurones parvocellulaires du PVN pourraient révéler des modifications de la transmission synaptique pouvant participer au développement de l'obésité chez les souris POMC-*p62*-KO.

Nous avons également cherché à montrer que cette réduction des projections axonales n'était pas due à une diminution de la libération ou à une altération du clivage de POMC en  $\alpha$ -MSH et en  $\beta$ -endorphine. Nous avons observé une diminution du nombre de fibres positives pour ces deux neuropeptides, semblable à celle observée pour les fibres positives pour POMC, supportant l'idée que la délétion de *p62/SQSTM1* dans les neurones à POMC n'altère pas le clivage de POMC mais affecte plutôt la libération de POMC et de ses produits clivés, entraînant ainsi une dysrégulation de la prise alimentaire et des réponses métaboliques chez les souris POMC-*p62*-KO. Des analyses supplémentaires seront nécessaires afin de confirmer cette hypothèse, en quantifiant notamment l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la balance énergétique, tels que *Pomc*, *Agrp*, *Mc4r* ainsi que les enzymes impliquées dans le clivage de POMC, ainsi qu'en quantifiant la libération d' $\alpha$ -MSH et en  $\beta$ -endorphine par radio-immuno-essai. Des expériences d'immunomarquage à l'aide de marqueurs neuronaux et/ou axonaux stables en association avec un marquage de POMC seront également nécessaires.

Enfin, les neurones à POMC sont plus petits chez les souris POMC-*p62*-KO. Nous avons, par ailleurs, montré que la signalisation de mTORC1 est altérée en réponse à l'administration centrale de leptine et que l'administration centrale d'un inhibiteur de mTORC1, la rapamycine, n'augmente pas la prise alimentaire lors d'un paradigme de « refeeding », suggérant une régulation négative de mTORC1 chez les souris POMC-*p62*-KO. Or, mTORC1 régule, entre autres, la croissance cellulaire (Laplante and Sabatini, 2012) et il a été montré qu'une suractivation de la voie mTORC1 dans les neurones à POMC entraînait une augmentation de

la taille de ces neurones et une réduction des projections axonales dans le PVN, associées à une hyperphagie et une obésité (Mori et al., 2009) ; ce phénotype étant restauré par l'administration de RAPA. Les altérations morphologiques observées chez les souris POMC-*p62*-KO pourraient ainsi être dues à une altération de la voie de mTORC1 et être responsables du développement de l'hyperphagie et de l'obésité.

Au final, nos données ont permis d'identifier que p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC exerce un rôle critique dans la régulation de la balance énergétique. En effet, son absence pourrait induire une diminution de l'activité de mTORC1, qui entraînerait d'importants changements morphologiques pouvant affecter la fonction des neurones à POMC et la régulation de la prise alimentaire. Une caractérisation plus complète des mécanismes cellulaires impliqués seront nécessaires pour une meilleure compréhension de l'action de p62/SQSTM1, et potentiellement de l'autophagie, dans la régulation de la balance énergétique. Ces analyses permettront peut-être d'identifier de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement de l'obésité.

## Discussion générale



L'hypothalamus est une des structures cérébrales clés, impliquée dans la régulation de la balance énergétique, qui participe à l'orchestration des réponses homéostatiques sur la prise alimentaire et la dépense énergétique. Il intègre de nombreux signaux nutritionnels et hormonaux provenant des organes périphériques, et témoignant du statut énergétique de l'organisme. Le caractère absolument essentiel et primordial de la fonction de nutrition fait de la régulation de la prise alimentaire un mécanisme extrêmement sophistiqué faisant intervenir de multiples populations neuronales, et notamment les neurones à POMC de l'ARC, ainsi que de nombreuses voies de signalisation pouvant être interconnectées, telles que la voie de mTORC1 et l'ECS. Les neurones à POMC régulent la balance énergétique, classiquement en diminuant la prise alimentaire et le poids corporel via la production de neuropeptides dérivant du clivage de POMC (De Jonghe et al., 2011), mais ces neurones libéreraient également des neurotransmetteurs pouvant être importants dans la réponse de satiété (Hentges et al., 2009 ; Dicken et al., 2012 ; Jarvie and Hentges, 2012 ; Wittmann et al., 2013). D'autre part, mTORC1 est une voie de signalisation intracellulaire agissant comme un détecteur d'énergie au sein de la cellule et capable d'intégrer les signaux nutritionnels et hormonaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Laplante and Sabatini, 2012 ; 2013). Quant à lui, l'ECS exerce un rétrocontrôle négatif sur la libération de neurotransmetteur au sein du CNS via la fixation d'endocannabinoïdes sur les CB1Rs (Richard et al., 2009). L'activité de l'ECS est considérée comme un signal orexigène puissant, mais cet effet dépendrait du type neuronal exprimant le CB1R (Bellocchio et al., 2010). Cependant, très peu d'études ont été menées quant aux rôles exacts de mTORC1 et de l'ECS dans la modulation de l'activité des neurones à POMC et l'implication de leurs effets sur la prise alimentaire. Mon travail de thèse a eu pour objectif de comprendre quels étaient les rôles de mTORC1 et de l'ECS dans la modulation de la fonction des neurones à POMC et ainsi dans la régulation la balance énergétique, via l'utilisation d'approches génétiques, pharmacologiques, électrophysiologiques et moléculaires.

*La vision actuelle de la régulation hypothalamique de la prise alimentaire est « erronée »*

Le système mélanocortine est depuis longtemps considéré comme un des acteurs majeurs de la régulation de la balance énergétique (Schwartz et al., 1996 ; De Jonghe et al., 2011). Ce circuit est constitué de deux populations neuronales, localisées au sein de l'ARC, aux actions antagonistes sur les MC4Rs, en particulier des neurones parvocellulaires du PVN, et ainsi sur la fonction de nutrition (Woods, 2005; De Jonghe et al., 2011). En effet, les neurones produisant l'AgRP augmentent la prise alimentaire, tandis que les neurones produisant la POMC diminuent la prise alimentaire et conduisent à la cessation du repas (De Jonghe et al., 2011). De plus, ces

neurones sont idéalement localisés pour recevoir des informations provenant des organes périphériques ; l'ARC réside dans la partie ventro-médiane de l'hypothalamus, de part et d'autre du troisième ventricule (Belgardt et al., 2009). Ils reçoivent également de nombreuses afférences de plusieurs autres structures du CNS. Les neurones à AgRP et à POMC sont donc en position idéale pour intégrer les entrées périphériques et centrales et exercer une commande centrale sur le comportement alimentaire. Certains paradigmes ont alors été mis au point afin d'étudier et de comprendre l'action de ces neurones dans la régulation de la balance énergétique, notamment lors de la réponse alimentaire induite par le jeûne (Singru et al., 2007 ; Sanchez et al., 2008). En particulier, lorsque des souris sont soumises à un jeûne, puis réexposées à la nourriture, lors d'un paradigme de « refeeding », elles présentent une réponse hyperphagique. Cette réponse est en partie contrôlée par l'action des neurones à POMC sur le PVN (Singru et al., 2007 ; Sanchez et al., 2008), tandis que les neurones à AgRP sont inactivés (Riediger et al., 2004 ; Becskei et al., 2009). De plus, ces modifications d'activité neuronale semblent être très rapides et intervenir avant même que la nourriture ne soit consommée, au moment même où la nourriture est présentée à l'animal, suggérant donc que ces neurones hypothalamiques reçoivent des informations en temps réel sur la disponibilité en nourriture de notre environnement (Chen et al., 2015). Nos données expérimentales présentées dans le Chapitre II viennent corroborer ces observations puisque les souris réexposées à la nourriture présentent une augmentation de l'activité des neurones à POMC en comparaison aux souris à jeun. Mais nos expériences ont surtout permis de mettre en avant certains mécanismes et voies intracellulaires mis en jeu par les neurones à POMC dans la modulation de la prise alimentaire induite par un jeûne. Enfin, nos données ont également mis en évidence une hétérogénéité du profil des neurones à POMC, notamment au niveau du type de neurotransmetteur produit, mais également dans la modulation de la réponse hyperphagique induite par le jeûne. En effet, nous avons surtout démontré que différemment de ce que l'on pensait jusqu'à présent, bien qu'une partie des neurones à POMC, de type glutamatergique, inhibent bien la prise alimentaire, une autre partie de ces neurones à POMC, de type GABAergique, favorisent, quant à eux, la prise alimentaire. Bien que ces données confirment, en un sens, l'importance des neurones à POMC, elles remettent également en question les notions classiques de la fonction de ces neurones dans la régulation de la balance énergétique.

### *Les neurones à POMC, une population hétérogène*

Depuis plusieurs années, ces neurones se sont vus également attribuer la capacité de libérer des neurotransmetteurs. En effet, tandis que la grande majorité des neurones à AgRP expriment également le GABA (Cowley et al., 2001), les neurones à POMC semblent avoir un profil beaucoup plus hétérogène (Hentges et al., 2009 ; Dicken et al., 2012 ; Jarvie and Hentges, 2012 ; Wittmann et al., 2013). En effet, ces neurones seraient capables de libérer soit du GABA, soit du glutamate, soit les deux (Hentges et al., 2009 ; Dicken et al., 2012 ; Jarvie and Hentges, 2012 ; Wittmann et al., 2013). Basé sur l'hypothèse que trois sous-populations puissent être identifiées, nous avons réalisé un séquençage des RNAs en cellule unique, qui a en effet confirmé, qu'en raison de la production de GABA, de glutamate ou les deux, que l'on peut distinguer d'un point de vue moléculaire trois sous-populations de neurones à POMC. D'autre part, les neurones à POMC sont activés par les signaux périphériques associés à la faim et à la satiété, tels que la leptine et l'insuline (Takahashi and Cone, 2005 ; Williams et al., 2010). Cependant, l'existence de plusieurs populations de neurones à POMC conduisent à émettre l'hypothèse que la leptine et l'insuline pourraient avoir des actions différentes et distinctes en fonction des sous-populations de neurones à POMC sur lesquelles elles agissent (Hill et al., 2010 ; Williams et al., 2010 ; Sohn et al., 2011). En accord avec cette hypothèse, des études électrophysiologiques préliminaires menées par notre laboratoire ont également montré que l'activité électrique de ces différentes sous-populations était différenciellement modulée par la leptine. En effet, les neurones à POMC de type GABAergique seraient inhibés, tandis que les neurones de type glutamatergiques seraient activés par l'administration de leptine. Notre profil d'expression génique différentiel renseigne également en ce sens sur une possible sélectivité de ces sous-populations neuronales dans la régulation de différentes fonctions cellulaires. En particulier, les neurones à POMC GABAergiques sembleraient impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides ainsi que la transcription et le catabolisme des protéines. A l'inverse, les neurones à POMC glutamatergiques sembleraient dans la fonction des vésicules synaptiques, le métabolisme des purines et la liaison du GTP. Enfin, les neurones à POMC mixtes sembleraient impliqués dans la production d'ATP et la respiration cellulaire, ainsi que l'activité des récepteurs à orexines, la séquestration du calcium et l'autophagie. Nos données comportementales offrent également quelques informations sur une régulation opposée de ces sous-populations sur la prise alimentaire. Il existe donc, au sein des neurones à POMC, plusieurs sous-populations qui se distinguent selon le type de neurotransmetteurs qu'elles libèrent ainsi que les fonctions qu'elles régulent. Ces sous-populations neuronales pourraient donc être impliquées différemment et ainsi permettre d'exercer un contrôle fin de la régulation



de la balance énergétique. Enfin, l'apparition de l'obésité pourrait être due à une sélectivité de la sensibilité de ces neurones à un régime riche en graisses conduisant à la suractivation ou à la sous-activation de l'une ou l'autre de ces sous-populations, voire une combinaison des deux. La sous-population de neurones à POMC mixte pourrait alors constituer une réserve neuronale pouvant alors se différencier en l'une ou l'autre sous-population à la demande. Cependant, cette différenciation, en diminuant le nombre de ces neurones au cours du temps, pourrait entraîner un déséquilibre et pourrait alors participer voire accélérer l'apparition de l'obésité. D'autre part, cette population pourrait également participer à la formation d'un réseau intra-hypothalamique, en formant des connexions activatrices et inhibitrices sur les deux autres populations de neurones à POMC, visant à réguler de façon très fine l'activité de ces populations glutamatergiques et GABAergiques.

*mTORC1 est un acteur essentiel de la régulation de la balance énergétique*

mTORC1 est une voie de signalisation intracellulaire agissant comme un détecteur d'énergie, capable d'intégrer les signaux nutritionnels et hormonaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, et également capable de contrôler une multitude de fonctions intracellulaires, dont l'activité neuronale (Cota et al., 2006 ; Knight et al., 2012; Laplante and Sabatini, 2012). De nombreuses études ont alors étudié l'activité de cette voie et ont observé qu'une suractivation de mTORC1, notamment dans les neurones à POMC, entraînait des changements morphologiques et fonctionnels conduisant à une hyperphagie et une obésité (Mori et al., 2009 ; Yang et al., 2012). Ces données démontrent l'importance d'une voie de signalisation de mTORC1 intacte dans la protection contre l'apparition de l'obésité. Elles démontrent également que des altérations morphologiques propres aux neurones à POMC suffisent pour conduire à un dérèglement de la balance énergétique, entraînant notamment une augmentation de la prise alimentaire et de poids corporel. Nos données expérimentales ont permis de montrer que mTORC1 est recruté dans les neurones à POMC lors d'un paradigme de « refeeding » entraînant la libération du peptide anorexigène  $\alpha$ -MSH. Cependant, nos données électrophysiologiques démontrent que mTORC1 ne module pas uniformément l'excitabilité des neurones à POMC ; mTORC1 active les neurones à POMC de type glutamatergique, tandis qu'il inhibe les neurones à POMC de type GABAergique. Ces données corrélées à nos données comportementales et transcriptionnelles indiqueraient que l'activation de mTORC1 dans les neurones à POMC GABAergiques, éteindrait cette population neuronale, tandis que l'activation de mTORC1 dans les neurones à POMC glutamatergiques, en activant cette population neuronale, entraînerait une réduction de la prise alimentaire. Par ailleurs, les effets de mTORC1

sur l'activité électrique des neurones à POMC est très rapide. Or, certaines études ont démontré l'implication de mTORC1 dans la régulation de l'activité de canaux ioniques neuronaux (Ruan et al., 2008 ; Yang et al., 2012 ; Sosanya et al., 2015). Notre profil d'expression génique différentiel révèle également une certaine expression différentielle de différents types de récepteurs membranaires. Ces données suggèrent que mTORC1 pourrait être capable de moduler l'excitabilité des neurones à POMC en régulant leur composition membranaire en canaux ioniques ou via la régulation de canaux ioniques spécifiques de l'une ou l'autre de ces sous-populations neuronales.

### *L'ECS participe à la régulation hypothalamique de la prise alimentaire*

L'ECS est depuis longtemps considéré comme jouant un rôle clé dans la régulation de la balance énergétique (Cota, 2007; Bermudez-Silva et al., 2012 ; Silvestri and Di Marzo, 2013 ; Mazier et al., 2015). Son action au niveau périphérique lui accorde une place préférentielle dans le contrôle de la prise alimentaire, l'absorption des nutriments et la dépense énergétique. L'ECS joue également un rôle important dans la régulation de la balance énergétique au niveau central. Une hyperactivité de ce système pourrait ainsi aisément contribuer à l'apparition de problèmes métaboliques et affecter notre alimentation ainsi que notre dépense énergétique, pouvant ensuite conduire au développement de l'obésité (Quarta et al., 2011; Bermudez-Silva et al., 2012). Sachant que les CB1Rs sont exprimés dans l'hypothalamus et leur activation très efficace (Marsicano and Lutz, 1999), de nombreuses études se sont alors penchées sur le rôle de l'ECS dans la régulation hypothalamique de la balance énergétique (Jo et al., 2005 ; Tasker, 2006 ; Cardinal et al., 2012). En accord avec ces études, nous observons également une modulation de l'ECS au niveau hypothalamique lors d'un paradigme de « refeeding ». En effet, nous montrons que le jeûne entraîne une augmentation, tandis que la réexposition à la nourriture entraîne une diminution des niveaux d'expression d'AEA sans modification des niveaux d'expression du 2-AG. De plus, nous montrons que ces effets se situent en aval de l'action des mélanocortines dans la modulation de la prise alimentaire, confirmant la littérature déjà existante sur le sujet (Verty et al., 2004 ; Matias et al., 2008; Monge-Roffarello et al., 2014). En outre, cette sélectivité dans la production et la libération d'AEA pourrait être très importante dans les effets physiologiques observés dans notre étude. L'AEA et le 2-AG ne possèdent pas les mêmes enzymes de production et de dégradation (Mazier et al., 2015), suggérant une possible modulation différentielle des différents acteurs contrôlant leur synthèse. Ainsi, la libération d' $\alpha$ -MSH pourrait spécifiquement inhiber la synthèse d'AEA. D'autres études ont également montré un effet antagoniste de l'action de l'AEA et du 2-AG, notamment où l'AEA

entraîne la réduction de la synthèse, du métabolisme et des effets physiologiques du 2-AG (Maccarrone et al., 2008). Ceci pourrait suggérer que le 2-AG agit à un niveau basal en inhibant la prise alimentaire, tandis que l'AEA, en antagonisant les effets du 2-AG, favoriserait l'alimentation. Par ailleurs, dans le CNS, les endocannabinoïdes agissent de façon rétrograde au niveau des CB1Rs, généralement afin de réduire la libération des neurotransmetteurs (Richard et al., 2009). Bien que l'ECS soit considéré comme un signal orexigène puissant, des données montrent que l'activation des CB1Rs sur les neurones GABAergiques entraîne une hypophagie, tandis que l'activation des CB1Rs sur les neurones glutamatergiques augmente la prise alimentaire (Bellocchio et al., 2010). Nos données expérimentales suggèrent que l'action de l'AEA pourrait être médiée par les CB1Rs présents sur les neurones à POMC et que les CB1Rs exprimés par les neurones à POMC GABAergiques déterminent l'amplitude de l'hyperphagie induite par un jeûne. Une étude récente a d'ailleurs également mis en avant le fait qu'une augmentation de l'activité des neurones à POMC pouvait être associée à une activation de l'ECS et favoriser la prise alimentaire (Koch et al., 2015), venant ainsi appuyer nos données expérimentales dévoilant un rôle encore non suspecté jusqu'à peu des neurones à POMC dans la promotion de la prise alimentaire.

*Le système mélanocortine, mTORC1 et l'ECS participent ensemble à la régulation de la prise alimentaire*

Nos données expérimentales ainsi que certaines études préliminaires ont permis de dresser un premier schéma interconnectant l'action des neurones à POMC et des voies de signalisation de mTORC1 et de l'ECS dans la modulation de la prise alimentaire. En effet, lors de la réexposition alimentaire, les neurones à POMC sont activés et recrutent mTORC1. L'activation des neurones à POMC entraîne la libération d' $\alpha$ -MSH qui inhiberait la synthèse d'endocannabinoïdes notamment au niveau des neurones parvocellulaires du PVN. En effet, nos données électrophysiologiques démontrent que l'application de MTII restaure la fréquence des mEPSCs, inhibée par l'application de RAPA. Tandis que l'application de WIN55,212-2, un agoniste des CB1Rs, après application de MTII diminue la fréquence des mEPSCs, sans que l'inverse ne soit vrai. Ainsi, l'inhibition de la synthèse d'endocannabinoïdes par l' $\alpha$ -MSH permettrait de lever spécifiquement l'inhibition sur la libération de glutamate par les neurones à POMC, ce qui entraînerait l'activation des neurones parvocellulaires du PVN, et ainsi la réduction de la prise alimentaire jusqu'à la cessation du repas. Cependant, encore beaucoup d'éléments restent à définir même si nos données permettent de voir plus clairement comment le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire s'organise. Nous devons tout d'abord

étudier d'un point de vue comportemental, si l'administration conjuguée de RAPA et d'inhibiteurs de la transmission glutamatergique chez les souris POMC-CB1-KO augmente encore plus l'effet hyperphagique induit par la RAPA chez ces souris. Il pourrait également être intéressant d'utiliser une stratégie basée sur le système Cre/Flp, qui consiste à croiser des souris exprimant la Cre recombinase (telles que nos souris POMC-Cre) avec des souris exprimant la Flp recombinase, soit dans les neurones glutamatergiques ou GABAergiques (Harris et al., 2014 ; Madisen et al., 2015). Nous pourrions alors spécifiquement exprimer dans les neurones à POMC de type glutamatergique ou de type GABAergique le DREADD ou la ChR2 et activer spécifiquement ces sous-populations neuronales, et ainsi étudier leurs fonctions respectives dans la régulation de la balance énergétique.

*L'intégrité de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC est essentielle au maintien de l'homéostasie énergétique tout au long de la vie*

En conditions riches en nutriments, comme lors d'un paradigme de « refeeding », mTORC1 favorise les processus anaboliques cellulaires en inhibant l'autophagie (Laplante and Sabatini, 2013). L'autophagie est un processus nécessaire afin de fournir de l'énergie à l'organisme en conditions pauvres en nutriments (Laplante and Sabatini, 2013). mTORC1 nécessite également la présence de p62/SQSTM1, qui est une protéine adaptatrice impliquée dans la reconnaissance des substrats spécifiques et leur recrutement vers l'autophagosome (Sancak et al., 2008 ; Duran et al., 2011 ; Johansen and Lamark, 2011), et dont l'expression est modulée par le jeûne ou la réexposition à la nourriture après un jeûne (Moscat and Diaz-Meco, 2011). De plus, la suppression de l'autophagie ou la délétion de *p62/SQSTM1* au niveau cérébral entraîne une hyperphagie et une obésité associées à des altérations du métabolisme et de la morphologie neuronale (Rodriguez et al., 2006 ; Coupe et al., 2012 ; Quan et al., 2012 ; Harada et al., 2013). Ces études ainsi que le rôle joué par la voie de mTORC1 dans la régulation de la fonction des neurones à POMC que nous avons mis en évidence nous ont poussés à évaluer le rôle de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC dans la régulation de la balance énergétique. Nos données confirment l'importance de la présence de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC dans la régulation de la balance énergétique et le développement de l'obésité. En effet, les souris dépourvues de p62/SQSTM1 dans les neurones à POMC sont hyperphagiques et obèses et développent des altérations du métabolisme. De plus, la voie de signalisation de mTORC1 semble également altérée et les neurones à POMC présentent également des altérations morphologiques, appuyant davantage l'importance de l'intégrité de p62/SQSTM1 et de mTORC1 au sein des neurones à POMC dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Ces

études n'ont pour l'instant permis de définir avec certitude des relations de causalité entre les modifications phénotypiques et moléculaires mais permettent cependant de souligner plusieurs hypothèses. En effet, l'absence de p62/SQSTM1 pourrait induire une altération de l'activité de mTORC1. Cette sous-activation de mTORC1 pourrait être responsable de la résistance à la leptine, ainsi que de la réduction du corps cellulaire et des projections axonales des neurones à POMC et de la libération d' $\alpha$ -MSH, et ces neurones ne pourraient ainsi plus exercer de contrôle fin de la prise alimentaire, ce qui favoriserait le développement de l'obésité. Une quantification de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 au sein des neurones à POMC sera donc nécessaire afin de déterminer si l'absence de p62/SQSTM1 au sein de ces neurones pourrait induire une altération de l'activité de mTORC1 et ainsi être la cause du développement de l'obésité chez les souris POMC-p62-KO. L'absence potentielle d'autophagie pourrait également être un facteur favorisant le développement de l'obésité. En effet, en conditions pauvre en énergie, la dégradation des organites et protéines intracellulaires ne s'effectuant plus, aucune autre énergie que les apports nutritionnels ne fournirait l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule, favorisant ainsi la prise alimentaire et de poids corporel. D'autre part, l'accumulation d'organites et de protéines pourrait entraîner une neuroinflammation conduisant à la mort cellulaire des neurones à POMC et ainsi une augmentation de la prise alimentaire. En effet, des études ont démontré une augmentation de l'expression de p62/SQSTM1 dans certains cancers et maladies neurodégénératives (Moscat and Diaz-Meco, 2011; Puissant et al., 2012), tandis que l'obésité est souvent associée à une neuroinflammation (De Souza et al., 2005 ; Thaler and Schwartz, 2010). Cependant, une caractérisation plus complète des mécanismes cellulaires impliqués seront nécessaires pour une meilleure compréhension de l'action de p62/SQSTM1, et potentiellement de l'autophagie, dans la régulation de la balance énergétique et le développement de l'obésité. En particulier, une quantification de marqueurs de l'autophagie, tels que LC3 et Atg7 au sein des neurones à POMC sera nécessaire ; ceci pouvant être associé à une quantification des marqueurs de l'inflammation, tels que NF- $\kappa$ B ou l'interleukine 1 $\beta$  (Duran et al., 2008 ; Meng and Cai, 2011 ; Lee et al., 2012) ainsi que des marqueurs de l'apoptose, tels que les caspases (Moscat and Diaz-Meco, 2009), qui sont également connus pour être modulés par l'action de p62/SQSTM1.

#### *Qu'en est-il lorsque nous consommons un régime riche en graisses ?*

Nous savons que la délétion du gène *Pomc* entraîne le développement d'une obésité (Yaswen et al., 1999) et que la délétion du gène *Mc4r* provoque une obésité morbide et précoce (Krude et al., 1998), démontrant l'importance d'un système mélanocortine intact dans le

contrôle de la prise pondérale. De plus, de nombreuses études ont également montré de l'importance d'une voie de mTORC1 intacte dans les neurones à AgRP et à POMC dans la protection contre le développement d'une obésité (Mori et al., 2009 ; Kocalis et al., 2014 ; Smith et al., 2015 ; Caron et al., 2016). Nous avons dans un premier temps pu observer que l'absence de la protéine p62/SQSTM1, qui est notamment régulée par mTORC1, des neurones à POMC entraîne le développement d'une obésité chez des souris nourries en régime standard normocalorique. Lorsque ces souris étaient nourries par un régime riche en graisses pendant 48h, nous avons observé une altération de la flexibilité métabolique, caractérisée par une diminution de la dépense énergétique couplé à une augmentation de la prise alimentaire. Cependant, une exposition chronique à un régime HFD n'accélère pas l'apparition de l'obésité. De plus, nos données préliminaires de souris nourries en régime HFD suggèrent des changements très précoces sur la capacité de la RAPA à moduler l'activité électrique ainsi que la transmission synaptique des neurones à POMC, mais également sur la modulation de la prise alimentaire lors d'un paradigme de « refeeding ». Ces données suggèrent que l'activité de la voie de mTORC1 et des neurones à POMC est très rapidement modulée par l'alimentation et que la durée de l'exposition à un tel changement alimentaire pourrait induire des modifications, notamment au niveau du recrutement de mTORC1 et de l'excitabilité des neurones à POMC, qui favoriseraient l'installation du phénotype obèse.

De multiples études scientifiques sont consacrées à l'étude de la régulation de la balance énergétique, dans l'espoir d'identifier des mécanismes physiopathologiques, voire des agents pharmacologiques, pour lutter contre l'obésité. Nos données ont permis de mettre en exergue de nouveaux mécanismes d'action et de nouvelles interactions entre plusieurs acteurs importants dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire. Notre étude remet en question les notions classiques sur la fonction des neurones à POMC dans la balance énergétique, en démontrant l'existence d'une hétérogénéité structurale, moléculaire et fonctionnelle de ces neurones hypothalamiques. Notre étude a également permis d'identifier les voies de signalisation de mTORC1 et l'ECS comme des acteurs fondamentaux et interconnectés, participant activement au contrôle fin de la régulation par les neurones à POMC de la prise alimentaire. De plus, nous avons également démontré l'importance de la protéine p62/SQSTM1 et de l'intégrité de neurones à POMC dans le maintien sur le long terme de

l'homéostasie énergétique. Au final, nos données offrent de nouvelles pistes d'étude dans la compréhension de la régulation de la balance énergétique et peut-être de nouvelles cibles pour le développement d'un traitement contre cette pandémie.

## Bibliographie





## A.

Abdel-Malek, Z.A. (2001). Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58, 434-441.

Abel, E.L. (1975). Cannabis: effects on hunger and thirst. *Behavioral biology* 15, 255-281.

Aguilar, V., Alliouachene, S., Sotiropoulos, A., Sobering, A., Athesa, Y., Djouadi, F., Miraux, S., Thiaudiere, E., Foretz, M., Viollet, B., *et al.* (2007). S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase. *Cell metabolism* 5, 476-487.

Albrecht, U. (2012). Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74, 246-260.

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15, 6541-6551.

Allison, M.B., and Myers, M.G., Jr. (2014). 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *The Journal of endocrinology* 223, T25-35.

Anand, B.K., and Brobeck, J.R. (1951). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24, 123-140.

Anand, B.K., Chhina, G.S., Sharma, K.N., Dua, S., and Singh, B. (1964). Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *The American journal of physiology* 207, 1146-1154.

Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C.R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S.R., Carling, D., and Small, C.J. (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *The Journal of biological chemistry* 279, 12005-12008.

Andrade, M.A., and Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature genetics* 11, 115-116.

Andrade, M.A., Perez-Iratxeta, C., and Ponting, C.P. (2001). Protein repeats: structures, functions, and evolution. *Journal of structural biology* 134, 117-131.

Arsham, A.M., Howell, J.J., and Simon, M.C. (2003). A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *The Journal of biological chemistry* 278, 29655-29660.

Ashford, M.L., Boden, P.R., and Treherne, J.M. (1990). Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 415, 479-483.

Ashton, J.C., and Glass, M. (2007). The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Current neuropharmacology* 5, 73-80.

Asnicar, M.A., Smith, D.P., Yang, D.D., Heiman, M.L., Fox, N., Chen, Y.F., Hsiung, H.M., and Koster, A. (2001). Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology* 142, 4394-4400.

Auguet, T., Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Terra, X., Martinez, S., Aguilar, C., Filiu, E., Alibalic, A., Sabench, F., Hernandez, M., *et al.* (2014). Endocannabinoid receptors gene expression in morbidly obese women with nonalcoholic fatty liver disease. *BioMed research international* 2014, 502542.

Averous, J., and Proud, C.G. (2006). When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene* 25, 6423-6435.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* 182, 685-701.

## **B.**

Bagdade, J.D., Bierman, E.L., and Porte, D., Jr. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *The Journal of clinical investigation* 46, 1549-1557.

Bailey, P., and Bremer, F. (1921). Experimental diabetes insipidus. *Archives of internal medicine* 28, 773-803.

Bajzer, M., Olivieri, M., Haas, M.K., Pfluger, P.T., Magrisso, I.J., Foster, M.T., Tschop, M.H., Krawczewski-Carhuatanta, K.A., Cota, D., and Obici, S. (2011). Cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonism enhances glucose utilisation and activates brown adipose tissue in diet-induced obese mice. *Diabetologia* 54, 3121-3131.

Bakkali-Kassemi, L., El Ouezzani, S., Magoul, R., Merroun, I., Lopez-Jurado, M., and Errami, M. (2011). Effects of cannabinoids on neuropeptide Y and beta-endorphin expression in the rat hypothalamic arcuate nucleus. *The British journal of nutrition* 105, 654-660.

Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., *et al.* (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell metabolism* 19, 293-301.

Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Tang, V., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Chua, S.C., Jr., Elmquist, J.K., *et al.* (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42, 983-991.

Balthasar, N., Dalgaard, L.T., Lee, C.E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R.A., Kenny, C.D., *et al.* (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123, 493-505.

Baskin, D.G., Schwartz, M.W., Sipols, A.J., D'Alessio, D.A., Goldstein, B.J., and White, M.F. (1994). Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain. *Endocrinology* 134, 1952-1955.

Battista, N., Di Tommaso, M., Bari, M., and Maccarrone, M. (2012). The endocannabinoid system: an overview. *Frontiers in behavioral neuroscience* 6, 9.

Bauchart-Thevret, C., Cui, L., Wu, G., and Burrin, D.G. (2010). Arginine-induced stimulation of protein synthesis and survival in IPEC-J2 cells is mediated by mTOR but not nitric oxide. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 299, E899-909.

- Bauman, A.E., Reis, R.S., Sallis, J.F., Wells, J.C., Loos, R.J., Martin, B.W., and Lancet Physical Activity Series Working, G. (2012). Correlates of physical activity: why are some people physically active and others not? *Lancet* 380, 258-271.
- Beck, B. (2006). Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361, 1159-1185.
- Becskei, C., Lutz, T.A., and Riediger, T. (2009). Diet-derived nutrients mediate the inhibition of hypothalamic NPY neurons in the arcuate nucleus of mice during refeeding. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 297, R100-110.
- Begrache, K., Sutton, G.M., and Butler, A.A. (2011). Homeostatic and non-homeostatic functions of melanocortin-3 receptors in the control of energy balance and metabolism. *Physiology & behavior* 104, 546-554.
- Belgardt, B.F., Okamura, T., and Bruning, J.C. (2009). Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. *The Journal of physiology* 587, 5305-5314.
- Belgardt, B.F., and Bruning, J.C. (2010). CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1212, 97-113.
- Bellinger, L.L., and Bernardis, L.L. (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiology & behavior* 76, 431-442.
- Bellocchio, L., Lafenetre, P., Cannich, A., Cota, D., Puente, N., Grandes, P., Chaouloff, F., Piazza, P.V., and Marsicano, G. (2010). Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nature neuroscience* 13, 281-283.
- Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 9048-9052.
- Bermudez-Silva, F.J., Viveros, M.P., McPartland, J.M., and Rodriguez de Fonseca, F. (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 95, 375-382.
- Bermudez-Silva, F.J., Cardinal, P., and Cota, D. (2012). The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *Journal of psychopharmacology* 26, 114-124.
- Bewick, G.A., Gardiner, J.V., Dhillo, W.S., Kent, A.S., White, N.E., Webster, Z., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1680-1682.
- Bhaskar, P.T., and Hay, N. (2007). The two TORCs and Akt. *Developmental cell* 12, 487-502.
- Bi, S., Kim, Y.J., and Zheng, F. (2012). Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides* 46, 309-314.

- Biggers, D.W., Myers, S.R., Neal, D., Stinson, R., Cooper, N.B., Jaspan, J.B., Williams, P.E., Cherrington, A.D., and Frizzell, R.T. (1989). Role of brain in counterregulation of insulin-induced hypoglycemia in dogs. *Diabetes* 38, 7-16.
- Binder, E., Bermudez-Silva, F.J., Andre, C., Elie, M., Romero-Zerbo, S.Y., Leste-Lasserre, T., Belluomo, I., Duchamp, A., Clark, S., Aubert, A., *et al.* (2013). Leucine supplementation protects from insulin resistance by regulating adiposity levels. *PloS one* 8, e74705.
- Blouet, C., Ono, H., and Schwartz, G.J. (2008). Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell metabolism* 8, 459-467.
- Blouet, C., Jo, Y.H., Li, X., and Schwartz, G.J. (2009). Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 8302-8311.
- Blouet, C., and Schwartz, G.J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural brain research* 209, 1-12.
- Bowles, N.P., Karatsoreos, I.N., Li, X., Vemuri, V.K., Wood, J.A., Li, Z., Tamashiro, K.L., Schwartz, G.J., Makriyannis, A.M., Kunos, G., *et al.* (2015). A peripheral endocannabinoid mechanism contributes to glucocorticoid-mediated metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 285-290.
- Breslow, M.J., Min-Lee, K., Brown, D.R., Chacko, V.P., Palmer, D., and Berkowitz, D.E. (1999). Effect of leptin deficiency on metabolic rate in ob/ob mice. *The American journal of physiology* 276, E443-449.
- Breunig, E., Manzini, I., Piscitelli, F., Gutermann, B., Di Marzo, V., Schild, D., and Czesnik, D. (2010). The endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol controls odor sensitivity in larvae of *Xenopus laevis*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 8965-8973.
- Brown, L.M., Clegg, D.J., Benoit, S.C., and Woods, S.C. (2006). Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiology & behavior* 89, 687-691.
- Bruning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland, D., and Kahn, C.R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-2125.
- Buettner, C., Muse, E.D., Cheng, A., Chen, L., Scherer, T., Poci, A., Su, K., Cheng, B., Li, X., Harvey-White, J., *et al.* (2008). Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nature medicine* 14, 667-675.
- Buller, C.L., Loberg, R.D., Fan, M.H., Zhu, Q., Park, J.L., Vesely, E., Inoki, K., Guan, K.L., and Brosius, F.C., 3rd (2008). A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *American journal of physiology Cell physiology* 295, C836-843.
- Burdyga, G., Varro, A., Dimaline, R., Thompson, D.G., and Dockray, G.J. (2010). Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons: kinetics and role in influencing neurochemical phenotype. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 299, G63-69.

Butler, A.A., Kesterson, R.A., Khong, K., Cullen, M.J., Pelleymounter, M.A., Dekoning, J., Baetscher, M., and Cone, R.D. (2000). A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* *141*, 3518-3521.

## C.

Cai, H., Cong, W.N., Daimon, C.M., Wang, R., Tschop, M.H., Seigny, J., Martin, B., and Maudsley, S. (2013). Altered lipid and salt taste responsivity in ghrelin and GOAT null mice. *PloS one* *8*, e76553.

Canteras, N.S., Simerly, R.B., and Swanson, L.W. (1994). Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *The Journal of comparative neurology* *348*, 41-79.

Cardenas, M.E., Cutler, N.S., Lorenz, M.C., Di Como, C.J., and Heitman, J. (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & development* *13*, 3271-3279.

Cardinal, P., Bellocchio, L., Clark, S., Cannich, A., Klugmann, M., Lutz, B., Marsicano, G., and Cota, D. (2012). Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology* *153*, 4136-4143.

Cardinal, P., Andre, C., Quarta, C., Bellocchio, L., Clark, S., Elie, M., Leste-Lasserre, T., Maitre, M., Gonzales, D., Cannich, A., *et al.* (2014). CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Molecular metabolism* *3*, 705-716.

Cardinal, P., Bellocchio, L., Guzman-Quevedo, O., Andre, C., Clark, S., Elie, M., Leste-Lasserre, T., Gonzales, D., Cannich, A., Marsicano, G., *et al.* (2015). Cannabinoid type 1 (CB1) receptors on Sim1-expressing neurons regulate energy expenditure in male mice. *Endocrinology* *156*, 411-418.

Carnevali, L.S., Masuda, K., Frigerio, F., Le Bacquer, O., Um, S.H., Gandin, V., Topisirovic, I., Sonenberg, N., Thomas, G., and Kozma, S.C. (2010). S6K1 plays a critical role in early adipocyte differentiation. *Developmental cell* *18*, 763-774.

Caron, A., Labbe, S.M., Lanfray, D., Blanchard, P.G., Villot, R., Roy, C., Sabatini, D.M., Richard, D., and Laplante, M. (2016). Mediobasal hypothalamic overexpression of DEPTOR protects against high-fat diet-induced obesity. *Molecular metabolism* *5*, 102-112.

Cha, S.H., Rodgers, J.T., Puigserver, P., Chohnan, S., and Lane, M.D. (2006). Hypothalamic malonyl-CoA triggers mitochondrial biogenesis and oxidative gene expression in skeletal muscle: Role of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 15410-15415.

Chakrabarti, P., English, T., Shi, J., Smas, C.M., and Kandror, K.V. (2010). Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes* *59*, 775-781.

Chakravarthy, M.V., Zhu, Y., Lopez, M., Yin, L., Wozniak, D.F., Coleman, T., Hu, Z., Wolfgang, M., Vidal-Puig, A., Lane, M.D., *et al.* (2007). Brain fatty acid synthase activates

- PPAR $\alpha$  to maintain energy homeostasis. *The Journal of clinical investigation* 117, 2539-2552.
- Chalhoub, N., and Baker, S.J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology* 4, 127-150.
- Chan, E.Y. (2009). mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex. *Science signaling* 2, pe51.
- Chan, E.Y., Longatti, A., McKnight, N.C., and Tooze, S.A. (2009). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Molecular and cellular biology* 29, 157-171.
- Chang, G.R., Chiu, Y.S., Wu, Y.Y., Chen, W.Y., Liao, J.W., Chao, T.H., and Mao, F.C. (2009). Rapamycin protects against high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Journal of pharmacological sciences* 109, 496-503.
- Chapman, C.D., Dono, L.M., French, M.C., Weinberg, Z.Y., Schuette, L.M., and Currie, P.J. (2012). Paraventricular nucleus anandamide signaling alters eating and substrate oxidation. *Neuroreport* 23, 425-429.
- Cheadle, J.P., Reeve, M.P., Sampson, J.R., and Kwiatkowski, D.J. (2000). Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Human genetics* 107, 97-114.
- Chen, A.S., Marsh, D.J., Trumbauer, M.E., Frazier, E.G., Guan, X.M., Yu, H., Rosenblum, C.I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., *et al.* (2000). Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nature genetics* 26, 97-102.
- Chen, Y., Zhou, J., Xie, N., Huang, C., Zhang, J.Q., Hu, Z.L., Ni, L., Jin, Y., Wang, F., Chen, J.G., *et al.* (2012). Lowering glucose level elevates [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons through P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel activation and GSK3 $\beta$  inhibition. *Acta pharmacologica Sinica* 33, 594-605.
- Chen, Y., Lin, Y.C., Kuo, T.W., and Knight, Z.A. (2015). Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits. *Cell* 160, 829-841.
- Cheng, J.B., and Russell, D.W. (2004). Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. *The Journal of biological chemistry* 279, 37789-37797.
- Choi, J., Chen, J., Schreiber, S.L., and Clardy, J. (1996). Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273, 239-242.
- Cinar, R., Godlewski, G., Liu, J., Tam, J., Jourdan, T., Mukhopadhyay, B., Harvey-White, J., and Kunos, G. (2014). Hepatic cannabinoid-1 receptors mediate diet-induced insulin resistance by increasing de novo synthesis of long-chain ceramides. *Hepatology* 59, 143-153.
- Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prevot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150, 5509-5519.
- Claret, M., Smith, M.A., Batterham, R.L., Selman, C., Choudhury, A.I., Fryer, L.G., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A.W., *et al.* (2007). AMPK is essential for energy

homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *The Journal of clinical investigation* *117*, 2325-2336.

Clegg, D.J., Wortman, M.D., Benoit, S.C., McOsker, C.C., and Seeley, R.J. (2002). Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes* *51*, 3196-3201.

Clement, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Vincent, M., Douared, L., Orosco, M., Assimacopoulos-Jeannet, F., Penicaud, L., and Ktorza, A. (2002). Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* *445*, 375-380.

Codogno, P., and Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell death and differentiation* *12 Suppl 2*, 1509-1518.

Cone, R.D., Lu, D., Koppula, S., Vage, D.I., Klungland, H., Boston, B., Chen, W., Orth, D.N., Pouton, C., and Kesterson, R.A. (1996). The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent progress in hormone research* *51*, 287-317; discussion 318.

Cone, R.D., Cowley, M.A., Butler, A.A., Fan, W., Marks, D.L., and Low, M.J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* *25 Suppl 5*, S63-67.

Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature neuroscience* *8*, 571-578.

Corradetti, M.N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R.A., and Guan, K.L. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes & development* *18*, 1533-1538.

Costa-Mattioli, M., and Monteggia, L.M. (2013). mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* *16*, 1537-1543.

Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thone-Reineke, C., Ortman, S., *et al.* (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *The Journal of clinical investigation* *112*, 423-431.

Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* *312*, 927-930.

Cota, D. (2007). CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes/metabolism research and reviews* *23*, 507-517.

Cota, D., Proulx, K., and Seeley, R.J. (2007a). The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology* *132*, 2158-2168.

Cota, D., Steiner, M.A., Marsicano, G., Cervino, C., Herman, J.P., Grubler, Y., Stalla, J., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G.K., *et al.* (2007b). Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology* *148*, 1574-1581.



Cota, D. (2008). Role of the endocannabinoid system in energy balance regulation and obesity. *Frontiers of hormone research* 36, 135-145.

Cota, D., Matter, E.K., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2008). The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 7202-7208.

Coupe, B., Ishii, Y., Dietrich, M.O., Komatsu, M., Horvath, T.L., and Bouret, S.G. (2012). Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell metabolism* 15, 247-255.

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480-484.

Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., *et al.* (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649-661.

Cuervo, A.M. (2008). Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends in genetics : TIG* 24, 604-612.

Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714-1719.

Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450, 736-740.

## **D.**

D'Eon, T.M., Pierce, K.A., Roix, J.J., Tyler, A., Chen, H., and Teixeira, S.R. (2008). The role of adipocyte insulin resistance in the pathogenesis of obesity-related elevations in endocannabinoids. *Diabetes* 57, 1262-1268.

Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., and Kahn, B.B. (2012). p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell metabolism* 16, 104-112.

Dallman, M.F. (2010). Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21, 159-165.

Dames, S.A., Mulet, J.M., Rathgeb-Szabo, K., Hall, M.N., and Grzesiek, S. (2005). The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *The Journal of biological chemistry* 280, 20558-20564.

Dardzinska, J.A., Malgorzewicz, S., Kaska, L., Proczko, M., Stefaniak, T., Stankiewicz, M., and Sledzinski, Z. (2014). Fasting and postprandial acyl and desacyl ghrelin levels in obese and non-obese subjects. *Endokrynologia Polska* 65, 377-381.

- de Backer, M.W., la Fleur, S.E., Brans, M.A., van Rozen, A.J., Lujendijk, M.C., Merkestein, M., Garner, K.M., van der Zwaal, E.M., and Adan, R.A. (2011). Melanocortin receptor-mediated effects on obesity are distributed over specific hypothalamic regions. *International journal of obesity* 35, 629-641.
- De Jonghe, B.C., Hayes, M.R., and Bence, K.K. (2011). Melanocortin control of energy balance: evidence from rodent models. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 2569-2588.
- De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J., and Velloso, L.A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146, 4192-4199.
- Del Prete, A., Iadevaia, M., and Loguercio, C. (2012). The role of gut hormones in controlling the food intake: what is their role in emerging diseases? *Endocrinologia y nutricion : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion* 59, 197-206.
- Deldicque, L., De Bock, K., Maris, M., Ramaekers, M., Nielens, H., Francaux, M., and Hespel, P. (2010). Increased p70s6k phosphorylation during intake of a protein-carbohydrate drink following resistance exercise in the fasted state. *European journal of applied physiology* 108, 791-800.
- Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., 3rd, Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology* 34, 605-613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., and Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T., *et al.* (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822-825.
- Di Marzo, V., and Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature neuroscience* 8, 585-589.
- Di Marzo, V., Ligresti, A., and Cristino, L. (2009). The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. *International journal of obesity* 33 *Suppl 2*, S18-24.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K.C., and Tasker, J.G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 4850-4857.
- Diano, S., Liu, Z.W., Jeong, J.K., Dietrich, M.O., Ruan, H.B., Kim, E., Suyama, S., Kelly, K., Gyengesi, E., Arbiser, J.L., *et al.* (2011). Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nature medicine* 17, 1121-1127.

Dicken, M.S., Tooker, R.E., and Hentges, S.T. (2012). Regulation of GABA and glutamate release from proopiomelanocortin neuron terminals in intact hypothalamic networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 4042-4048.

DiPatrizio, N.V., Astarita, G., Schwartz, G., Li, X., and Piomelli, D. (2011). Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12904-12908.

DiPatrizio, N.V., and Piomelli, D. (2012). The thrifty lipids: endocannabinoids and the neural control of energy conservation. *Trends in neurosciences* 35, 403-411.

DiPatrizio, N.V., Joslin, A., Jung, K.M., and Piomelli, D. (2013). Endocannabinoid signaling in the gut mediates preference for dietary unsaturated fats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 2513-2520.

Dockray, G.J. (2009). The versatility of the vagus. *Physiology & behavior* 97, 531-536.

Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K., Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2008). The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer cell* 13, 343-354.

Duran, A., Amanchy, R., Linares, J.F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., Hansen, M., Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2011). p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Molecular cell* 44, 134-146.

Duvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., *et al.* (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular cell* 39, 171-183.

## **E.**

Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., *et al.* (2008). Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell metabolism* 8, 325-332.

Efeyan, A., Comb, W.C., and Sabatini, D.M. (2015). Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517, 302-310.

Elmquist, J.K., Elias, C.F., and Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22, 221-232.

Elmquist, J.K. (2001). Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiology & behavior* 74, 703-708.

Elphick, M.R. (2012). The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 367, 3201-3215.

Enriori, P.J., Sinnayah, P., Simonds, S.E., Garcia Rudaz, C., and Cowley, M.A. (2011). Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 12189-12197.

Erol, A. (2007). Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 29, 811-818.

## **F.**

Fioramonti, X., Contie, S., Song, Z., Routh, V.H., Lorsignol, A., and Penicaud, L. (2007). Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* 56, 1219-1227.

Fioramonti, X., Marsollier, N., Song, Z., Fakira, K.A., Patel, R.M., Brown, S., Duparc, T., Pica-Mendez, A., Sanders, N.M., Knauf, C., *et al.* (2010). Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation. *Diabetes* 59, 519-528.

Fioramonti, X., Song, Z., Vazirani, R.P., Beuve, A., and Routh, V.H. (2011). Hypothalamic nitric oxide in hypoglycemia detection and counterregulation: a two-edged sword. *Antioxidants & redox signaling* 14, 505-517.

Flament-Durand, J. (1980). The hypothalamus: anatomy and functions. *Acta psychiatrica Belgica* 80, 364-375.

Fraenkel, M., Ketzinel-Gilad, M., Ariav, Y., Pappo, O., Karaca, M., Castel, J., Berthault, M.F., Magnan, C., Cerasi, E., Kaiser, N., *et al.* (2008). mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 57, 945-957.

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

Friedman, J.M. (2010). A tale of two hormones. *Nature medicine* 16, 1100-1106.

Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annual review of biochemistry* 67, 481-507.

Fujimoto, K., Hanson, P.T., Tran, H., Ford, E.L., Han, Z., Johnson, J.D., Schmidt, R.E., Green, K.G., Wice, B.M., and Polonsky, K.S. (2009). Autophagy regulates pancreatic beta cell death in response to Pdx1 deficiency and nutrient deprivation. *The Journal of biological chemistry* 284, 27664-27673.

## **G.**

Ganley, I.G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* 284, 12297-12305.

Gao, S., Kinzig, K.P., Aja, S., Scott, K.A., Keung, W., Kelly, S., Strynadka, K., Chohnan, S., Smith, W.W., Tamashiro, K.L., *et al.* (2007). Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17358-17363.

- Gautron, L., and Elmquist, J.K. (2011). Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *The Journal of clinical investigation* *121*, 2087-2093.
- Geng, J., and Klionsky, D.J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO reports* *9*, 859-864.
- Gomez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J.M., Bilbao, A., Del Arco, I., Cippitelli, A., Nava, F., Piomelli, D., and Rodriguez de Fonseca, F. (2002). A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *22*, 9612-9617.
- Gomori, A., Ishihara, A., Ito, M., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Ito, M., Tanaka, T., Tokita, S., Moriya, M., *et al.* (2003). Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *284*, E583-588.
- Gong, J., Xu, J., Bezanilla, M., van Huizen, R., Derin, R., and Li, M. (1999). Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. *Science* *285*, 1565-1569.
- Gong, J.P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., and Uhl, G.R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain research* *1071*, 10-23.
- Gordon, P.B., and Seglen, P.O. (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochemical and biophysical research communications* *151*, 40-47.
- Gordon, P.B., Hoyvik, H., and Seglen, P.O. (1992). Prelysosomal and lysosomal connections between autophagy and endocytosis. *The Biochemical journal* *283* ( Pt 2), 361-369.
- Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, I., and Stark, K.L. (1997). Overexpression of *Agrt* leads to obesity in transgenic mice. *Nature genetics* *17*, 273-274.
- Grandison, L., and Guidotti, A. (1977). Stimulation of food intake by muscimol and beta endorphin. *Neuropharmacology* *16*, 533-536.
- Gregory, J.M., Kraft, G., Scott, M.F., Neal, D.W., Farmer, B., Smith, M.S., Hastings, J.R., Allen, E.J., Donahue, E.P., Rivera, N., *et al.* (2015). Insulin Delivery Into the Peripheral Circulation: A Key Contributor to Hypoglycemia in Type 1 Diabetes. *Diabetes* *64*, 3439-3451.
- Grill, H.J., and Kaplan, J.M. (2002). The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Frontiers in neuroendocrinology* *23*, 2-40.
- Grill, H.J., and Hayes, M.R. (2012). Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance. *Cell metabolism* *16*, 296-309.
- Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A.W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., *et al.* (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature neuroscience* *8*, 1289-1291.
- Gross, J.D., Moerke, N.J., von der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E., and Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* *115*, 739-750.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Developmental cell* 11, 859-871.

Gump, J.M., and Thorburn, A. (2011). Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends in cell biology* 21, 387-392.

Gyengesi, E., Liu, Z.W., D'Agostino, G., Gan, G., Horvath, T.L., Gao, X.B., and Diano, S. (2010). Corticosterone regulates synaptic input organization of POMC and NPY/AgRP neurons in adult mice. *Endocrinology* 151, 5395-5402.

## H.

Hagan, M.M., Rushing, P.A., Pritchard, L.M., Schwartz, M.W., Strack, A.M., Van Der Ploeg, L.H., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2000). Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 279, R47-52.

Haissaguerre, M., Saucisse, N., and Cota, D. (2014). Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology* 397, 67-77.

Han, J.M., Jeong, S.J., Park, M.C., Kim, G., Kwon, N.H., Kim, H.K., Ha, S.H., Ryu, S.H., and Kim, S. (2012). Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 149, 410-424.

Hansen, T.K., Dall, R., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Christiansen, J.S., and Jorgensen, J.O. (2002). Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clinical endocrinology* 56, 203-206.

Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozlowski, M.T., Belham, C., and Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* 273, 14484-14494.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-189.

Harada, H., Warabi, E., Matsuki, T., Yanagawa, T., Okada, K., Uwayama, J., Ikeda, A., Nakaso, K., Kirii, K., Noguchi, N., *et al.* (2013). Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 14767-14777.

Hardaway, J.A., Crowley, N.A., Bulik, C.M., and Kash, T.L. (2015). Integrated circuits and molecular components for stress and feeding: implications for eating disorders. *Genes, brain, and behavior* 14, 85-97.

Harris, J.A., Hirokawa, K.E., Sorensen, S.A., Gu, H., Mills, M., Ng, L.L., Bohn, P., Mortrud, M., Ouellette, B., Kidney, J., *et al.* (2014). Anatomical characterization of Cre driver mice for neural circuit mapping and manipulation. *Frontiers in neural circuits* 8, 76.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* 18, 1926-1945.

- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature cell biology* *11*, 1433-1437.
- He, C., and Levine, B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Current opinion in cell biology* *22*, 140-149.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* *253*, 905-909.
- Hentges, S.T., Nishiyama, M., Overstreet, L.S., Stenzel-Poore, M., Williams, J.T., and Low, M.J. (2004). GABA release from proopiomelanocortin neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *24*, 1578-1583.
- Hentges, S.T., Low, M.J., and Williams, J.T. (2005). Differential regulation of synaptic inputs by constitutively released endocannabinoids and exogenous cannabinoids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *25*, 9746-9751.
- Hentges, S.T. (2007). Synaptic regulation of proopiomelanocortin neurons can occur distal to the arcuate nucleus. *Journal of neurophysiology* *97*, 3298-3304.
- Hentges, S.T., Otero-Corchon, V., Pennock, R.L., King, C.M., and Low, M.J. (2009). Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *29*, 13684-13690.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *11*, 563-583.
- Herman, C.P., and Polivy, J. (2008). External cues in the control of food intake in humans: the sensory-normative distinction. *Physiology & behavior* *94*, 722-728.
- Herman, M.A., and Kahn, B.B. (2006). Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *The Journal of clinical investigation* *116*, 1767-1775.
- Hetherington, A.W., and Ranson, S.W. (1942). The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions. *The American journal of physiology* *136*, 609-617.
- Higgs, S., Williams, C.M., and Kirkham, T.C. (2003). Cannabinoid influences on palatability: microstructural analysis of sucrose drinking after delta(9)-tetrahydrocannabinol, anandamide, 2-arachidonoyl glycerol and SR141716. *Psychopharmacology* *165*, 370-377.
- Hill, J.O., and Peters, J.C. (1998). Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* *280*, 1371-1374.
- Hill, J.W., Elias, C.F., Fukuda, M., Williams, K.W., Berglund, E.D., Holland, W.L., Cho, Y.R., Chuang, J.C., Xu, Y., Choi, M., *et al.* (2010). Direct insulin and leptin action on proopiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell metabolism* *11*, 286-297.
- Hillebrand, J.J., de Wied, D., and Adan, R.A. (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* *23*, 2283-2306.

Ho, J., Cox, J.M., and Wagner, E.J. (2007). Cannabinoid-induced hyperphagia: correlation with inhibition of proopiomelanocortin neurons? *Physiology & behavior* 92, 507-519.

Horvath, T.L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M., and Tschop, M. (2001). Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142, 4163-4169.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., *et al.* (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell* 20, 1981-1991.

Houpt, T.R., and Hance, H.E. (1971). Stimulation of food intake in the rabbit and rat by inhibition of glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose. *Journal of comparative and physiological psychology* 76, 395-400.

Howlett, A.C. (1984). Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life sciences* 35, 1803-1810.

Howlett, A.C., Qualy, J.M., and Khachatrian, L.L. (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Molecular pharmacology* 29, 307-313.

Hu, Z., Cha, S.H., Chohnan, S., and Lane, M.D. (2003). Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12624-12629.

Huang, H., Acuna-Goycolea, C., Li, Y., Cheng, H.M., Obrietan, K., and van den Pol, A.N. (2007). Cannabinoids excite hypothalamic melanin-concentrating hormone but inhibit hypocretin/orexin neurons: implications for cannabinoid actions on food intake and cognitive arousal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 4870-4881.

Huang, J., and Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *The Biochemical journal* 412, 179-190.

Huang, W., Zhu, P.J., Zhang, S., Zhou, H., Stoica, L., Galiano, M., Krnjevic, K., Roman, G., and Costa-Mattioli, M. (2013). mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nature neuroscience* 16, 441-448.

Hughes, T., and Rusten, T.E. (2007). Origin and evolution of self-consumption: autophagy. *Advances in experimental medicine and biology* 607, 111-118.

Hwa, J.J., Fawzi, A.B., Graziano, M.P., Ghibaudi, L., Williams, P., Van Heek, M., Davis, H., Rudinski, M., Sybertz, E., and Strader, C.D. (1997). Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice. *The American journal of physiology* 272, R1204-1209.

## I.

Ibrahim, N., Bosch, M.A., Smart, J.L., Qiu, J., Rubinstein, M., Ronnekleiv, O.K., Low, M.J., and Kelly, M.J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144, 1331-1340.



Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., *et al.* (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488-492.

Inhoff, T., Stengel, A., Peter, L., Goebel, M., Tache, Y., Bannert, N., Wiedenmann, B., Klapp, B.F., Monnikes, H., and Kobelt, P. (2010). Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides* *31*, 257-262.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577-590.

Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., *et al.* (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* *126*, 955-968.

Inoue, D., Suzuki, T., Mitsuishi, Y., Miki, Y., Suzuki, S., Sugawara, S., Watanabe, M., Sakurada, A., Endo, C., Uruno, A., *et al.* (2012). Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer science* *103*, 760-766.

Intemann, C.D., Thye, T., Niemann, S., Browne, E.N., Amanua Chinbuah, M., Enimil, A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Helm, S., *et al.* (2009). Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS pathogens* *5*, e1000577.

Ishac, E.J., Jiang, L., Lake, K.D., Varga, K., Abood, M.E., and Kunos, G. (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *British journal of pharmacology* *118*, 2023-2028.

Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* *6*, 764-776.

## **J.**

Jacinto, E., and Hall, M.N. (2003). Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature reviews Molecular cell biology* *4*, 117-126.

Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* *127*, 125-137.

Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Overvatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., and Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *The Journal of biological chemistry* *285*, 22576-22591.

Jamshidi, N., and Taylor, D.A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British journal of pharmacology* *134*, 1151-1154.

Janus, A., Robak, T., and Smolewski, P. (2005). The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumourigenesis and targeted antitumour therapy. *Cellular & molecular biology letters* *10*, 479-498.

Jarrett, M.M., Limebeer, C.L., and Parker, L.A. (2005). Effect of Delta9-tetrahydrocannabinol on sucrose palatability as measured by the taste reactivity test. *Physiology & behavior* 86, 475-479.

Jarrett, M.M., Scantlebury, J., and Parker, L.A. (2007). Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on quinine palatability and AM251 on sucrose and quinine palatability using the taste reactivity test. *Physiology & behavior* 90, 425-430.

Jarvie, B.C., and Hentges, S.T. (2012). Expression of GABAergic and glutamatergic phenotypic markers in hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *The Journal of comparative neurology* 520, 3863-3876.

Jelsing, J., Larsen, P.J., and Vrang, N. (2009). The effect of leptin receptor deficiency and fasting on cannabinoid receptor 1 mRNA expression in the rat hypothalamus, brainstem and nodose ganglion. *Neuroscience letters* 463, 125-129.

Jewell, J.L., and Guan, K.L. (2013). Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends in biochemical sciences* 38, 233-242.

Jiang, J., Parameshwaran, K., Seibenhener, M.L., Kang, M.G., Suppiramaniam, V., Huganir, R.L., Diaz-Meco, M.T., and Wooten, M.W. (2009). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity require SQSTM1/p62. *Hippocampus* 19, 392-406.

Jo, Y.H., Chen, Y.J., Chua, S.C., Jr., Talmage, D.A., and Role, L.W. (2005). Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* 48, 1055-1066.

Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279-296.

Jourdan, T., Godlewski, G., Cinar, R., Bertola, A., Szanda, G., Liu, J., Tam, J., Han, T., Mukhopadhyay, B., Skarulis, M.C., *et al.* (2013). Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nature medicine* 19, 1132-1140.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell* 20, 1992-2003.

Jung, H.S., Chung, K.W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y.H., Kang, T.M., Yoon, K.H., Kim, J.W., *et al.* (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell metabolism* 8, 318-324.

## **K.**

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO journal* 19, 5720-5728.

Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50, 2438-2443.

- Kaplan, B., Qazi, Y., and Wellen, J.R. (2014). Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors. *Transplantation reviews* 28, 126-133.
- Kaushik, S., Rodriguez-Navarro, J.A., Arias, E., Kiffin, R., Sahu, S., Schwartz, G.J., Cuervo, A.M., and Singh, R. (2011). Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell metabolism* 14, 173-183.
- Kaushik, S., Arias, E., Kwon, H., Lopez, N.M., Athonvarangkul, D., Sahu, S., Schwartz, G.J., Pessin, J.E., and Singh, R. (2012). Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *EMBO reports* 13, 258-265.
- Kemp, B.E., Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Michell, B.J., Chen, Z.P., and Witters, L.A. (1999). Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends in biochemical sciences* 24, 22-25.
- Khamzina, L., Veilleux, A., Bergeron, S., and Marette, A. (2005). Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146, 1473-1481.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011a). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13, 132-141.
- Kim, J., Kim, Y.C., Fang, C., Russell, R.C., Kim, J.H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K.L. (2013). Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* 152, 290-303.
- Kim, W., Doyle, M.E., Liu, Z., Lao, Q., Shin, Y.K., Carlson, O.D., Kim, H.S., Thomas, S., Napora, J.K., Lee, E.K., *et al.* (2011b). Cannabinoids inhibit insulin receptor signaling in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 60, 1198-1209.
- Kim, W., Lao, Q., Shin, Y.K., Carlson, O.D., Lee, E.K., Gorospe, M., Kulkarni, R.N., and Egan, J.M. (2012). Cannabinoids induce pancreatic beta-cell death by directly inhibiting insulin receptor activation. *Science signaling* 5, ra23.
- Kimura, N., Tokunaga, C., Dalal, S., Richardson, C., Yoshino, K., Hara, K., Kemp, B.E., Witters, L.A., Mimura, O., and Yonezawa, K. (2003). A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8, 65-79.
- King, B.M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiology & behavior* 87, 221-244.
- Kirkham, T.C., Williams, C.M., Fezza, F., and Di Marzo, V. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *British journal of pharmacology* 136, 550-557.
- Kishi, T., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Mountjoy, K.G., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *The Journal of comparative neurology* 457, 213-235.

- Kitamura, T., Feng, Y., Kitamura, Y.I., Chua, S.C., Jr., Xu, A.W., Barsh, G.S., Rossetti, L., and Accili, D. (2006). Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nature medicine* *12*, 534-540.
- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., *et al.* (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* *8*, 445-544.
- Klok, M.D., Jakobsdottir, S., and Drent, M.L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* *8*, 21-34.
- Knight, Z.A., Tan, K., Birsoy, K., Schmidt, S., Garrison, J.L., Wysocki, R.W., Emiliano, A., Ekstrand, M.I., and Friedman, J.M. (2012). Molecular profiling of activated neurons by phosphorylated ribosome capture. *Cell* *151*, 1126-1137.
- Kocalis, H.E., Hagan, S.L., George, L., Turney, M.K., Siuta, M.A., Laryea, G.N., Morris, L.C., Muglia, L.J., Printz, R.L., Stanwood, G.D., *et al.* (2014). Rictor/mTORC2 facilitates central regulation of energy and glucose homeostasis. *Molecular metabolism* *3*, 394-407.
- Koch, M., Varela, L., Kim, J.G., Kim, J.D., Hernandez-Nuno, F., Simonds, S.E., Castorena, C.M., Vianna, C.R., Elmquist, J.K., Morozov, Y.M., *et al.* (2015). Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature* *519*, 45-50.
- Kola, B., Hubina, E., Tucci, S.A., Kirkham, T.C., Garcia, E.A., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Hawley, S.A., Hardie, D.G., Grossman, A.B., *et al.* (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* *280*, 25196-25201.
- Kolaczynski, J.W., Considine, R.V., Ohannesian, J., Marco, C., Opentanova, I., Nyce, M.R., Myint, M., and Caro, J.F. (1996). Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* *45*, 1511-1515.
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., *et al.* (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of cell biology* *169*, 425-434.
- Konner, A.C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S., *et al.* (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell metabolism* *5*, 438-449.
- Kourtis, N., and Tavernarakis, N. (2009). Autophagy and cell death in model organisms. *Cell death and differentiation* *16*, 21-30.
- Kovsan, J., Bluher, M., Tarnovscki, T., Kloting, N., Kirshtein, B., Madar, L., Shai, I., Golan, R., Harman-Boehm, I., Schon, M.R., *et al.* (2011). Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *96*, E268-277.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., *et al.* (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* *393*, 72-76.

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Gruters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature genetics* *19*, 155-157.

Kudo, N., Barr, A.J., Barr, R.L., Desai, S., and Lopaschuk, G.D. (1995). High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of biological chemistry* *270*, 17513-17520.

Kuma, A., and Mizushima, N. (2008). Chromosomal mapping of the GFP-LC3 transgene in GFP-LC3 mice. *Autophagy* *4*, 61-62.

Kushi, A., Sasai, H., Koizumi, H., Takeda, N., Yokoyama, M., and Nakamura, M. (1998). Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 15659-15664.

## **L.**

Lamming, D.W., and Sabatini, D.M. (2013). A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell metabolism* *18*, 465-469.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* *122*, 3589-3594.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* *149*, 274-293.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of cell science* *126*, 1713-1719.

Lavallard, V.J., Meijer, A.J., Codogno, P., and Gual, P. (2012). Autophagy, signaling and obesity. *Pharmacological research* *66*, 513-525.

Le Bacquer, O., Petroulakis, E., Pagliarunga, S., Poulin, F., Richard, D., Cianflone, K., and Sonenberg, N. (2007). Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *The Journal of clinical investigation* *117*, 387-396.

Lee, J., Kim, H.R., Quinley, C., Kim, J., Gonzalez-Navajas, J., Xavier, R., and Raz, E. (2012). Autophagy suppresses interleukin-1beta (IL-1beta) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways. *The Journal of biological chemistry* *287*, 4033-4040.

Lee, J.H., Yu, W.H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Wolfe, D.M., Martinez-Vicente, M., Massey, A.C., Sovak, G., *et al.* (2010a). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* *141*, 1146-1158.

Lee, S.J., Kim, J.Y., Nogueiras, R., Linares, J.F., Perez-Tilve, D., Jung, D.Y., Ko, H.J., Hofmann, S.M., Drew, A., Leitges, M., *et al.* (2010b). PKCzeta-regulated inflammation in the nonhematopoietic compartment is critical for obesity-induced glucose intolerance. *Cell metabolism* *12*, 65-77.

- Leibowitz, S.F., and Wortley, K.E. (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25, 473-504.
- Leininger, G.M. (2011). Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via the lateral hypothalamus. *Physiology & behavior* 104, 572-581.
- Leloup, C., Magnan, C., Benani, A., Bonnet, E., Alquier, T., Offer, G., Carriere, A., Periquet, A., Fernandez, Y., Ktorza, A., *et al.* (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55, 2084-2090.
- Leshan, R.L., Bjornholm, M., Munzberg, H., and Myers, M.G., Jr. (2006). Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity* 14 Suppl 5, 208S-212S.
- Leshan, R.L., Greenwald-Yarnell, M., Patterson, C.M., Gonzalez, I.E., and Myers, M.G., Jr. (2012). Leptin action through hypothalamic nitric oxide synthase-1-expressing neurons controls energy balance. *Nature medicine* 18, 820-823.
- Levine, B. (2007). Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 446, 745-747.
- Levine, J.A., Eberhardt, N.L., and Jensen, M.D. (1999). Leptin responses to overfeeding: relationship with body fat and nonexercise activity thermogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84, 2751-2754.
- Lin, H.V., Plum, L., Ono, H., Gutierrez-Juarez, R., Shanabrough, M., Borok, E., Horvath, T.L., Rossetti, L., and Accili, D. (2010). Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agouti-related protein and POMC neurons. *Diabetes* 59, 337-346.
- Linares, J.F., Duran, A., Yajima, T., Pasparakis, M., Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2013). K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient-activated cells. *Molecular cell* 51, 283-296.
- Lipina, C., Stretton, C., Hastings, S., Hundal, J.S., Mackie, K., Irving, A.J., and Hundal, H.S. (2010). Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells. *Diabetes* 59, 375-385.
- Liu, H.Y., Han, J., Cao, S.Y., Hong, T., Zhuo, D., Shi, J., Liu, Z., and Cao, W. (2009). Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *The Journal of biological chemistry* 284, 31484-31492.
- Liu, J., Zhou, L., Xiong, K., Godlewski, G., Mukhopadhyay, B., Tam, J., Yin, S., Gao, P., Shan, X., Pickel, J., *et al.* (2012). Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology* 142, 1218-1228 e1211.
- Liu, Y., and Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell death and differentiation* 22, 367-376.
- Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D., and Kuhajda, F.P. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288, 2379-2381.

Lopez, M., Lelliott, C.J., Tovar, S., Kimber, W., Gallego, R., Virtue, S., Blount, M., Vazquez, M.J., Finan, N., Powles, T.J., *et al.* (2006). Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 55, 1327-1336.

Lopez, M., Lage, R., Saha, A.K., Perez-Tilve, D., Vazquez, M.J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodriguez-Cuenca, S., *et al.* (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell metabolism* 7, 389-399.

Lucassen, E.A., Rother, K.I., and Cizza, G. (2012). Interacting epidemics? Sleep curtailment, insulin resistance, and obesity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1264, 110-134.

Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S., and Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310, 683-685.

## M.

Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Pandolfi, P.P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, 179-193.

Maccarrone, M., Rossi, S., Bari, M., De Chiara, V., Fezza, F., Musella, A., Gasperi, V., Prosperetti, C., Bernardi, G., Finazzi-Agro, A., *et al.* (2008). Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nature neuroscience* 11, 152-159.

Mackelvie, K.J., Meneilly, G.S., Elahi, D., Wong, A.C., Barr, S.I., and Chanoine, J.P. (2007). Regulation of appetite in lean and obese adolescents after exercise: role of acylated and desacyl ghrelin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 648-654.

Macotela, Y., Emanuelli, B., Bang, A.M., Espinoza, D.O., Boucher, J., Beebe, K., Gall, W., and Kahn, C.R. (2011). Dietary leucine--an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PloS one* 6, e21187.

Madisen, L., Garner, A.R., Shimaoka, D., Chuong, A.S., Klapoetke, N.C., Li, L., van der Bourg, A., Niino, Y., Egnor, L., Monetti, C., *et al.* (2015). Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance. *Neuron* 85, 942-958.

Malcher-Lopes, R., Di, S., Marcheselli, V.S., Weng, F.J., Stuart, C.T., Bazan, N.G., and Tasker, J.G. (2006). Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 6643-6650.

Malenczyk, K., Jazurek, M., Keimpema, E., Silvestri, C., Janikiewicz, J., Mackie, K., Di Marzo, V., Redowicz, M.J., Harkany, T., and Dobrzyn, A. (2013). CB1 cannabinoid receptors couple to focal adhesion kinase to control insulin release. *The Journal of biological chemistry* 288, 32685-32699.

Mancini, G., Quarta, C., Srivastava, R.K., Klaus, S., Pagotto, U., and Lutz, B. (2010). Adipocyte-specific CB1 conditional knock-out mice: new insights in the study of obesity and metabolic syndrome. Paper presented at: 20th Annual Symposium on the Cannabinoids (Research Triangle Park, NC, USA).

- Mari, M., Tooze, S.A., and Reggiori, F. (2011). The puzzling origin of the autophagosomal membrane. *F1000 biology reports* 3, 25.
- Marsicano, G., and Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *The European journal of neuroscience* 11, 4213-4225.
- Marston, O.J., Hurst, P., Evans, M.L., Burdakov, D.I., and Heisler, L.K. (2011). Neuropeptide Y cells represent a distinct glucose-sensing population in the lateral hypothalamus. *Endocrinology* 152, 4046-4052.
- Martin, T.L., Alquier, T., Asakura, K., Furukawa, N., Preitner, F., and Kahn, B.B. (2006). Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* 281, 18933-18941.
- Martinez de Morentin, P.B., Martinez-Sanchez, N., Roa, J., Ferno, J., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., Dieguez, C., and Lopez, M. (2014). Hypothalamic mTOR: the rookie energy sensor. *Current molecular medicine* 14, 3-21.
- Martins, L., Fernandez-Mallo, D., Novelle, M.G., Vazquez, M.J., Tena-Sempere, M., Nogueiras, R., Lopez, M., and Dieguez, C. (2012). Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. *PloS one* 7, e46923.
- Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., *et al.* (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062-1075.
- Matias, I., Bisogno, T., and Di Marzo, V. (2006a). Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *International journal of obesity* 30 Suppl 1, S7-S12.
- Matias, I., Gonthier, M.P., Orlando, P., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Cervino, C., Petrosino, S., Hoareau, L., Festy, F., Pasquali, R., *et al.* (2006b). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91, 3171-3180.
- Matias, I., Vergoni, A.V., Petrosino, S., Ottani, A., Pocai, A., Bertolini, A., and Di Marzo, V. (2008). Regulation of hypothalamic endocannabinoid levels by neuropeptides and hormones involved in food intake and metabolism: insulin and melanocortins. *Neuropharmacology* 54, 206-212.
- Matias, I., Gatta-Cherifi, B., Tabarin, A., Clark, S., Leste-Lasserre, T., Marsicano, G., Piazza, P.V., and Cota, D. (2012). Endocannabinoids measurement in human saliva as potential biomarker of obesity. *PloS one* 7, e42399.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.
- Mayer, J. (1955). Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 63, 15-43.
- Mayer, J., and Thomas, D.W. (1967). Regulation of food intake and obesity. *Science* 156, 328-337.



- Mazier, W., Saucisse, N., Gatta-Cherifi, B., and Cota, D. (2015). The Endocannabinoid System: Pivotal Orchestrator of Obesity and Metabolic Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 26, 524-537.
- McClellan, K.M., Parker, K.L., and Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Frontiers in neuroendocrinology* 27, 193-209.
- McGowan, M.K., Andrews, K.M., and Grossman, S.P. (1992). Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiology & behavior* 51, 753-766.
- Mechoulam, R., and Gaoni, Y. (1965a). A Total Synthesis of  $\Delta^1$ -Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society* 87, 3273-3275.
- Mechoulam, R., and Gaoni, Y. (1965b). Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 21, 1223-1229.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., *et al.* (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology* 50, 83-90.
- Meijer, A.J., and Codogno, P. (2008). Autophagy: a sweet process in diabetes. *Cell metabolism* 8, 275-276.
- Meister, B. (2007). Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiology & behavior* 92, 263-271.
- Melega, W.P., Lacan, G., Gorgulho, A.A., Behnke, E.J., and De Salles, A.A. (2012). Hypothalamic deep brain stimulation reduces weight gain in an obesity-animal model. *PLoS one* 7, e30672.
- Menendez, J.A., and Atrens, D.M. (1991). Insulin and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. *Brain research* 555, 193-201.
- Meng, Q., and Cai, D. (2011). Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I $\kappa$ B kinase beta (IKK $\beta$ )/NF- $\kappa$ B pathway. *The Journal of biological chemistry* 286, 32324-32332.
- Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *The American journal of physiology* 273, E1107-1112.
- Mikuriya, T.H. (1969). Marijuana in medicine: past, present and future. *California medicine* 110, 34-40.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., *et al.* (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569-574.
- Mizuno, T.M., Kleopoulos, S.P., Bergen, H.T., Roberts, J.L., Priest, C.A., and Mobbs, C.V. (1998). Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47, 294-297.

- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* 152, 657-668.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function* 27, 421-429.
- Monge-Roffarello, B., Labbe, S.M., Roy, M.C., Lemay, M.L., Coneggo, E., Samson, P., Lanfray, D., and Richard, D. (2014). The PVH as a site of CB1-mediated stimulation of thermogenesis by MC4R agonism in male rats. *Endocrinology* 155, 3448-3458.
- Moran, T.H. (2010). Hypothalamic nutrient sensing and energy balance. *Forum of nutrition* 63, 94-101.
- Mori, H., Inoki, K., Munzberg, H., Opland, D., Faouzi, M., Villanueva, E.C., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D., MacDougald, O.A., Myers, M.G., Jr., *et al.* (2009). Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell metabolism* 9, 362-374.
- Morrison, C.D., Morton, G.J., Niswender, K.D., Gelling, R.W., and Schwartz, M.W. (2005). Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 289, E1051-1057.
- Morrison, C.D., Xi, X., White, C.L., Ye, J., and Martin, R.J. (2007). Amino acids inhibit Agrp gene expression via an mTOR-dependent mechanism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 293, E165-171.
- Mortimore, G.E., and Schworer, C.M. (1977). Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature* 270, 174-176.
- Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2009). p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* 137, 1001-1004.
- Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2011). Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections. *Cell* 147, 724-727.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., and Cone, R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular endocrinology* 8, 1298-1308.
- Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.
- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., and Yamanaka, S. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* 24, 6710-6718.
- Muroya, S., Yada, T., Shioda, S., and Takigawa, M. (1999). Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neuroscience letters* 264, 113-116.
- Murphy, B.A., Fakira, K.A., Song, Z., Beuve, A., and Routh, V.H. (2009). AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons. *American journal of physiology Cell physiology* 297, C750-758.

Muta, K., Morgan, D.A., and Rahmouni, K. (2015). The role of hypothalamic mTORC1 signaling in insulin regulation of food intake, body weight, and sympathetic nerve activity in male mice. *Endocrinology* *156*, 1398-1407.

## **N.**

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews Molecular cell biology* *10*, 458-467.

Nazio, F., Strappazzon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., Gretzmeier, C., Dengjel, J., Piacentini, M., Fimia, G.M., *et al.* (2013). mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature cell biology* *15*, 406-416.

New, D.C., and Wong, Y.H. (2007). Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *Journal of molecular signaling* *2*, 2.

Newgard, C.B., An, J., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Stevens, R.D., Lien, L.F., Haqq, A.M., Shah, S.H., Arlotto, M., Slentz, C.A., *et al.* (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell metabolism* *9*, 311-326.

Nguyen, A.D., Mitchell, N.F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P.A., Enriquez, R.F., Zhang, L., Shi, Y.C., Zolotukhin, S., *et al.* (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PloS one* *7*, e40191.

Niki, M., Jyotaki, M., Yoshida, R., and Ninomiya, Y. (2010). Reciprocal modulation of sweet taste by leptin and endocannabinoids. *Results and problems in cell differentiation* *52*, 101-114.

Nixon, R.A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine* *19*, 983-997.

Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *The Journal of biological chemistry* *273*, 3963-3966.

Nonogaki, K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* *43*, 533-549.

## **O.**

Obici, S., Feng, Z., Tan, J., Liu, L., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2001). Central melanocortin receptors regulate insulin action. *The Journal of clinical investigation* *108*, 1079-1085.

Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* *51*, 271-275.

Oh, W.J., and Jacinto, E. (2011). mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell cycle* *10*, 2305-2316.

Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology* *2*, 211-216.

Okamoto, H., Nakae, J., Kitamura, T., Park, B.C., Dragatsis, I., and Accili, D. (2004). Transgenic rescue of insulin receptor-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* *114*, 214-223.

Ono, H., Pocai, A., Wang, Y., Sakoda, H., Asano, T., Backer, J.M., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2008). Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *The Journal of clinical investigation* *118*, 2959-2968.

Oomura, Y., Kimura, K., Ooyama, H., Maeno, T., Iki, M., and Kuniyoshi, M. (1964). Reciprocal Activities of the Ventromedial and Lateral Hypothalamic Areas of Cats. *Science* *143*, 484-485.

Osei-Hyiaman, D., Depetrillo, M., Harvey-White, J., Bannon, A.W., Cravatt, B.F., Kuhar, M.J., Mackie, K., Palkovits, M., and Kunos, G. (2005). Cocaine- and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamide. *Neuroendocrinology* *81*, 273-282.

Osei-Hyiaman, D., Liu, J., Zhou, L., Godlewski, G., Harvey-White, J., Jeong, W.I., Batkai, S., Marsicano, G., Lutz, B., Buettner, C., *et al.* (2008). Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *The Journal of clinical investigation* *118*, 3160-3169.

Oshiro, N., Takahashi, R., Yoshino, K., Tanimura, K., Nakashima, A., Eguchi, S., Miyamoto, T., Hara, K., Takehana, K., Avruch, J., *et al.* (2007). The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *The Journal of biological chemistry* *282*, 20329-20339.

Ost, A., Svensson, K., Ruishalme, I., Brannmark, C., Franck, N., Krook, H., Sandstrom, P., Kjolhede, P., and Stralfors, P. (2010). Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Molecular medicine* *16*, 235-246.

## **P.**

Pang, Z., Wu, N.N., Zhao, W., Chain, D.C., Schaffer, E., Zhang, X., Yamdagni, P., Palejwala, V.A., Fan, C., Favara, S.G., *et al.* (2011). The central cannabinoid CB1 receptor is required for diet-induced obesity and rimonabant's antiobesity effects in mice. *Obesity* *19*, 1923-1934.

Parsons, L.H., and Hurd, Y.L. (2015). Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nature reviews Neuroscience* *16*, 579-594.

Patel, J., Wang, X., and Proud, C.G. (2001). Glucose exerts a permissive effect on the regulation of the initiation factor 4E binding protein 4E-BP1. *The Biochemical journal* *358*, 497-503.

Patel, S., Roelke, C.T., Rademacher, D.J., Cullinan, W.E., and Hillard, C.J. (2004). Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* *145*, 5431-5438.

Patel, Z.M., DelGaudio, J.M., and Wise, S.K. (2015). Higher Body Mass Index Is Associated with Subjective Olfactory Dysfunction. *Behavioural neurology* *2015*, 675635.

Pende, M., Kozma, S.C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Le Marchand-Brustel, Y., Klumperman, J., Thorens, B., and Thomas, G. (2000). Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* *408*, 994-997.

- Perello, M., Sakata, I., Birnbaum, S., Chuang, J.C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Woloszyn, J., Yanagisawa, M., Lutter, M., and Zigman, J.M. (2010). Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biological psychiatry* 67, 880-886.
- Perry, B., and Wang, Y. (2012). Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutrition & diabetes* 2, e26.
- Perwitz, N., Wenzel, J., Wagner, I., Buning, J., Drenckhan, M., Zarse, K., Ristow, M., Lilienthal, W., Lehnert, H., and Klein, J. (2010). Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes, obesity & metabolism* 12, 158-166.
- Peterson, R.T., Desai, B.N., Hardwick, J.S., and Schreiber, S.L. (1999). Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4438-4442.
- Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873-886.
- Petrovich, G.D. (2011). Learning and the motivation to eat: forebrain circuitry. *Physiology & behavior* 104, 582-589.
- Pinos, H., Perez-Izquierdo, M.A., Carrillo, B., and Collado, P. (2011). Effects of undernourishment on the hypothalamic orexinergic system. *Physiology & behavior* 102, 17-21.
- Pinto, S., Roseberry, A.G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., and Horvath, T.L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304, 110-115.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews Neuroscience* 4, 873-884.
- Plum, L., Schubert, M., and Bruning, J.C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16, 59-65.
- Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.L., and Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell metabolism* 8, 224-236.
- Poulin, F., Gingras, A.C., Olsen, H., Chevalier, S., and Sonenberg, N. (1998). 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *The Journal of biological chemistry* 273, 14002-14007.
- Pritchard, L.E., Turnbull, A.V., and White, A. (2002). Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *The Journal of endocrinology* 172, 411-421.
- Proulx, K., Cota, D., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2008). Fatty acid synthase inhibitors modulate energy balance via mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in the central nervous system. *Diabetes* 57, 3231-3238.

Puissant, A., Fenouille, N., and Auberger, P. (2012). When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *American journal of cancer research* 2, 397-413.

## Q.

Qian, S., Chen, H., Weingarh, D., Trumbauer, M.E., Novi, D.E., Guan, X., Yu, H., Shen, Z., Feng, Y., Frazier, E., *et al.* (2002). Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Molecular and cellular biology* 22, 5027-5035.

Qin, L.Q., Xun, P., Bujnowski, D., Daviglius, M.L., Van Horn, L., Stamler, J., He, K., and Group, I.C.R. (2011). Higher branched-chain amino acid intake is associated with a lower prevalence of being overweight or obese in middle-aged East Asian and Western adults. *The Journal of nutrition* 141, 249-254.

Quan, W., Kim, H.K., Moon, E.Y., Kim, S.S., Choi, C.S., Komatsu, M., Jeong, Y.T., Lee, M.K., Kim, K.W., Kim, M.S., *et al.* (2012). Role of hypothalamic proopiomelanocortin neuron autophagy in the control of appetite and leptin response. *Endocrinology* 153, 1817-1826.

Quarta, C., Bellocchio, L., Mancini, G., Mazza, R., Cervino, C., Braulke, L.J., Fekete, C., Latorre, R., Nanni, C., Bucci, M., *et al.* (2010). CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell metabolism* 11, 273-285.

Quarta, C., Mazza, R., Obici, S., Pasquali, R., and Pagotto, U. (2011). Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. *Trends in molecular medicine* 17, 518-526.

## R.

Ramesh Babu, J., Lamar Seibenhener, M., Peng, J., Strom, A.L., Kempainen, R., Cox, N., Zhu, H., Wooten, M.C., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., *et al.* (2008). Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* 106, 107-120.

Reed, A.S., Unger, E.K., Olofsson, L.E., Piper, M.L., Myers, M.G., Jr., and Xu, A.W. (2010). Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes* 59, 894-906.

Reguero, L., Puente, N., Elezgarai, I., Mendizabal-Zubiaga, J., Canduela, M.J., Buceta, I., Ramos, A., Suarez, J., Rodriguez de Fonseca, F., Marsicano, G., *et al.* (2011). GABAergic and cortical and subcortical glutamatergic axon terminals contain CB1 cannabinoid receptors in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *PloS one* 6, e26167.

Ren, H., Orozco, I.J., Su, Y., Suyama, S., Gutierrez-Juarez, R., Horvath, T.L., Wardlaw, S.L., Plum, L., Arancio, O., and Accili, D. (2012). FoxO1 target Gpr17 activates AgRP neurons to regulate food intake. *Cell* 149, 1314-1326.

Richard, D., Guesdon, B., and Timofeeva, E. (2009). The brain endocannabinoid system in the regulation of energy balance. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 23, 17-32.

Richard, D. (2015). Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. *Nature reviews Endocrinology* 11, 489-501.

Riediger, T., Bothe, C., Becskei, C., and Lutz, T.A. (2004). Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology* 79, 317-326.

Rodriguez-Enriquez, S., Kim, I., Currin, R.T., and Lemasters, J.J. (2006). Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy* 2, 39-46.

Rodriguez, A., Duran, A., Selloum, M., Champy, M.F., Diez-Guerra, F.J., Flores, J.M., Serrano, M., Auwerx, J., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2006). Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell metabolism* 3, 211-222.

Roh, C., Han, J., Tzatsos, A., and Kandror, K.V. (2003). Nutrient-sensing mTOR-mediated pathway regulates leptin production in isolated rat adipocytes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 284, E322-330.

Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Fernandes, M.F., Rocco, S.A., Marin, R.M., Morari, J., Souza, K.K., Dias, M.M., Gomes-Marcondes, M.C., Gontijo, J.A., *et al.* (2008). A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes* 57, 594-605.

Roseberry, A.G., Liu, H., Jackson, A.C., Cai, X., and Friedman, J.M. (2004). Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron* 41, 711-722.

Ruan, B., Pong, K., Jow, F., Bowlby, M., Crozier, R.A., Liu, D., Liang, S., Chen, Y., Mercado, M.L., Feng, X., *et al.* (2008). Binding of rapamycin analogs to calcium channels and FKBP52 contributes to their neuroprotective activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 33-38.

Ruby, M.A., Nomura, D.K., Hudak, C.S., Mangravite, L.M., Chiu, S., Casida, J.E., and Krauss, R.M. (2008). Overactive endocannabinoid signaling impairs apolipoprotein E-mediated clearance of triglyceride-rich lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14561-14566.

Rutter, G.A., Da Silva Xavier, G., and Leclerc, I. (2003). Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *The Biochemical journal* 375, 1-16.

Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & development* 19, 2199-2211.

## S.

Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35-43.

Sainz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M.J., and Martinez, J.A. (2015). Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism: clinical and experimental* 64, 35-46.

- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., *et al.* (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852-871.
- Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., and Sabatini, D.M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell* 25, 903-915.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496-1501.
- Sanchez, E., Singru, P.S., Acharya, R., Bodria, M., Fekete, C., Zavacki, A.M., Bianco, A.C., and Lechan, R.M. (2008). Differential effects of refeeding on melanocortin-responsive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 149, 4329-4335.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology : CB* 14, 1296-1302.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* 22, 159-168.
- Saucisse, N., Mazier, W., Catania, C., Binder, E., Bellocchio, L., Romanov, R.A., Cannich, A., Simon, V., Matias, I., Meece, K., *et al.* (2016). Bidirectional control of food intake by hypothalamic POMC neurons. Submitted.
- Scarpace, P.J., Matheny, M., Pollock, B.H., and Tumer, N. (1997). Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *The American journal of physiology* 273, E226-230.
- Schaffhauser, A.O., Stricker-Krongrad, A., Brunner, L., Cumin, F., Gerald, C., Whitebread, S., Criscione, L., and Hofbauer, K.G. (1997). Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* 46, 1792-1798.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *The Journal of clinical investigation* 98, 1101-1106.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46, 2119-2123.



- Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2003). Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nature reviews Neuroscience* 4, 901-909.
- Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Geetha, T., Wong, H.C., Krishna, N.R., and Wooten, M.W. (2004). Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Molecular and cellular biology* 24, 8055-8068.
- Sengupta, S., Peterson, T.R., Laplante, M., Oh, S., and Sabatini, D.M. (2010). mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 468, 1100-1104.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 283-296.
- Silvestri, C., and Di Marzo, V. (2013). The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell metabolism* 17, 475-490.
- Simonsen, A., and Tooze, S.A. (2009). Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *The Journal of cell biology* 186, 773-782.
- Sims, J.S., and Lorden, J.F. (1986). Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behavioural brain research* 22, 265-281.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009a). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131-1135.
- Singh, R., Xiang, Y., Wang, Y., Baikati, K., Cuervo, A.M., Luu, Y.K., Tang, Y., Pessin, J.E., Schwartz, G.J., and Czaja, M.J. (2009b). Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 3329-3339.
- Singru, P.S., Sanchez, E., Fekete, C., and Lechan, R.M. (2007). Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety. *Endocrinology* 148, 638-646.
- Singru, P.S., Wittmann, G., Farkas, E., Zseli, G., Fekete, C., and Lechan, R.M. (2012). Refeeding-activated glutamatergic neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) mediate effects of melanocortin signaling in the nucleus tractus solitarius (NTS). *Endocrinology* 153, 3804-3814.
- Sipula, I.J., Brown, N.F., and Perdomo, G. (2006). Rapamycin-mediated inhibition of mammalian target of rapamycin in skeletal muscle cells reduces glucose utilization and increases fatty acid oxidation. *Metabolism: clinical and experimental* 55, 1637-1644.
- Smith, M.A., Katsouri, L., Irvine, E.E., Hankir, M.K., Pedroni, S.M., Voshol, P.J., Gordon, M.W., Choudhury, A.I., Woods, A., Vidal-Puig, A., *et al.* (2015). Ribosomal S6K1 in POMC and AgRP Neurons Regulates Glucose Homeostasis but Not Feeding Behavior in Mice. *Cell reports* 11, 335-343.
- Soefje, S.A., Karnad, A., and Brenner, A.J. (2011). Common toxicities of mammalian target of rapamycin inhibitors. *Targeted oncology* 6, 125-129.
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C.M., and Ellisen, L.W. (2005). Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Molecular and cellular biology* 25, 5834-5845.

- Sohn, J.W., Xu, Y., Jones, J.E., Wickman, K., Williams, K.W., and Elmquist, J.K. (2011). Serotonin 2C receptor activates a distinct population of arcuate pro-opiomelanocortin neurons via TRPC channels. *Neuron* 71, 488-497.
- Soliman, G.A., Acosta-Jaquez, H.A., and Fingar, D.C. (2010). mTORC1 inhibition via rapamycin promotes triacylglycerol lipolysis and release of free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids* 45, 1089-1100.
- Song, M.S., Salmena, L., and Pandolfi, P.P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 283-296.
- Song, Z., Levin, B.E., McArdle, J.J., Bakhos, N., and Routh, V.H. (2001). Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 50, 2673-2681.
- Soria-Gomez, E., Matias, I., Rueda-Orozco, P.E., Cisneros, M., Petrosino, S., Navarro, L., Di Marzo, V., and Prospero-Garcia, O. (2007). Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *British journal of pharmacology* 151, 1109-1116.
- Soria-Gomez, E., Bellocchio, L., Reguero, L., Lepousez, G., Martin, C., Bendahmane, M., Ruehle, S., Remmers, F., Desprez, T., Matias, I., *et al.* (2014). The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nature neuroscience* 17, 407-415.
- Sosanya, N.M., Cacheaux, L.P., Workman, E.R., Niere, F., Perrone-Bizzozero, N.I., and Raab-Graham, K.F. (2015). Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Tagging Promotes Dendritic Branch Variability through the Capture of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II alpha (CaMKIIalpha) mRNAs by the RNA-binding Protein HuD. *The Journal of biological chemistry* 290, 16357-16371.
- Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., and Leibowitz, S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1189-1192.
- Sternson, S.M., Shepherd, G.M., and Friedman, J.M. (2005). Topographic mapping of VMH -> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nature neuroscience* 8, 1356-1363.
- Stevanovic, D., Trajkovic, V., Muller-Luhlhoff, S., Brandt, E., Abplanalp, W., Bumke-Vogt, C., Liehl, B., Wiedmer, P., Janjetovic, K., Starcevic, V., *et al.* (2013). Ghrelin-induced food intake and adiposity depend on central mTORC1/S6K1 signaling. *Molecular and cellular endocrinology* 381, 280-290.
- Stock, S., Leichner, P., Wong, A.C., Ghatei, M.A., Kieffer, T.J., Bloom, S.R., and Chanoine, J.P. (2005). Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90, 2161-2168.
- Sun, Y., Wang, P., Zheng, H., and Smith, R.G. (2004). Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4679-4684.

## T.

Takahashi, K.A., and Cone, R.D. (2005). Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related protein neurons. *Endocrinology* *146*, 1043-1047.

Tam, J., Vemuri, V.K., Liu, J., Batkai, S., Mukhopadhyay, B., Godlewski, G., Osei-Hyiaman, D., Ohnuma, S., Ambudkar, S.V., Pickel, J., *et al.* (2010). Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *The Journal of clinical investigation* *120*, 2953-2966.

Tam, J., Cinar, R., Liu, J., Godlewski, G., Wesley, D., Jourdan, T., Szanda, G., Mukhopadhyay, B., Chedester, L., Liow, J.S., *et al.* (2012). Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell metabolism* *16*, 167-179.

Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* *406*, 902-906.

Tasker, J.G. (2006). Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration. *Obesity* *14 Suppl 5*, 259S-265S.

Tedesco, L., Valerio, A., Dossena, M., Cardile, A., Ragni, M., Pagano, C., Pagotto, U., Carruba, M.O., Vettor, R., and Nisoli, E. (2010). Cannabinoid receptor stimulation impairs mitochondrial biogenesis in mouse white adipose tissue, muscle, and liver: the role of eNOS, p38 MAPK, and AMPK pathways. *Diabetes* *59*, 2826-2836.

Thaler, J.P., and Schwartz, M.W. (2010). Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* *151*, 4109-4115.

Thomanetz, V., Angliker, N., Cloetta, D., Lustenberger, R.M., Schweighauser, M., Oliveri, F., Suzuki, N., and Ruegg, M.A. (2013). Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *The Journal of cell biology* *201*, 293-308.

Thompson, H.G., Harris, J.W., Wold, B.J., Lin, F., and Brody, J.P. (2003). p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene* *22*, 2322-2333.

Thorens, B. (2012). Sensing of glucose in the brain. *Handbook of experimental pharmacology*, 277-294.

Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R.J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M.D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L.M., Lee, C.E., *et al.* (2007). Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell metabolism* *5*, 383-393.

Tschop, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* *407*, 908-913.

## U.

Ulrich-Lai, Y.M., and Herman, J.P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature reviews Neuroscience* *10*, 397-409.

Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J., *et al.* (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200-205.

## V.

Vadlamudi, R.K., Joung, I., Strominger, J.L., and Shin, J. (1996). p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 271, 20235-20237.

Valassi, E., Scacchi, M., and Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 18, 158-168.

van de Wall, E., Leshan, R., Xu, A.W., Balthasar, N., Coppari, R., Liu, S.M., Jo, Y.H., MacKenzie, R.G., Allison, D.B., Dun, N.J., *et al.* (2008). Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* 149, 1773-1785.

van Dijk, G., Evers, S.S., Guidotti, S., Thornton, S.N., Scheurink, A.J., and Nyakas, C. (2011). The lateral hypothalamus: a site for integration of nutrient and fluid balance. *Behavioural brain research* 221, 481-487.

Varela, L., and Horvath, T.L. (2012). AgRP neurons: a switch between peripheral carbohydrate and lipid utilization. *The EMBO journal* 31, 4252-4254.

Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R.A., Tosch, V., Delgado, M.A., Proikas-Cezanne, T., Laporte, J., and Deretic, V. (2009). Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *The EMBO journal* 28, 2244-2258.

Verty, A.N., McFarlane, J.R., McGregor, I.S., and Mallet, P.E. (2004). Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and melanocortin MCR-4 receptors in regulating food intake. *Endocrinology* 145, 3224-3231.

Verty, A.N., McGregor, I.S., and Mallet, P.E. (2005). Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology* 49, 1101-1109.

Verty, A.N., Boon, W.M., Mallet, P.E., McGregor, I.S., and Oldfield, B.J. (2009). Involvement of hypothalamic peptides in the anorectic action of the CB receptor antagonist rimonabant (SR 141716). *The European journal of neuroscience* 29, 2207-2216.

Vignot, S., Faivre, S., Aguirre, D., and Raymond, E. (2005). mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 16, 525-537.

Villanueva, E.C., Munzberg, H., Cota, D., Leshan, R.L., Kopp, K., Ishida-Takahashi, R., Jones, J.C., Fingar, D.C., Seeley, R.J., and Myers, M.G., Jr. (2009). Complex regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 in the basomedial hypothalamus by leptin and nutritional status. *Endocrinology* 150, 4541-4551.

Viollet, B., Andreelli, F., Jorgensen, S.B., Perrin, C., Geloën, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M., *et al.* (2003). The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic

subunit controls whole-body insulin sensitivity. *The Journal of clinical investigation* *111*, 91-98.

## W.

Wadikar, D.D., and Premavalli, K.S. (2012). Appetite control and obesity. *Critical reviews in food science and nutrition* *52*, 949-956.

Wan, M., Leavens, K.F., Saleh, D., Easton, R.M., Guertin, D.A., Peterson, T.R., Kaestner, K.H., Sabatini, D.M., and Birnbaum, M.J. (2011). Postprandial hepatic lipid metabolism requires signaling through Akt2 independent of the transcription factors FoxA2, FoxO1, and SREBP1c. *Cell metabolism* *14*, 516-527.

Wang, J., Yuan, Z., Dong, J., Zhang, D., Usami, T., Murata, T., Narita, K., and Higuchi, T. (2013). Neuropeptide Y loses its orexigenic effect in rats with lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrine research* *38*, 8-14.

Wang, L., Harris, T.E., Roth, R.A., and Lawrence, J.C., Jr. (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *The Journal of biological chemistry* *282*, 20036-20044.

Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowaska, D.E., Wang, X.M., McBay, D.L., Neville, W.A., Taddayon, M., Pickavance, L., Dryden, S., *et al.* (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* *46*, 335-341.

Wang, R., Liu, X., Hentges, S.T., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E., Wang, W., and Routh, V.H. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* *53*, 1959-1965.

Wang, T.J., Larson, M.G., Vasan, R.S., Cheng, S., Rhee, E.P., McCabe, E., Lewis, G.D., Fox, C.S., Jacques, P.F., Fernandez, C., *et al.* (2011). Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature medicine* *17*, 448-453.

Wangensteen, O.H., and Carlson, H.A. (1931). Hunger Sensations in a Patient After Total Gastrectomy. *Experimental biology and medicine* *28*, 545-547.

Wegrzyn, J., Potla, R., Chwae, Y.J., Sepuri, N.B., Zhang, Q., Koeck, T., Derecka, M., Szczepanek, K., Szelag, M., Gornicka, A., *et al.* (2009). Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* *323*, 793-797.

Whetzel, P.L., Noy, N.F., Shah, N.H., Alexander, P.R., Nyulas, C., Tudorache, T., and Musen, M.A. (2011). BioPortal: enhanced functionality via new Web services from the National Center for Biomedical Ontology to access and use ontologies in software applications. *Nucleic acids research* *39*, W541-545.

Wierup, N., Richards, W.G., Bannon, A.W., Kuhar, M.J., Ahren, B., and Sundler, F. (2005). CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight. *Regulatory peptides* *129*, 203-211.

Williams, K.W., Margatho, L.O., Lee, C.E., Choi, M., Lee, S., Scott, M.M., Elias, C.F., and Elmquist, J.K. (2010). Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of

arcuate proopiomelanocortin neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 2472-2479.

Wittmann, G., Deli, L., Kallo, I., Hrabovszky, E., Watanabe, M., Liposits, Z., and Fekete, C. (2007). Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *The Journal of comparative neurology* 503, 270-279.

Wittmann, G., Hrabovszky, E., and Lechan, R.M. (2013). Distinct glutamatergic and GABAergic subsets of hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons revealed by in situ hybridization in male rats and mice. *The Journal of comparative neurology* 521, 3287-3302.

Woods, S.C. (2005). Signals that influence food intake and body weight. *Physiology & behavior* 86, 709-716.

Woods, S.C. (2013). Metabolic signals and food intake. Forty years of progress. *Appetite* 71, 440-444.

Wu, H.M., Yang, Y.M., and Kim, S.G. (2011). Rimonabant, a cannabinoid receptor type 1 inverse agonist, inhibits hepatocyte lipogenesis by activating liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase axis downstream of Galpha i/o inhibition. *Molecular pharmacology* 80, 859-869.

Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.

## X.

Xin, X., Storlien, L.H., and Huang, X.F. (2000). Hypothalamic c-fos-like immunoreactivity in high-fat diet-induced obese and resistant mice. *Brain research bulletin* 52, 235-242.

## Y.

Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E.S., and Hotamisligil, G.S. (2010). Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell metabolism* 11, 467-478.

Yang, Q., and Guan, K.L. (2007). Expanding mTOR signaling. *Cell research* 17, 666-681.

Yang, S.B., Tien, A.C., Boddupalli, G., Xu, A.W., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2012). Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons. *Neuron* 75, 425-436.

Yang, Y., Atasoy, D., Su, H.H., and Sternson, S.M. (2011). Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146, 992-1003.

Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Permeases recycle amino acids resulting from autophagy. *Autophagy* 3, 149-150.

Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., and Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature medicine* 5, 1066-1070.

Yecies, J.L., Zhang, H.H., Menon, S., Liu, S., Yecies, D., Lipovsky, A.I., Gorgun, C., Kwiatkowski, D.J., Hotamisligil, G.S., Lee, C.H., *et al.* (2011). Akt stimulates hepatic

SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell metabolism* 14, 21-32.

Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5, 1180-1185.

Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation* 12 Suppl 2, 1542-1552.

Yoshida, R., Ohkuri, T., Jyotaki, M., Yasuo, T., Horio, N., Yasumatsu, K., Sanematsu, K., Shigemura, N., Yamamoto, T., Margolskee, R.F., *et al.* (2010). Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 935-939.

Yoshihara, F., Kojima, M., Hosoda, H., Nakazato, M., and Kangawa, K. (2002). Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 5, 391-395.

Yoshimori, T. (2002). Toward and beyond lysosomes. *Cell structure and function* 27, 401-402.

Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochemical and biophysical research communications* 313, 453-458.

Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., *et al.* (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465, 942-946.

Yuan, H.X., Russell, R.C., and Guan, K.L. (2013). Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* 9, 1983-1995.

Zahr, E., Molano, R.D., Pileggi, A., Ichii, H., San Jose, S., Bocca, N., An, W., Gonzalez-Quintana, J., Fraker, C., Ricordi, C., *et al.* (2008). Rapamycin impairs beta-cell proliferation in vivo. *Transplantation proceedings* 40, 436-437.

## **Z.**

Zarjevski, N., Cusin, I., Vettor, R., Rohner-Jeanrenaud, F., and Jeanrenaud, B. (1993). Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133, 1753-1758.

Zauner, A., Daugherty, W.P., Bullock, M.R., and Warner, D.S. (2002). Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery* 51, 289-301; discussion 302.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zhang, Y., Guo, K., LeBlanc, R.E., Loh, D., Schwartz, G.J., and Yu, Y.H. (2007). Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* 56, 1647-1654.

Zhang, Y., Goldman, S., Baerga, R., Zhao, Y., Komatsu, M., and Jin, S. (2009). Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (*atg7*) in mice reveals a role in adipogenesis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 19860-19865.

Zhao, Y., Yang, J., Liao, W., Liu, X., Zhang, H., Wang, S., Wang, D., Feng, J., Yu, L., and Zhu, W.G. (2010). Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nature cell biology* *12*, 665-675.

Zhu, G., Yan, J., Smith, W.W., Moran, T.H., and Bi, S. (2012). Roles of dorsomedial hypothalamic cholecystokinin signaling in the controls of meal patterns and glucose homeostasis. *Physiology & behavior* *105*, 234-241.

Zhu, W., Czyzyk, D., Paranjape, S.A., Zhou, L., Horblitt, A., Szabo, G., Seashore, M.R., Sherwin, R.S., and Chan, O. (2010). Glucose prevents the fall in ventromedial hypothalamic GABA that is required for full activation of glucose counterregulatory responses during hypoglycemia. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *298*, E971-977.

Zigman, J.M., Jones, J.E., Lee, C.E., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (2006). Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *The Journal of comparative neurology* *494*, 528-548.

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* *334*, 678-683.







## Abstract

The hypothalamus is a brain structure with a key role in the regulation of food intake. Among the different neuronal populations of which it is composed, pro-opiomelanocortin (POMC) neurons are classically known to decrease food intake and body weight through the release of neuropeptides produced by the cleavage of POMC. Our study, through the use of genetic, pharmacological, electrophysiological and molecular approaches, challenges conventional notions about POMC neuron function in energy balance by showing that there are two functionally distinct POMC neuronal sub-populations, which increase or decrease food intake depending on which neurotransmitter they release,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) or glutamate. A third population capable of producing both GABA and glutamate has also been identified. The regulation of POMC GABAergic and glutamatergic neurons depends on the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway, which functions as a cellular energy sensor, and the endocannabinoid system (ECS), which regulates neurotransmitters release. In addition, we have also demonstrated through the use of a conditional knockout mice, the importance of the protein p62 or sequestrome 1 (p62/SQSTM1), which regulates mTORC1 activity and autophagy, in POMC neurons for the regulation of energy homeostasis. Our data provide new insights on the molecular mechanisms involved in the regulation of energy balance.

**Key words:** POMC neurons, mTORC1, ECS, neurotransmitters, food intake, refeeding, p62/SQSTM1, metabolism, hypothalamus, obesity