



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Palatable food, clock genes and the reward circuitry

Blancas Velazquez, A.S.

Publication date

2018

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Blancas Velazquez, A. S. (2018). *Palatable food, clock genes and the reward circuitry*.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Chapter 8

Summary

Résumé de la thèse

Samenvatting

Thesis Summary

Obesity is a health problem reaching epidemic levels. An important factor for the development of obesity is overeating especially that of palatable food with high amounts of fat and sugar. In mammals, feeding behavior, among different biological functions, has a periodical variation of 24h. These endogenous rhythmic functions with a period close to 24h are known as circadian rhythms and are intrinsically generated in the body by the circadian system. Located in the hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus (SCN) is the main biological clock of the body which coordinates rhythmic functions of other brain and peripheral oscillators. The SCN and virtually all cells of the body contain a feedback loop of genes known as the clock-genes, *clock* and *Bmal1* form the positive limb of the feedback loop whereas *Per* and *Cry* are part of the negative limb. These genes form a loop of expression and repression mechanism with a period of ~24h and regulate the rhythmic expression of clock-controlled genes inducing rhythms in cell physiology.

Brain areas implicated in regulation of food intake, including those in the reward system, which modulate food preference reinforcing palatable food intake, also show circadian variations in their physiology. Some studies have shown that ingestion of high caloric foods with high amounts of fat and/or sugar alter behavioral rhythms such as in general locomotor activity and food intake. However, the effects of high caloric/palatable food ingestion on the circadian activity of the reward system are not well known. The objective of this thesis was to study the relationship between high caloric/palatable food ingestion and its relationship to the brain circadian system.

First, in **Chapter 2** we carried out a review focused on the effects of high caloric/palatable diets on general locomotor activity and daily food intake rhythms of rats and mice. The effects of the high caloric/palatable diets on the rhythmic activity of brain regions controlling eating behavior were also examined. The

results showed that these kinds of diets, (either in presentation of single pellets containing all the high caloric nutrients, or presenting the different nutrients separately) can alter the rhythms of general activity and disrupt the temporal patterns of food intake. It should be noted that the eating patterns are more easily affected by the high caloric/palatable diets than the general locomotor activity. However, we found little research on the effects of these regimes on the rhythmic activity of the brain's reward system.

A high caloric/palatable diet that has already being described in rats as a diet-induced obesity model is the free-choice High-Fat High-Sugar (fcHFHS) diet. This diet allows free access to 4 different diet components: a bottle of water, standard chow pellets, a bottle of water with 30% sugar concentration, and saturated fat. Offering the different nutrients separately is a way of replicating the human condition in which people are able to freely choose the most attractive foods, something that does not happen when a high caloric/palatable diet is presented as one single pellet. In previous work in rats, the fcHFHS diet model led to a change in temporal dietary patterns, specifically for sugar ingestion: there is a high sugar consumption during the light period (rest phase), characterized by intake spread over the entire light period and making up 40% of total sugar intake.

In **Chapter 3** we used for the first time the fcHFHS diet in mice in order to describe the effects on rhythmic behavior (locomotion, food intake). Compared to the chow-fed mice, animals fed with the fcHFHS diet during 6 weeks increased caloric intake, as well as body weight, and adiposity. After 6 weeks, these mice also showed a disrupted temporal pattern of feeding, they consumed more chow food at night but sugar and fat consumption was similar between day and night. We explored the effects of the diet on brain clock-gene expression. Using immunocytochemistry techniques, we determined the expression of the clock proteins BMAL1 and PER2 in the brain of chow-fed and fcHFHS diet-fed mice at two different times: 4 hours after the start of the light phase and 4 hours after the start of the dark phase. The expression of the 2 clock-gene proteins was quantified

in SCN, the arcuate nucleus (ARC) and the lateral habenula (LHb) in both groups. In the SCN and ARC, the expression of PER2 showed differences between day and night and was not altered by the diet. In contrast, the LHb of the control chow-fed group showed a day-night variation in the expression of PER2, that was absent in the fcHFHS diet-fed group. The results of this study suggest that a disruption of the day-night patterns of food intake in the fcHFHS fed diet group may be linked to changes in clock function in the LHb.

Although the rhythm of food intake during fcHFHS diet feeding had already been described in rats, the consequences on clock-gene expression in reward-related areas had not been reported. Therefore, in **Chapter 4**, we used the fcHFHS diet model in rats with the aim of studying the effects of this diet on brain clock-gene expression. The fcHFHS diet-fed rats of this experiment showed day-night differences for the ingestion of all diet components, these unexpected results were accompanied by an overall decrease in fat intake. We analyzed the expression of different clock-genes including *Per2*, *Cry1* and *Bmal1* in the nucleus accumbens (NAc), SCN, LHb, the ventral tegmental area (VTA) and lateral hypothalamus (LH). Despite the absence of changes in daily patterns of food intake in the fcHFHS diet-fed group, analysis of gene expression by real-time polymerase chain reaction (qPCR) showed alterations in *Per2* mRNA expression, in NAc and LH, but not in LHb. Interestingly, only *Per2*, and not any of the other clock-genes studied, was modified. These results showed an effect of the fcHFHS diet on *Per2* mRNA expression in some areas of the reward system even when a behavioral rhythm alteration was not observed. The clock-gene expression in the LHb of these rhythmic rats was not altered, pointing to a relation between behavioral and LHb rhythmicity.

The results of studies in mice and rats in this thesis pointed to a possible role of the LHb in rhythmic regulation of food intake. Thus, in **Chapter 5** we proposed the hypothesis of a role for LHb in the temporal control of food intake. We used a pharmacological approach to block the glutamatergic input to the LHb in rats by

infusing an AMPA/kainate glutamatergic receptor antagonist (CNQX) into the LHb. Rats were operated to implant guided cannulas towards the LHb. Rats were randomly divided into two groups, a chow-fed and a fCHFHS diet-fed group. Infusions of CNQX or saline (as a control treatment) were performed at two time points (during the day or night) in both experimental groups. Food intake was measured one hour after the injection of either CNQX or saline. The chow-fed rats injected only saline showed higher food consumption during the night compared to day time, while rats receiving CNQX, showed a reduction in food consumption at night. Interestingly, different to the chow-fed group, the total caloric consumption of the fCHFHS diet-fed rats was increased by CNQX infusion into the LHb at night. We next analyzed intake of each caloric nutrient of the fCHFHS diet after treatment infusion (saline vs. CNQX), and observed that the overall increase in caloric intake on the fCHFHS diet was driven by a clear increase in fat intake, which was most pronounced in the dark period. Interestingly, the sugar intake was reduced by infusing the glutamatergic antagonist but only during the night. These results point to a role for the LHb in modulating both palatable and nutrition balanced intake in a time-dependent manner.

Finally, in **Chapter 6** we performed an experiment using mutant mice lacking the *Npas2* clock-gene which is a homologue of *clock*. *Npas2* is an important gene for rhythmic functioning of forebrain areas. Mice lacking this gene show a decreased behavioral sensitivity to cocaine compared to wild-type mice. Since the mutant *Npas2* gene mice have reduced sensitivity to non-natural rewards such as cocaine, we hypothesized that *Npas2* mutant mice would show a reduction in motivation to ingest the high caloric/palatable nutrients of the fCHFHS diet. We used *Npas2::PER2Luc* mice. These mice lack the *Npas2* gene and have a luciferase reporter fused to the *Per2* gene which was used to measure *ex-vivo* PER2 protein oscillations in ARC and SCN. Wild-type and *Npas2::PER2Luc* mice were divided into two groups: fed with a chow or the fCHFHS diet during 6 weeks. The fCHFHS diet produced hyperphagia and enhanced weight gain in both wild-type and *Npas2*

mutant mice compared to the control chow-fed groups. There were no differences between genotypes on the day-night patterns of food intake of the different diet components. The analysis of *ex vivo* PER2 oscillations did not show differences between genotypes or diets in the SCN. Only in the ARC, the period of PER2 was shortened in the *Npas2* mutants compared to the wild-type mice but this was independent of the diet (chow vs fcHFHS). Thus, the shortened PER2 period in the ARC did not have consequences for rhythms in behavior, suggesting that “stronger” brain oscillators may be directing daily rhythms of food intake in these mice.

The results of the present thesis indicate a relationship between high caloric/palatable food intake on the brain circadian system, where the ingestion of fat and sugar leading to obesity can produce a deregulation in day/night expression of clock-genes, especially *Per2*, in reward-related brain regions even in the absence of a disruption in the day-night food intake pattern. Our results point to a role for the LHb in the time regulation of palatable food intake since *Per2* in this area remains unaltered when the eating patterns are rhythmic. And, when eating patterns were altered in mice, consuming more palatable food during the day, PER2 expression in the LHb was disrupted. Furthermore, the results in rats where the blocking of LHb glutamatergic inputs have a time-dependent effect on chow and palatable food intake agree with the hypothesis of the LHb as a brain oscillator able to modulate daily variations of food intake.

Résumé de la thèse

L'obésité est un problème de santé qui atteint un niveau épidémique. Un facteur important pour le développement de cette maladie est la prise excessive d'aliments palatables qui ont généralement un haut contenu calorique. Chez les mammifères, le comportement alimentaire, parmi plusieurs fonctions biologiques montre une variation périodique d'environ 24h, et les cycles biologiques de cette durée sont qualifiés de circadiens, un mot d'origine latine, *circa*: autour et *dies*: jour. Ces variations circadiennes, le comportement alimentaire inclut, sont régulées par le noyau suprachiasmatique (SCN) la principale horloge biologique. D'autres noyaux cérébraux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et dans le circuit de la récompense, qui module la préférence alimentaire en renforçant la consommation de nourriture palatable, ont une capacité circadienne. Certaines études ont montré que la consommation de nourriture hypercalorique grasse et/ou sucrée peut altérer les comportements rythmiques au niveau de l'activité générale ou de la prise alimentaire. Cependant, les effets de cette nourriture sur la rythmicité circadienne des noyaux du circuit de la récompense, impliqués dans la prise alimentaire, restent peu connus.

L'objectif de la présente thèse a été d'étudier les conséquences physiologiques d'un régime alimentaire calorique/hédoniques ainsi que les effets de ce régime sur le système circadien. Premièrement dans le **chapitre 2** nous avons référencé les études concernant les effets de régimes hypercaloriques/hédoniques chez le rat et la souris (rythme de l'activité locomotrice et prise alimentaire). Les effets du régime hypercalorique/hédonique sur l'activité circadienne des régions cérébrales contrôlant le comportement alimentaire ont également été examinés. Les résultats de ces études ont montré qu'un régime hypercalorique/hédonique (soit en présentation d'un pellet contenant tous les nutriments hypercaloriques/hédoniques, soit en présentant les différents nutriments séparément) peut produire dans certains

cas, une altération du rythme d'activité général et également influencer les patterns temporels de prise alimentaire. Il est à remarquer que de manière générale, dans la prise alimentaire c'est la variable rythmique comportementale la plus affectée par les régimes hypercaloriques/hédoniques.

Par ailleurs, il y a un manque de recherche des effets de ces régimes sur l'activité rythmique des régions du circuit de la récompense; en effet ce point est important pour comprendre le mécanisme de dérégulation journalière de la prise alimentaire, cette dernière n'étant plus entraînée par un besoin énergétique mais plutôt par une motivation hédonique.

Un modèle de régime hypercaloriques/hédoniques déjà décrit chez le rat, le « free-choice High-Fat High-Sugar » (fcHFHS) permet le libre accès au rat à 4 composants du régime: une bouteille d'eau; pellets de nourriture standard; une bouteille d'eau avec une concentration de sucre à 30%; et de la graisse saturée. L'objectif d'offrir les nutriments séparément est de reproduire les conditions d'un humain pouvant choisir les aliments les plus attirants, ce qui n'arrive pas quand le régime induisant l'obésité consiste en un pellet unique. Le modèle de fcHFHS avait amené chez le rat, un changement des patterns alimentaires journaliers, spécifiquement concernant la prise de sucre: il y avait une consommation de sucre plus importante pendant la période de lumière (phase de repos de l'animal), ce qui diminuait la différence jour-nuit quant à la prise de ce composant du régime.

Dans le **chapitre 3** nous avons utilisé le modèle de fcHFHS pour le valider chez la souris et étudier les effets de ce régime sur le comportement circadien mais aussi au niveau cérébral, dans des structures impliquées dans la prise alimentaire. En augmentant l'apport calorique chez la souris, ce régime a induit une augmentation de la masse corporelle et du tissu adipeux en comparaison aux souris nourries avec un pellet standard normocalorique. Les souris nourries avec le régime fcHFHS après 6 semaines ont montré un pattern temporel avec plus d'ingestion de l'aliment normocalorique pendant la nuit mais par contre, la consommation de sucre et de

graisse était similaire entre le jour et la nuit. Avec la technique d'immunohistochimie, nous avons déterminé l'expression des protéines horloges BMAL1 et PER2 à deux moments différents de la journée: 4h après le début de la phase lumineuse et 4h après le début de la phase d'obscurité. L'expression des 2 protéines horloges été quantifiée dans le SCN, le noyau arqué (ARC) dans hypothalamus et l'habenula latérale (LHb) dans l'épithalamus chez les groupes contrôles et le groupe nourri avec le régime fcHFHS. Dans le SCN et l'ARC, l'analyse de l'expression de PER2 a montré des différences entre le jour et la nuit mais pas d'effets du régime, par contre, dans la LHb, le groupe contrôle a montré une variation temporelle de PER2 qui était absente dans le groupe du régime fcHFHS. Ces résultats montrent que la perturbation des patterns jour-nuit de la consommation d'aliments hypercaloriques/hédoniques est liée au fonctionnement de la LHb.

Chez le rat, même si le rythme du comportement de prise alimentaire pendant le régime fcHFHS avait été décrit, les conséquences au niveau des gènes-horloge n'avaient pas été étudiées, c'est pourquoi, dans le **chapitre 4**, nous avons utilisé le modèle de fcHFHS avec l'objectif d'analyser l'expression de gènes horloges dans le cerveau des rats soumis à ce régime. Les résultats de cette expérience n'ont pas montré une dérégulation comportementale des patterns jour-nuit dans la prise alimentaire des nutriments du régime. Nous avons analysé l'expression de différents gènes horloge dont *Per2*, *Cry1* et *Bmal1* dans le noyau accumbens (NAc), le SCN, la LHb, l'aire tegmentale ventrale (VTA) et l'hypothalamus latéral (LH). Malgré l'absence de changements comportementaux des rythmes de prise alimentaire dans le groupe fcHFHS, l'analyse de l'expression génétique par la technique de réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR) a montré des altérations de l'expression de *Per2* dans le NAc et LH, mais pas dans la LHb. Fait intéressant, seul l'expression de *Per2* et non des autres gènes horloges étudiés ont été modifiés. Ces résultats montrent que même en l'absence d'altération du rythme de prise alimentaire, la seule ingestion d'aliments hypercaloriques/hédoniques peut

modifier l'expression de *Per2* dans certaines régions du circuit de la récompense. Les résultats concernant la LHb où aucune altération n'a été trouvée suggèrent que le pattern jour-nuit de la prise alimentaire est lié à la rythmicité circadienne de la LHb.

Ces résultats chez la souris et le rat ont mis en évidence un rôle possible de la LHb dans la régulation des rythmes comportementaux de prise alimentaire. Dans le **chapitre 5** nous avons proposé l'hypothèse de l'implication de la LHb dans le contrôle circadien de prise alimentaire. Une approche pharmacologique a été utilisée chez les rats pour bloquer la fonction glutamatergique de la LHb en infusant un antagoniste des récepteurs glutamatergiques AMPA/kainate dans la LHb. Des rats ont été opérés pour implanter des canules guide vers la LHb. Les rats ont été sélectionnés aléatoirement en deux groupes, un groupe avec un régime normocalorique et un groupe nourri avec le régime fCHFHS. Les infusions de CNQX ou de solution saline (groupe contrôle) ont été effectuées à deux moments de la journée (jour vs. nuit) dans les deux groupes expérimentaux, et la consommation de nourriture a été mesurée une heure après l'injection soit de CNQX soit de solution saline. Les rats soumis au régime normocalorique ont montré une prise alimentaire plus élevée pendant la nuit, alors que les rats recevant le CNQX, bloquant les afférences glutaminergiques, ont montré une réduction de consommation d'aliment dans la nuit. On peut noter que la totalité de la consommation calorique des rats dans le régime fCHFHS n'a pas été affectée par l'infusion de CNQX dans la LHb, contrairement aux observations chez les rats nourris avec l'aliment normocalorique. Néanmoins, quand nous avons analysé la prise de chaque nutriment calorique du régime fCHFHS, nous avons observé une diminution de la prise de sucre lors de l'infusion de CNQX pendant la nuit. Contrairement, au sucre, la consommation de graisse a montré une tendance à être plus importante pendant la nuit. Il n'y a pas eu d'effet de l'infusion de CNQX sur la prise d'aliment normocalorique. Ces résultats soulignent qu'en effet, la LHb peut moduler la prise alimentaire des aliments normo et hypercaloriques, le blocage du

fonctionnement du système glutamatergique de la LHb a un effet lié au temps de la journée.

Finalement, dans le **chapitre 6** nous avons effectué une expérience chez la souris mutante chez qui il manque le gène horloge *Npas2*. Ce gène est important pour le fonctionnement rythmique du cerveau où se trouvent les aires du circuit de la récompense. Ces souris mutantes ne montrent pas la même réponse comportementale à la cocaïne comme les souris sauvages, et cette évaluation diminuée de la récompense a généré l'hypothèse que ce gène horloge pourrait être impliqué dans la consommation d'aliments hypercaloriques/hédoniques. Puisque les souris mutantes du gène *Npas2* ont une sensibilité diminuée vers les drogues comme la cocaïne, nous nous attendions à une réduction de la motivation pour consommer les nutriments hédoniques du régime fcHFHS. Nous avons utilisé des souris *Npas2:PER2* luciférase, pour mesurer *ex-vivo* les oscillations de la protéine PER2 dans l'ARC et le SCN, des régions impliquées dans consommation alimentaire. Les souris sauvages et les souris *Npas2:PER2* luciférase ont été réparties dans deux groupes: un avec le régime normocalorique et un autre avec le régime fcHFHS. Après 6 semaines les souris sauvages et mutantes de *Npas2* nourries avec le régime fcHFHS étaient hyperphagiques avec une prise de masse augmentée. Il n'y a pas eu de différences entre les génotypes concernant le pattern jour-nuit du comportement alimentaire de nourriture hédonique. L'analyse des oscillations de PER2 *ex-vivo* n'a pas montré de différences entre les génotypes ni entre les régimes dans le SCN. Dans l'ARC la période de l'activité de PER2 était diminuée dans le groupe des souris mutantes par rapport aux souris sauvages et cette réduction était indépendante du régime auquel les souris ont été exposées. Cette réduction n'a pas eu d'effets sur le comportement, indiquant qu'il existe des oscillateurs cérébraux qui régulent de façon plus importante la rythmicité de la prise alimentaire.

L'ensemble des résultats de la présente thèse indiquent qu'il existe une relation entre la régulation de la prise d'aliments hypercaloriques/hédoniques et le système

circadien faisant intervenir le gène horloge *Per2* dans les régions cérébrales du circuit de la récompense. Il est aussi à noter que la LHb peut être impliquée dans la régulation des comportements rythmiques comme la prise d'aliments hédoniques puisque quand il n'y a pas d'altération du rythme de la prise alimentaire. De plus l'activité circadienne de la LHb reste inaltérée. En revanche, quand les rythmes de la LHb sont altérés la souris consomme plus d'aliments palatables pendant le jour. Le blocage de l'activité glutamatergique dans la LHb chez le rat montre un effet selon le moment de la journée, ce qui est en accord avec l'hypothèse de la participation de ce noyau sur l'activité circadienne de la prise alimentaire d'aliments (normocaloriques et hypercaloriques/palatables).

Samenvatting

Obesitas vormt een groot gezondheidsprobleem met epidemiologische proporties. Een belangrijke factor betrokken bij de ontwikkeling van obesitas is de overconsumptie van vooral vet en suiker. Vele biologische processen in zoogdieren, waaronder ook eetgedrag, laten variatie zien over de 24 uur. Deze 24-uurs variatie, zoals in eetgedrag, wordt gecoördineerd door de suprachiasmatische nucleus (SCN), de centrale lichaamsklok, een hersenkern die zich bovenop de kruising van beide oogzenuwen bevindt en onderdeel is van de hypothalamus. In de SCN en in bijna alle cellen van het lichaam, bevinden zich klokgenen met een feedback-loop. Deze feedback-loop van expressie en repressie mechanismen genereert een ritme van ongeveer 24 uur. Hierin vormen *clock* en *Bmal1* de positieve arm van de feedback-loop en *Per* en *Cry* vormen samen de negatieve arm van de feedback-loop. Samen reguleren ze ritmische expressie van de door de klok gecontroleerde genen betrokken bij de fysiologie van de cel.

Andere hersenkernen betrokken bij eetgedrag, zoals bijvoorbeeld beloningsgebieden betrokken bij de voedselmotivatie en evaluatie of iets lekker is, laten ook een 24-uurs variatie zien. Studies toonden aan dat het nuttigen van hoogcalorische diëten met grote hoeveelheden vet en suiker een verandering te weeg brengen in 24-uurs ritmes in bijvoorbeeld locomotor activiteit en voedselopname. Echter, de effecten van hoogcalorische vet-suikerrijke diëten op de ritmiek van het beloningssysteem is nauwelijks onderzocht. Het doel van dit proefschrift was dan ook om te onderzoeken wat de relatie is tussen hoogcalorische diëten en het circadiane systeem in het brein.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de in de literatuur beschreven effecten van een hoogcalorisch dieet met veel vet en suiker op dagelijkse ritmes in locomotor activiteit en eetgedrag in zowel ratten als muizen. Daarnaast worden ook de effecten van het hoogcalorisch vet-suikerrijk dieet op de ritmische activiteit van

verschillende hersengebieden beschreven. Dit overzicht laat zien dat verschillende diëten (zowel die waarbij een pellet wordt gegeven met daarin een hogere concentratie vet en suiker, als wel die diëten die bestaan uit verschillende voedselnutriënten die separaat genuttigd kunnen worden) een invloed hebben op de algemene locomotor activiteit en ook een verstoring laten zien in de 24-uurs ritmiek van voedselopname. Wel is het zo dat hoogcalorisch vet-suikerrijke diëten eerder de 24-uurs ritmiek in eetgedrag verstoren dan de algemene locomotor activiteit. Verder vonden we bijna geen publicaties over de effecten van dit soort diëten op de ritmische activiteit van beloningsgebieden in de hersenen.

Het vrije-keuze hoog-vet hoog-suiker dieet oftewel het free-choice high-fat high-sugar (fcHFHS) dieet geeft dieren ongelimiteerd toegang tot verzadigd vet en een fles suikerwater naast de normale voeding die bestaat uit een pellet (chow, onderhoudsvoer) en kraanwater. Dit dieet, waarbij er dus een vrij keuze is om nutriënten los van elkaar te eten, is een manier om het humane eetgedrag beter na te bootsen, met keuze vrijheid tussen verschillende aantrekkelijke (hoogcalorische) soorten voeding. Dit is wezenlijk anders dan veel andere modellen waarbij voer wordt verrijkt met vet en suiker en aangeboden als één homogene pellet. Dit dieet is reeds succesvol toegepast in ratten en leidt in kort tijdsbestek tot een toename in lichaamsgewicht en vetmassa doordat dieren veel meer calorieën nuttigen vergeleken bij dieren met een controle chow dieet. Uit eerder werk is gebleken dat dit fcHFHS dieet model leidt tot veranderingen in de 24-uurs ritmiek van voedselinname en vooral die in suikeropname, waarbij dieren blootgesteld aan het fcHFHS dieet, regelmatig suiker drinken gedurende de lichtperiode (wanneer ratten inactief zijn), zodat ruim 40% van alle suikerinname in de inactieve fase (d.w.z. gebruikelijke slaaperiode) plaatsvond.

In **hoofdstuk 3** wordt beschreven hoe we het fcHFHS dieet voor het eerst gebruiken in muizen om te kijken naar de effecten van dit dieet op gedrag en fysiologie. Door hun hogere calorie inname werden de dieren die blootgesteld werden aan het fcHFHS dieet snel zwaarder en hadden meer vetmassa dan de

dieren die alleen chow tot hun beschikking hadden. Na 6 weken, lieten muizen op het fCHFHS dieet ook verstoorde 24-uurs eetpatronen zien waarbij de chow inname nog gewoon ritmisch was met de meeste inname tijdens de nacht (actieve periode), maar met een gelijke inname van vet en suiker gedurende de nacht en de dag, resulterende in aritmische eetpatronen voor de smakelijke vet en suikercomponenten van het dieet. Daarna werden de effecten van het 6-weken fCHFHS dieet op de expressie van klokeiwitten in verschillende hersengebieden onderzocht. Door middel van immunocytochemie hebben we de dagelijkse veranderingen in BMAL1 en PER2 bestudeerd in chow gevoede en fCHFHS dieet gevoede dieren op 2 tijdstippen verspreid over de licht-donkercyclus: 4 uur na de start van de lichtfase en 4 uur na de start van de donkerfase. De eiwitexpressie werd gekwantificeerd in de SCN, de nucleus arcuatus (ARC) en de laterale habenula (LHb). In de SCN en de ARC liet PER2 eiwitexpressie een duidelijk verschil zien tussen dag en nacht en dit verschil werd niet beïnvloed door het fCHFHS dieet. In de LHb was echter alleen in de chow gevoede groep een verschil tussen dag en nacht zichtbaar. In de dieren op het fCHFHS dieet was geen verschil tussen PER2 eiwit expressie in de licht en de donkerfase. Deze experimenten laten dus zien dat de verstoring in eetritmiek (van vooral vet en suikerinname) wanneer dieren worden blootgesteld aan een fCHFHS dieet, gekoppeld zou kunnen zijn aan veranderingen in klokeiwitexpressie in de laterale habenula.

Ook al waren de veranderingen in 24-uurs ritmiek in voedselinname tijdens een fCHFHS dieet al beschreven voor ratten, de consequenties van een fCHFHS dieet voor klokeiwitexpressie in beloningsgebieden in de hersenen waren nog niet beschreven in de rat. Daarom hebben we, in **hoofdstuk 4**, ratten blootgesteld aan het fCHFHS dieet en gekeken naar de effecten van dit dieet op klokgenexpressie in verschillende hersengebieden betrokken bij eetgedrag. Echter in dit rattenexperiment werden geen verstoringen in de dag-nacht ritmiek in voedselopname waargenomen in de dieren op het fCHFHS dieet. Deze onverwachte uitkomst ging gepaard met lagere vetinname in de dieren op het fCHFHS dieet

vergeleken met eerdere experimenten waarbij wel verstoringen in dag-nacht ritmes werden waargenomen. We analyseerden de klokgenexpressie van onder andere Per2, Cry2 en Bmal1 in de nucleus accumbens, SCN, LHb, ventral tegmental nucleus (VTA) en de laterale hypothalamus (LH). Ondanks het feit dat we geen verstoringen in eetgedrag vonden, werden veranderingen in Per2 mRNA expressie gezien in de NAc en de LH maar niet in de LHb en VTA. Deze veranderingen werden alleen gevonden voor het Per2 gen en niet voor de andere bestudeerde klokgenen. Dus deze resultaten laten veranderingen zien in Per2 mRNA expressie in sommige beloningsgebieden in de hersenen zonder dat er sprake is van gedragsveranderingen. Het feit dat juist nu in de LHb geen veranderingen in klokgenexpressie werden gevonden terwijl dit wel eerder het geval was, in dieren met een verstoord eetpatroon, duidt op een eventuele rol voor Per2 veranderingen in de LHb in fCHFHS dieet-geïnduceerde effecten op de 24-uurs ritmiek van vet en suikerinname.

De resultaten zoals beschreven in hoofdstukken 3 en 4 duiden op een rol voor de LHb in het dag-nacht ritme in vet-suiker inname. Daarom hebben we in **hoofdstuk 5** de hypothese getest dat de LHb een rol speelt in de tijdsafhankelijke controle van voedselinname (en specifiek van vet en suiker). Ratten ondergingen een operatie om bilateraal canules te plaatsen gericht op de LHb. Ratten werden willekeurig ingedeeld in twee groepen: een chow gevoede groep en een fCHFHS dieet gevoede groep. Infusies met CNQX of saline (als controle groep) werden uitgevoerd op 2 tijdstippen, 1 gedurende de dag en de andere gedurende de nacht, en voedselopname werd gemeten 1 uur na de injectie van CNQX of saline. CNQX blokkeert de glutamaat receptor en infusie van CNQX in de LHb remt dus de activatie van LHb neuronen. De chow gevoede ratten lieten meer voedselinname zien gedurende de donkerperiode dan gedurende lichtperiode wanneer ze met saline werden geïnjecteerd, met CNQX injecties daarentegen was de inname hetzelfde in de licht als in de donkerperiode, waarbij er een significante afname was van voedselinname in de donkerperiode. Tegenovergestelde effecten werden

gezien in de ratten op het fCHFHS dieet. Hier was er sprake van een verhoogde totale inname na injectie van CNQX en dit verschil in inname was vooral het resultaat van een verhoogde vetinname na CNQX, terwijl de suikerinname in de donkerperiode zelfs gereduceerd was ten opzichte van de saline geïnjecteerde groep. Samengenomen laten deze experimenten een duidelijke rol zien voor de LHb in voedselopname, zowel voor gezonde chow als de meer smakelijke vet en suiker, afhankelijk van het tijdstip van de dag.

Tot slot, beschrijft **hoofdstuk 6** een experiment met muizen die deficiënt zijn voor het NPAS2 klokgen. Dit is een homolog van het 'clock'-gen. Terwijl het *clock* gen vooral belangrijk is in de centrale klok, speelt NPAS2 voornamelijk een rol in gebieden in de voorhersenen. Eerder onderzoek heeft laten zien dat muizen deficiënt voor NPAS2 lagere sensitiviteit hebben voor de belonende effecten van cocaïne in vergelijking met wild type muizen. Deze verlaagde sensitiviteit voor beloning leidde tot de hypothese dat NPAS2 mutante muizen een verminderde motivatie of voorkeur zouden hebben voor de vet en suiker componenten van het fCHFHS dieet. Door gebruik te maken van NPAS2::PER2Luc muizen was het mogelijk om zowel effecten van NPAS2 deficiëntie te bestuderen als ook de PER2 oscillaties te meten. PER2Luc muizen hebben namelijk een luciferase reporter in het *Per2* gen wat gebruikt kan worden om *ex vivo* PER2 eiwit oscillaties in afzonderlijke hersengebieden te meten. Wild type en *Npas2*::PER2Luc muizen werden verdeeld over twee groepen: blootgesteld aan een chow dieet of aan het fCHFHS dieet voor 6 weken. Het fCHFHS dieet resulteerde in overeten en meer gewichtstoename in zowel wild type als NPAS2::PER2Luc muizen in vergelijking met het chow dieet. Er was geen verschil tussen beide genotypes in de ritmiek van de voedselinname. De analyse van *ex vivo* PER2 oscillaties liet ook geen effecten van genotype of van dieet zien in de SCN. Alleen in de ARC was de periode van PER2 verkort in de NPAS2 mutante groep vergeleken met de wild type muizen, maar dit verschil was onafhankelijk van het dieet. Daarnaast had de verkleining van de periode in PER2 in de ARC geen gevolgen voor de gedragsritmes. Het kan

dus goed zijn dat een andere, sterkere breinoscillatoren voedselinname beïnvloeden in deze muizen.

De resultaten van dit proefschrift bevestigen een reciproke relatie tussen hoogcalorisch vet-suikerrijk eten en het circadiane systeem in de hersenen. Naast dat het obesitas veroorzaakt, zien we hier dat consumptie van veel vet en suiker ook resulteert in verstoring van het dag-nacht-ritme in klokgenexpressie. Vooral de Per2 expressie in beloningsgebieden in de hersenen is gevoelig voor vet-suikerrijk eten, zelfs zonder detecteerbare veranderingen in eetgedrag. Onze resultaten wijzen naar een rol voor de LHb in de regulatie van tijdsafhankelijk eetgedrag omdat Per2 in dit gebied wel veranderde wanneer circadiane eetpatronen waren verstoort maar niet veranderde wanneer het gedrag niet veranderde, zoals we zagen in het ratten experiment beschreven in hoofdstuk 4. Verder laten we effecten zien van het blokkeren van de glutamaat input naar de laterale habenula op eetgedrag en dat dit effect tijdsafhankelijk is wat de hypothese ondersteunt dat de laterale habenula betrokken is bij de dagelijkse variatie in eetgedrag.

**Résumé**

Cette thèse a étudié l'interaction entre l'obésité induit par la diète et la physiologie (fcHFHS) avec un régime gras et sucrée ou un régime normocalorique chez la souris et le rat. Le régime fcHFHS a modifié le profile journalier de prise alimentaire et l'expression de la protéine PER2 dans l'habenula latérale (LHb) chez la souris. Cependant chez le rat, ni la prise alimentaire ni l'expression du gène *Per2* dans la LHb n'ont changé, mais des altérations ont été observées dans le noyau accumbens. Chez les rats nourris avec une diète standard ou fcHFHS, le blocage glutamatergique dans la LHb induit une altération de la prise alimentaire dépendant du temps du blocage. Finalement, nous avons étudié le comportement alimentaire chez des souris contrôle et mutantes du gène horloge *Npas2* nourris avec le régime fcHFHS. Le comportement alimentaire, néanmoins, était similaire entre les deux génotypes. Les résultats indiquent une relation entre le type de diète et une expression anormale des gènes horloges dans le circuit de la récompense, ainsi comme un rôle important de la LHb dans la prise alimentaire.

Mot clefs : circuit de la récompense, circadien, obésité, gènes horloge

Abstract

This thesis studied the interaction between diet-induced obesity and the 24h variations in behavior and physiology paced by the circadian system. Mice and rats were fed with a free choice high-fat high-sugar diet (fcHFHS). In mice, fcHFHS diet changed day-night eating patterns and PER2 clock-protein expression in the Lateral Habenula (LHb), a food-reward related area. In rats, no feeding patterns or clock-gene changes in LHb were found, however, *Per2* gene expression was disrupted in the Nucleus Accumbens, which is indirectly connected to LHb. When blocking pharmacologically the glutamatergic functioning of the LHb, food intake was altered in both chow and fcHFHS-fed rats in a time-dependent manner. Finally, we tested the influence of *Npas2* clock-gene on the disruption of rhythmic behavior produced by the fcHFHS-diet using *Npas2* mutant and WT mice. Both genotypes, however, displayed similar altered eating patterns caused by the fcHFHS diet. Our findings indicate a relationship between nutrient type and an abnormal clock-gene expression in food reward-related areas, and an important role for the LHb in feeding behavior.

Key words: reward system, circadian, obesity, clock-genes.