



**HAL**  
open science

## Stress, axe corticotrope et caractéristiques nutritionnelles et métaboliques

Diane Abdoulaye

► **To cite this version:**

Diane Abdoulaye. Stress, axe corticotrope et caractéristiques nutritionnelles et métaboliques. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2006. English. NNT : 2006INAP0033 . pastel-00003109

**HAL Id: pastel-00003109**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00003109>**

Submitted on 20 Nov 2007

**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.



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON



Ecole Doctorale ABIES

## THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur en sciences de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Nutrition Humaine

Présentée et soutenue publiquement par

**ABDOULAYE DIANE**

le 07 Décembre 2006

---

### **STRESS, AXE CORTICOTROPE ET CARACTERISTIQUES NUTRITIONNELLES ET METABOLIQUES**

---

**Directeur de thèse**

Dr. Larue-Achagiotis Christiane

**Co-Directeur de thèse**

Pr. Tomé Daniel (INRA UMR 914)

**JURY**

Pr. Tomé Daniel

Président

Dr Georges Chapouthier

Rapporteur

Pr. Xavier Bigard

Rapporteur

Dr. Larue-Achagiotis Christiane

Examineur

Dr. Philippe Schmidely

Examineur

Dr. Pascal Vandekerckove

Examineur

## ***REMERCIEMENTS***

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Unité de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA), à Paris, sous la direction du Pr. Daniel Tomé, directeur du laboratoire. Le travail a été conduit en collaboration avec le Laboratoire de neurogénétique du stress à Bordeaux.

Je remercie sincèrement Daniel Tomé, pour m'avoir accueilli dans son unité et d'avoir encadré mon travail en temps que co-directeur de thèse.

Je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude au Dr. Christiane Larue-Achagiotis, directrice de thèse qui m'a initié au travail de recherche. Je tiens ici à la remercier pour sa très grande disponibilité, ses encouragements, ses conseils et critiques dont elle a su faire preuve à mon égard, à son expérience dont elle n'a jamais manqué de me faire profiter

Mes remerciements vont également au Dr. Gilles Fromentin pour avoir suivi de très près ce travail depuis les expérimentations jusqu'aux dernières corrections.

Je remercie Dr Xavier Bigard, et Georges Chapouthier, rapporteurs, d'avoir accepté de juger mon travail et d'en être les membres de ce jury. Je remercie également XX, et YY, examinateurs, pour leur participation à mon jury de thèse.

Je remercie aussi Nathalie Marissal-Arvy du laboratoire de neurogénétique et stress pour la collaboration dans le cadre de la 2<sup>e</sup> partie de ce travail.

Je remercie aussi la société Lesaffre pour la collaboration dans la 3<sup>e</sup> partie de cette étude.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire, secrétaires, chercheurs, techniciens et étudiants.

## **RESUME**

Les relations entre le stress et l'alimentation sont l'objet d'interactions complexes et multiples. Le lien habituellement admis entre le stress et le gain de poids passe par une modification du comportement alimentaire. Plusieurs travaux indiquant l'impact du stress sur la prise alimentaire ont donné cependant des résultats variables, engendrant selon les sujets une réduction ou un accroissement de la prise alimentaire sans préciser quel(s) est (sont) le(s) macronutriment(s) modifié(s). Dans la première partie de cette thèse nous avons montré l'influence du stress sur le gain de poids et sur le choix en macronutriments, étude réalisée sur le modèle rat soumis à deux situations alimentaires différentes (**expérience 1** : les rats ont reçu l'aliment *ad-lib* ; **expérience 2** : les rats sont soumis à une restriction alimentaire (2 épisodes alimentaires par jour)). Les résultats de ces deux protocoles expérimentaux ont montré qu'un stress aigu (15 min de nage par jour pendant 3 jours consécutifs) appliqué juste avant la phase active entraîne une diminution du gain de poids journalier chez les rats Wistar mâles et femelles. Les mesures de consommations examinées à différents intervalles de temps durant la phase nocturne ont révélé une dépression de la prise alimentaire durant les 3 premières heures après le stress (**expérience 1**) et durant la 1<sup>ère</sup> période alimentaire (**expérience 2**) quel que soit le sexe. Le stress a entraîné aussi une augmentation de la corticostéronémie et une diminution de l'insulinémie. Ces résultats démontrent un dimorphisme sexuel quant au choix en macronutriments en réponse au stress. On conclue donc que le stress induit, en plus d'un effet quantitatif, des effets qualitatifs sur la prise alimentaire. Dans la deuxième partie nous nous sommes intéressés à la variabilité génétique de l'axe corticotrope en relation avec la régulation du métabolisme énergétique entre deux souches consanguines de rats : Fischer F344 obèse et Lou maigre. Les comparaisons neuroendocrinienne, nutritionnelle et métabolique ont révélé que la souche F344 présentait (i) des perturbations de son axe corticotrope qui se traduisent par une forte sécrétion de corticostérone et (ii) une forte vulnérabilité à développer l'obésité liée au régime par augmentation de l'adiposité et diminution du métabolisme de base comparée à la souche Lou. Dans la dernière partie de cette thèse nous avons utilisé une « approche nutraceutique » : testant l'influence, sur le stress, d'un aliment fonctionnel (extrait de levure). A partir de notre modèle de stress mis au point dans la première partie, nous avons pu montrer les propriétés protectrices de l'apport alimentaire de l'extrait de levure sur les perturbations comportementales et alimentaires induites par le stress. Ces résultats ouvrent une perspective sur la relation entre le stress et le comportement alimentaire mais aussi sur une meilleure compréhension de la résistance à l'obésité chez le rat Lou impliquant l'axe corticotrope.

**Mots Clés** : stress, axe corticotrope, choix en macronutriments, gain de poids, obésité, corticostérone, leptine, insuline, open-field, extrait de levure.

## ***ABSTRACT***

Interactions between stress and food intake are well recognized as being complex and multiple. The usually acknowledged link between stress and body weight gain involves feeding behavior alterations consisting in either a reduction or an increase of food intake according to subjects. The first part of this work studied the influence of a stress on body weight gain and on macronutrient selection. Studies were carried out on Wistar rats submitted to two different food situations (experiment 1 : rats received food ad-lib ; experiment 2 : rats were submitted to food restriction (2 feeding periods per day)). The results of these two experimental protocols showed that an acute stress (15-min of swimming/day for 3 consecutive days), applied at the onset of the dark phase, just before the usual feeding time, induced a significant reduction in daily body weight gain in male and female Wistar rats. Moreover stress induced increased plasma corticosterone levels and decreased of insulinemia. Sexual dimorphism was observed regarding the macronutrient selection in response to stress. Thus we concluded that, stress induced not only a quantitative but also a qualitative effect on food intake. In the 2<sup>nd</sup> part of this work we focused on the genetic variability of HPA axis in relation to the regulation of energy metabolism between two inbred strains of rats : Fischer F344, prone to obesity and Lou, obesity resistant. The neuroendocrinological, nutritional and metabolic comparisons showed that F344 strain presents (i) disturbances of its HPA axis resulting in a higher secretion of corticosterone and (ii) a strong vulnerability to develop obesity by increasing adiposity and reducing the basal metabolism compared with the Lou strain. In the last part of this work, we used a « nutraceutic approach » : testing the influence of a functional food (yeast extract) on stress. From our stress model developed at the point in the first part of this thesis, this work showed the protective properties of yeast extract on stress induced behavioral and eating disorders. These results open a new prospect on relationships between stress and feeding behavior but also provide new elements for understanding obesity resistance in Lou rat implying the HPA axis.

**Keywords :** stress, HPA axis, macronutrient choice, body weight gain, obesity, corticosterone, leptine, insulin, open-field, yeast extract

## **LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

### **Posters**

**A. Diané, JM. Héliès, G. Fromentin, D. Tomé, C. Larue-Achagiotis.** Comparaison de l'évolution du choix alimentaire et de la composition alimentaire entre deux souches consanguines de rats : Fischer F344 et Lou en fonction de l'âge. 21<sup>èmes</sup> Rencontres Scientifiques de l'AFERO, Décembre 2003, Paris, France.

**Héliès JM., Diané A., Larue-Achagiotis C., Fromentin G., Tomé D., Moisan MP., Mormede P. Marissal-Arvy N.** Recherche des gènes influençant le stockage du gras chez le rat Lou/C résistant à l'obésité. 32<sup>ème</sup> colloque de la société de Neuroendocrinologie. 16-18 Septembre 2004, La Grande Motte (Hérault), France.

**A. Diané, S. Wetzler, G. Fromentin, D. Tomé, C. Larue-Achagiotis.** Influence du stress sur le choix alimentaire et du gain de poids. 22<sup>èmes</sup> Rencontres Scientifiques de l'AFERO (Association française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité), Décembre 2004, Nancy, France.

**A. Diané, G. Fromentin, D. Tomé, C. Larue-Achagiotis.** Stress-induced modifications of food intake and choice in Wistar rats. Annual Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior (SSIB), July 2005, USA

**A. Diané, G. Fromentin, D. Tomé, C. Larue-Achagiotis.** Influence du stress sur le choix alimentaire et du gain de poids. Congrès de la SFN (Société Française de Nutrition), Novembre 2005, Marsailles, France.

### **Articles scientifiques :**

**Jean-Marie Héliès, Abdoulaye Diané, Allan Langlois, Christiane Larue-Achagiotis, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, Pierre Mormède, Nathalie Marissal-Arvy N.** Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. Obesity Research. 2005 ;

**Diané Abdoulaye, Sandrine Wetzler, Marc Gubern, Jean-Marie Héliès, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, Christiane Larue-Achagiotis.** Comparison of energy balance in two inbred strains of rat : Fischer F344 prone to obesity and Lou rats resistant to obesity. Physiology & Behavior. 2006; 87: 245-250.

**Abdoulaye Diané, Monserrat.Victoriano, Daniel.Tomé, Christiane.Larue-Achagiotis.** Effect of acute stress on food choice in Wistar male and female rats. Physiology & Behavior (soumis)

## ***LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX***

Figure 1 : Localisation des glandes surrénales

Figure 2 : Représentation schématique de l'axe corticotrope

Figure 3 : schémas représentatifs de la biosynthèse des corticostéroïdes

Figure 4 : Représentation schématique du fonctionnement de l'axe corticotrope.

Figure 5 : Séquence alimentaire chez le rat (D'après Le Magnen, 1980)

Figure 6 : Influence des systèmes périphériques et du système nerveux central sur l'appétit.  
D'après Stubbs, 1999

Figure 7 : Evolution de la glycémie du rat avant, pendant et après un repas

Figure 8 : Localisation de l'hypothalamus dans un cerveau de rat

Figure 9 : Structure de l'insuline

Figure 10 : Fonctionnement du système mélanocortine hypothalamique

Figure 11 : Rétrocontrôle périphérique par les fibres sensorielles, la leptine et l'insuline sur les centres régulateurs de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (D'après Schwartz et al.)

Figure 12 : Dysrégulations métaboliques au cours du stress

Figure 13 : corticostéronémie basale et corticostéronémie après un stress de contention

Figure 14 : Glycémie après un stress métabolique entre Lou et F344

Figure 15 : Effet immunodépresseur de l'injection de dexaméthasone chez les F344 et Lou Mâles

Figure 16 : Effet de l'injection d'aldostérone sur l'excrétion urinaire de Na et K

Figure 17 : Schémas du dispositif de l'open-field

Figure 18 : figures (a-e) représentatifs de la consommation alimentaire des 3 premières heures

Tableau 1 : Concentrations plasmatiques basales de cortisol chez l'homme et de corticostérone chez le rat

Tableau 2 : *Les principaux facteurs qui affectent la dépense énergétique*

## Liste des abreviations

AVP	Arginine vasopressine
ACTH	Adenocorticotropin hormone
AgRP	Agouti gene related-peptide
$\alpha$ -MSH	Melanin stimulating hormone
POMC	Pro-opio-mélanocortine
CBG	Corticosteroid binding globulin
MR	Récepteurs minéralocorticoïdes
GR	Récepteurs glucocorticoïdes
ADN	Acide désoxyribo-nucléique
PTSD	Post Traumatic Stress Disorder
GRE	Glucocorticoid-response-elements
NF-kb	Nuclear factor-kb
IL-1/IL-2	Interleukine-1 et 2
IMC	Indice de masse corporelle
11 $\beta$ HSD1	11 $\beta$ -hydroxystéroïds déshydrogénase de type 1
CRF	Corticotropin-releasing factor
PC	Poids corporel
NA	Noradrénaline
PVN	Noyau paraventriculaire
VMH	Hypothalamus ventro-médian
LH	Hypothalamus latéral
CCK	Cholécystokinine
5-HT	5-hydroxytryptophane (sérotonine)
SNC	système nerveux central
IGF-1	Insulin like growth factor
BIT	Bureau international du travail
MB	Métabolisme de base
OMS	Organisation mondiale de la santé
NPY	Neuropeptide Y
SGA	Syndrome général d'adaptation
UCP1	UnCoupling Protein1

## *SOMMAIRE*

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>1</b>
<b>RESUME</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b>	<b>4</b>
Posters	4
Articles scientifiques :	4
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b>	<b>5</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>13</b>
<b>1 Stress :</b>	<b>13</b>
1.1 Ambiguïté du concept de stress, préambule à une définition:	13
1.2 Concept de stress	14
1.3 Approche biologique du stress : historique et approche actuelle.	14
1.4 Bases physiologiques et neurophysiologiques de la réponse au stress	16
1.4.1 Phase d'alarme	16
1.4.2 Phase de résistance	17
1.4.3 Phase d'épuisement.	17
1.5 L'axe corticotrope	18
1.5.1 Description de l'axe corticotrope:	18
1.5.1.1 Le système limbique:	18
1.5.1.2 L'hypothalamus :	18
1.5.1.3 L'hypophyse :	19
1.5.1.4 glandes surrénales	19

1.5.2	Organisation fonctionnelle de l'axe corticotrope.	19
1.5.3	Les récepteurs aux corticostéroïdes	21
1.5.4	Rythme circadien	22
1.5.5	Activation de l'axe corticotrope :	22
1.5.6	Le rétrocontrôle négatif	23
1.5.7	Rôles des corticostéroïdes	24
1.5.7.1	Rôle sur le système immunitaire	24
1.5.7.2.	Rôle sur le métabolisme de l'eau et des électrolytes	25
1.5.7.3	Rôle sur le comportement	26
1.5.7.4	rôles sur la nutrition :	26
<b>2</b>	<b>Relation stress et comportement alimentaire.</b>	<b>28</b>
2.1	Généralités sur le métabolisme énergétique et comportement alimentaire	28
2.1.1	Métablisme énergétique :	28
2.1.2	Le comportement alimentaire	30
2.1.2.1	Description du comportement alimentaire	30
2.1.2.2	Rythmicité de la prise alimentaire (PA)	30
2.1.2.3	Description d'un épisode de prise alimentaire	31
2.1.2.4	Le comportement alimentaire : un comportement adaptatif	31
2.1.2.5	Régulation quantitative du métabolisme énergétique	32
2.1.2.6	Régulation qualitative du métabolisme énergétique	34
2.1.2.7	Bases physiologiques et neurophysiologiques du comportement alimentaire	37
2.2	Stress et comportement alimentaire	43
2.2.1	Le stress et ses effets sur la prise alimentaire	43
2.2.1.1	Chez l'homme :	43
2.2.1.2	Chez le rat :	44

2.2.2	Stress et choix alimentaire	44
2.2.3	Mécanismes centraux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire par le stress	46
<b>3</b>	<b>Stress et obésité</b>	<b>48</b>
3.1	Variabilité génétique de l'axe corticotrope	48
3.1.1	Chez l'homme :	48
3.1.2	Chez l'animal	49
3.2	Axe corticotrope et physiopathologie de l'obésité	50
3.2.1	L'obésité	50
3.2.2	Epidémiologie	50
3.2.3	Les causes de l'obésité	52
3.3	Fonctionnement de l'axe corticotrope et obésité :	52
3.3.1	Chez l'homme :	53
3.3.2	Chez l'animal	53
	<b>TRAVAUX PERSONNELS</b>	<b>56</b>
	<b>ETUDE 1 : RELATION STRESS ET COMPORTEMENT ALIMENTAIRE : INFLUENCE DU STRESS SUR LE CHOIX ALIMENTAIRE.</b>	<b>58</b>
	Résumé de l'article :	59
	Conclusion de l'étude	60
	<b>ETUDE 2 : VARIABILITE GENETIQUE DE L'AXE CORTICOTROPE ET REGULATION DU METABOLISME ENERGETIQUE.</b>	<b>88</b>
	But et objectifs	90
	Les particularités nutritionnelles et métaboliques du rat Lou :	90
<b>A.</b>	<b>ETUDE FONCTIONNELLES DES SYSTEME NEUROENDOCRINIENS</b>	<b>92</b>
<b>1</b>	<b>Matériel et Méthodes :</b>	<b>92</b>
1.1.	Animaux :	92
1.2.	Activité et réactivité de l'axe corticotrope :	92

1.2.1	Corticostéronémie basale sur 24h :	92
1.2.2	Corticostéronémie après le stress :	92
1.3.	Efficacité des récepteurs aux corticostéroïdes (GR et MR)	92
1.3.1	Efficacité GR	93
1.3.1.1	Rétrocontrôle négatif :	93
1.3.2	Efficacité MR	93
<b>2</b>	<b>Analyses statistiques</b>	<b>94</b>
<b>3</b>	<b>Résultats</b>	<b>95</b>
3.1	Activité/réactivité de l'axe corticotrope	95
3.1.1	Cycle nyctéméral de la corticostéronémie	95
3.1.2	Réponse au stress de contention	96
3.2	Efficacité aux récepteurs corticoïdes	96
3.2.1	Efficacité GR :	96
3.2.1.1	Glycémie	96
3.2.1.2	Numération-formule	97
3.2.2	Efficacité MR	98
3.2.2.1	Rapport Na/K urinaire	98
<b>4</b>	<b>Discussion :</b>	<b>99</b>
<b>B.</b>	<b>ETUDE COMPARATIVE DES CARACTERISTIQUES NUTRITIONNELLES ET METABOLIQUES</b>	<b>101</b>
	<b>Résumé de l'étude2:</b>	<b>101</b>
	<b>Résumé de l'étude 3 :</b>	<b>102</b>
	<b>Conclusion de l'étude</b>	<b>103</b>
	<b>ETUDE 3 : PROCESSUS DE REGULATION ET D'ADAPTATION AU STRESS : MISE EN APPLICATION A L'ETUDE DE L'EFFET D'UN ALIMENT FONCTIONNEL SUR LE STRESS</b>	<b>120</b>
	<b>Introduction</b>	<b>121</b>

<b>1</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>122</b>
1.1	Animaux, alimentation et complémentation	122
1.2	Procédure expérimentale	123
1.2.1	Procédure d'application des conditions de stress	123
1.2.2	Protocole suivi	123
1.2.3	Test du niveau d'anxiété des animaux	123
1.2.4	Dispositif du test de stress en openfield	124
<b>2</b>	<b>Analyses statistiques :</b>	<b>124</b>
<b>3</b>	<b>Résultats</b>	<b>125</b>
3.1	Evolution relative du poids des animaux (%)	125
3.2	La prise alimentaire	125
3.3	Paramètres d'anxiété	127
3.4	Paramètres biologiques :	128
<b>4</b>	<b>Conclusion de l'étude:</b>	<b>128</b>
	<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>130</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>134</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>145</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>165</b>
	<b>Annexe 1 : Procédure chirurgicale de cathérisation de la veine cave via la veine jugulaire</b>	<b>165</b>
	<b>Protocole opératoire</b>	<b>165</b>
	<b>Annexe 2 : Thermogenèse par mesure de l'activité des mitochondries du TAB</b>	<b>167</b>
	<b>Annexe 3 : Dosage d'Insuline par RIA</b>	<b>168</b>
	<b>Annexe 4 : Dosage de Leptine en RIA</b>	<b>170</b>
	<b>Annexe 5 : Dosage de corticostérone par RIA</b>	<b>172</b>
	<b>Annexe 6: Tableaux de composition des différents régimes</b>	<b>174</b>



## **INTRODUCTION GENERALE**

### **1 Stress :**

Le mode de vie actuel, imposé par la concentration urbaine et l'industrialisation, est facteur de multiples contraintes physiques et psychiques appelées stress et elles sont responsables de comportements émotionnels liés aux mécanismes du maintien de l'homéostasie.

-Aux USA, le coût annuel du stress est évalué à 200 milliards de dollars (source BIT),

-En France, des études sont en cours, mais on estime déjà que le stress sur le lieu de travail coûte 10 fois plus cher que les conflits sociaux. Chaque année, 30 à 50% des salariés présentent des pathologies liées au stress (maladies coronariennes, troubles psychologiques, etc. . .).

Le stress est un mot de plus en plus employé dans le langage courant et dans des circonstances diverses. Aussi, il nous est apparu nécessaire dans un premier temps de faire un rappel sur la littérature et le concept du mot.

#### **1.1 Ambiguïté du concept de stress, préambule à une définition:**

Chacun de nous a pu utiliser le mot « stress » pour définir ce qu'il ressentait à un moment ou un autre de son existence et à l'heure actuelle. Mais l'homme « de la rue » ne donne pas vraiment de définition précise du stress dans la mesure où il n'en a pas besoin puisqu'il le ressent déjà corporellement. Ainsi le stress, à un niveau de compréhension relativement restreint, est déjà compris intuitivement par chacun de nous. Sa définition est souvent liée au concept de performance. Cependant, le lien entre ces deux notions n'est pas si évident et ne trouve pas de consensus. D'un point de vue scientifique, le problème du consensus est aussi présent et le concept de stress reste large. Une première source d'imprécision réside dans le fait que le terme stress « est déjà tout un programme puisqu'il désigne à la fois l'agent responsable, la réaction à cet agent et l'état dans lequel se trouve celui qui réagit » [1].

Une seconde source d'imprécision réside dans le fait qu'un grand nombre de disciplines se sont intéressées au stress et qu'elles ont toutes insisté sur les aspects les concernant. Ce qu'il faut comprendre cependant, c'est que le stress, hormis le fait qu'il soit tout à la fois la situation, l'état et la réaction, doit être expliqué selon un biais bio-psycho-social et relationniste puisqu'il est constitué d'un nombre de facteurs, mécanismes ou encore réponses, dont l'interaction demeure extrêmement complexe.

## 1.2 Concept de stress

Le stress a souvent une connotation négative parce que les gens l'associent à la peur ou à la colère, qui sont des émotions qui nous perturbent. Cependant, une grande joie, un grand succès peuvent aussi provoquer des réactions physiologiques (tension musculaire, fatigue, etc.). Il y a deux types de stress : le stress aidant, bénéfique pour notre organisme et le stress nuisible, gênant. Si le niveau de tension est adapté à la situation, à l'action, il est bénéfique. Si au contraire, il n'est pas adapté, disproportionné, il y aura encore plus de tensions et donc, des conséquences physiologiques et psychologiques.

Il faut savoir que le stress existe depuis très longtemps déjà. Les humains ont toujours dû faire face à des situations déstabilisantes qui provoquent un déséquilibre. Ce sont par exemple, nos inquiétudes concernant notre avenir économique, la vieillesse, la santé, le décès d'une personne proche, etc. L'homme va donc percevoir les demandes de son environnement, les traiter, et tenter de réagir à ces dernières par le biais d'un nombre de comportements innés et acquis qui constitue un « potentiel personnel ». La plupart des chercheurs s'intéressant au stress s'accordent à dire que le stress a un rôle à jouer dans ce potentiel personnel de réponse. Cependant, c'est au niveau de la nature de ce rôle que les arguments sont divergents.

## 1.3 Approche biologique du stress : historique et approche actuelle.

Le mot stress vient du latin *stringere* qui veut dire tendu, raide et de l'anglais *distress* qui veut dire détresse. La notion de stress est connue depuis plus d'un siècle, et son évolution s'est faite de façon parallèle aux progrès des connaissances scientifiques.

A ses débuts, le concept de stress est limité à l'idée d'une suite de réactions biologiques, puis il évolue avec les nombreuses théories scientifiques qui ont tenté de le développer, pour devenir actuellement une notion plus large, interactive entre l'individu et son environnement [2, 3].

En 1872, Darwin considère que la peur avec toutes ses manifestations avait pour rôle de préparer l'organisme à faire face au danger.

Au 19<sup>e</sup> siècle, Claude Bernard introduit la notion d'équilibre entre le milieu extérieur et intérieur. Selon lui toutes les réactions du sujet face au stress n'ont qu'un seul but, celui du maintien de l'équilibre du milieu intérieur [4].

Ensuite, le mot stress réapparaît au 20<sup>e</sup> siècle dans le langage des physiologistes :

En 1914, W. Cannon, utilisant la notion de stress dans un sens physiologique, puis en 1928 dans un sens psychologique, conçoit le stress comme « correspondant à des stimuli aussi bien physiques qu'émotionnels [5]. Il précise les idées de Claude Bernard en développant la notion de constance du milieu intérieur ou homéostasie [4] et définit la notion d'homéostasie comme une fonction fondamentale assurée par un ensemble de processus dynamiques visant au maintien du milieu intérieur. Il indique la non spécificité de la réponse sympathique en fonction du stimulus précisant que la mise en jeu du système sympathique a pour but de préparer l'animal à l'action. La réponse aux situations de danger se fait par le biais d'une sécrétion quasi réflexe et instantanée d'adrénaline qui prépare l'animal à la lutte ou à la fuite (fight or flight) [2]. Dans cette optique, les réactions de défense visent à mobiliser les ressources énergétiques de l'organisme pour une dépense supplémentaire d'énergie. Ensuite dans les années trente, Dr Hans Selye, endocrinologue, introduit lui aussi le concept de stress en individualisant les réactions physiologiques communes à toutes les agressions. Il définit le stress comme étant un ensemble de réponses non spécifiques de l'organisme pour faire face à des situations d'agression. L'ensemble de ces réponses est appelé syndrome général d'adaptation (SGA) qui évolue en 3 phases dans le temps : la phase d'alarme ou d'alerte, la phase de résistance ou d'adaptation et la phase d'épuisement. Selon cette définition le stress est un état qui se manifeste par un syndrome spécifique, englobant tous les changements aspécifiques qui interviennent dans le système biologique.

Le stress constitue dans un **premier temps**, l'agent causal, le plus souvent représenté par des agents extérieurs nocifs. Dans un **deuxième temps**, le stress n'est plus l'agent causal mais la réponse de l'organisme à cet agent.

Ainsi Hans Selye considère le stress comme étant tout à la fois l'agent et le résultat de son action. Il faut rappeler que dans l'élaboration de ce concept, Selye faisait déjà la distinction essentielle entre eustress (bon stress) et distress (mauvais stress).

Le concept de stress a donc évolué et changé de signification au cours des années, de causes déclenchantes de Cannon, il devient effet consécutif avec Selye [6], [7]. Ensuite on a assisté à un élargissement progressif du concept et de son champ d'application.

Les travaux de recherche se sont multipliés et ont suivi schématiquement deux axes de recherche.

Le **premier** s'est focalisé sur les aspects neurobiologiques du stress et le **second** sur les dimensions psychologiques selon trois approches : psychosociale, cognitive, et psychobiologique [2]. Les études neurobiologiques ont permis de préciser la nature et le rôle

des systèmes hormonaux et neuronaux qui sont impliqués dans la mise en œuvre et régulation du stress. Tandis que les travaux psychologiques se sont intéressés aux aspects relationnels entre la réaction et l'agression. Ainsi, le concept du stress s'est élargi aux agressions psychologiques et sociales.

Certains auteurs remarquent l'influence de l'environnement social comme étant le facteur déterminant les caractéristiques des réactions de stress.

La réaction du stress n'est donc plus considérée comme une simple réponse limitée dans le temps mais devient une **réponse adaptative, dynamique** et qui est à la fois **biologique et comportementale** par la mise en jeu de l'axe hypothalamo–hypophyso-corticosurrénalien appelé **axe corticotrope**.

#### **1.4 Bases physiologiques et neurophysiologiques de la réponse au stress**

Depuis l'introduction du mot stress, plusieurs définitions ont été proposées et qui ont changé au cours du temps avec l'évolution du concept. La définition la plus complète et acceptée est celle de Hans Selye. Selon lui, le stress est un état qui se manifeste par un ensemble de réactions de l'organisme à l'action non spécifique des agents stresseurs physiques, chimiques ou biologiques. L'ensemble de ces réactions non spécifiques est appelé syndrome général d'adaptation (SGA) qui représente toutes les modifications non spécifiques, c'est à dire indépendantes du type de stresser, qui se développent dans l'organisme et dans le temps au cours de l'exposition continue à un stresser. Le SGA se déroule dans sa forme classique en trois phases dans le temps :

##### **1.4.1 Phase d'alarme**

Il s'agit de la réaction d'alarme qui résulte, suite à une stimulation brutale du cortex orbito-frontal, du système limbique et de l'hypothalamus, de l'activation orthosympathique stimulant les organes impliqués dans la défense (appareil cardiovasculaire, les poumons, le foie et les muscles). L'activation orthosympathique a un retentissement particulier sur la médullosurrénale qui est une glande endocrine dont les cellules chromafines libèrent, dans le sang, essentiellement de l'adrénaline. Ceci aboutit à des modifications neurovégétatives intenses et stéréotypées comme en témoignent l'accélération du rythme cardiaque, l'hypertension artérielle, l'hypersudation. Cette phase dure peu, de quelques minutes à quelques heures. C'est **la réaction de stress** proprement dite, identique quel que soit l'agent stresser.

L'hyperactivation des systèmes sympathique et corticotrope a pour seul but la mobilisation énergétique pour assurer l'effort adaptatif. Elle met à disposition les réserves de glucose par glycogénolyse d'abord et par lipolyse ensuite. Une oxygénation optimale est assurée par l'accélération du rythme respiratoire et de la fréquence cardiaque responsable d'une augmentation du débit sanguin. Cette énergie est principalement orientée vers les organes qui interviennent dans l'effort adaptatif (cerveau et muscle).

Parallèlement à cette hyperactivation, les fonctions qui ne sont momentanément pas indispensables sont mises au repos. Les hormones sexuelles et thyroïdienne sont ainsi inhibées.

#### **1.4.2 Phase de résistance**

Elle fait suite à la phase d'alarme si l'exposition au stress persiste et accentue l'activité des systèmes noradrénergique et corticotrope. Elle met en jeu l'ensemble des systèmes hormonaux selon des modalités propres à chaque individu.

C'est **l'état du stress**. Il correspond à une intensification de la mobilisation énergétique de l'organisme qui doit soutenir l'effort pour s'adapter à la situation nouvelle. Le niveau de fonctionnement y est plus élevé : c'est « l'hétérostasie », terme employé par Hans Selye pour quantifier cet état par opposition à l'homéostasie.

Pendant cette phase, des maladies somatiques et psychosomatiques peuvent se manifester avec plus ou moins de gravité. Les affections cardio-vasculaires accompagnent le plus souvent les sujets « surengagés » dans la lutte (troubles du rythme et infarctus sont les plus fréquents).

#### **1.4.3 Phase d'épuisement.**

Elle marque la fin de la période de résistance avec épuisement des ressources et abandon de l'effort. L'hypophyse antérieure et le cortex surrénalien perdent leurs capacités de sécrétion adaptative. Dans les situations les plus graves le risque vital est présent. En effet l'existence de ces différentes phases suggère que les effets du stress varient d'une phase à l'autre et dépendent des capacités de résistance de l'organisme, de la nature, de l'intensité et de la durée du stress. C'est ainsi qu'on distingue :

**Le stress aigu** qui correspond à un stress le plus souvent violent et limité dans le temps. La réponse de l'organisme est, elle aussi, immédiate et intense. C'est une réponse de survie.

**Le stress chronique** correspondant lui à des agressions violentes ou modérées, mais répétées et rapprochées dans le temps.

Dans ces deux cas, la réponse de l'organisme se fait au niveau biologique et comportemental. Elle est responsable des perturbations métaboliques, de l'équilibre biochimique et du comportement alimentaire qui sont le reflet de l'altération de l'axe corticotrope suite à un évènement stressant.

Toute agression stressante a pour conséquence une suite de réactions physiologiques visant à établir un comportement défensif. Le maître d'œuvre de cette programmation est dévolu à l'hypothalamus. Celui-ci va déclencher des réponses neurovégétatives et neuro-hormonales. Dans le cadre de cette thèse nous nous focaliserons sur les réponses neuroendocriniennes et le comportement alimentaire suite au dysfonctionnement de l'axe corticotrope en réponse au stress.

## **1.5 L'axe corticotrope**

### **1.5.1 Description de l'axe corticotrope:**

#### **1.5.1.1 Le système limbique:**

C'est la partie du système nerveux central qui se situe à la base du cerveau, il comprend la région septale, le fornix, l'hippocampe, le complexe amygdalien et les cortex insulaire et fronto-orbitaire postérieur. Il contrôle le comportement, les émotions, la motivation. Il intervient également dans la régulation de conditions internes de l'organisme tels que la température corporelle, la sensation de faim et de soif, l'équilibre osmotique. C'est une zone de perception des stimuli externes qui joue un rôle dans le déclenchement des réactions en stimulant l'hypothalamus auquel il est lié par un ensemble de neurones.

#### **1.5.1.2 L'hypothalamus :**

C'est la partie du cerveau qui assure le lien entre le système nerveux et le système hormonal. L'hypothalamus se trouve régulé par le système limbique. Il joue un rôle primordial dans les fonctions végétatives et endocrines de l'organisme ainsi que dans les comportements émotionnel et alimentaire. Il intervient dans le maintien de l'homéostasie hormonale et dans les réponses adaptatives du système endocrinien face aux situations de stress [8], [9]. Sous l'effet du stress, l'hypothalamus est stimulé au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) dont les neurones disposent des propriétés neurosécrétoires. Certains de ces neurones sont en connexion avec l'éminence médiane de l'hypothalamus. Sous l'effet du stress, le corticotropin-releasing factor (CRF) est libéré dans l'éminence médiane. La sécrétion de CRF s'accompagne de la production d'un autre neuropeptide hypothalamique : arginine vasopressine (AVP), principal cofacteur qui a une action synergique du CRF. L'ocytocine est

également sécrétée à ce niveau avec une action inhibitrice. Ces deux substances permettent une action modulatrice de la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) par l'hypophyse.

### **1.5.1.3 L'hypophyse :**

Glande endocrine de petite taille, pesant moins de un g, l'hypophyse est située à la base du crâne dans une loge appelée "selle turcique", en rapport anatomique direct avec le chiasma optique. Elle est attachée au cerveau (diencéphale) par la tige pituitaire. On distingue trois zones, ou lobes, dans l'hypophyse : L'antéhypophyse (adénohypophyse) située en avant ; la post-hypophyse (neuro-hypophyse) située en arrière et le lobe intermédiaire. L'antéhypophyse sécrète un certain nombre d'hormones parmi elles, l'ACTH.

Le CRF stimule la sécrétion d'ACTH au niveau de l'hypophyse antérieure par le biais du système porte hypothalamo-hypophysaire. En effet, à ce niveau il active la production d'une prohormone : proopiomélanocortropine (POMC), qui se clive ensuite en ACTH et en hormone mélanostimulante (MSH). L'ACTH agit au niveau du cortex surrénalien en stimulant la production et la sécrétion des corticostéroïdes.

### **1.5.1.4 glandes surrénales**

Situées chacune aux pôles supérieurs des 2 reins (**Fig.1**), les surrénales sont formées de deux glandes endocrines associées anatomiquement mais embryologiquement et fonctionnellement différentes :

- la corticosurrénale qui sécrète les glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme et corticostérone chez les volailles et le rongeur), minéralocorticoïdes (aldostérone).
- médullosurrénale constituée de cellules nerveuses dites « chromaffines » qui ont migré à partir des cellules de la crête neurale et qui secrètent les catécholamines (adrénaline et noradrénaline).

### **1.5.2 Organisation fonctionnelle de l'axe corticotrope.**

L'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire stimule la production des hormones corticostéroïdes qui sont synthétisées en réponse à l'hormone adrénocorticotrope (**Fig. 2**), celle-ci est transportée de l'hypophyse antérieure vers la glande surrénale par la circulation générale. L'ACTH est une hormone polypeptidique synthétisée par les cellules corticotropes hypophysaires à partir de la proopiomélanocortine (POMC). Elle présente un effet trophique sur le cortex surrénalien, et augmente la synthèse de glucocorticoïdes *via* des récepteurs membranaires couplés à l'adénylate-cyclase, dont le principal effet est d'accroître la disponibilité du cholestérol au niveau des mitochondries [10], [11]

La synthèse et la libération d'ACTH sont elles-mêmes activées par deux neuropeptides : la corticolibérine ou Corticotropin Releasing Factor (CRF) et l'Arginine Vasopressine (AVP), qui sont libérées par les neurones parvocellulaires du NPV dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Le CRF active la sécrétion d'ACTH, alors que l'AVP, dont l'action est synergique au CRF [12], présente un faible pouvoir sécrétagogue sur l'ACTH.

Les corticostéroïdes sont des hormones synthétisées à partir du cholestérol (Fig.3) fourni par la circulation sanguine et également dans les cellules corticales par l'acétate au niveau du cortex surrénalien. Les glucocorticoïdes sont synthétisés par la zone fasciculée et les minéralocorticoïdes (aldostérone) par la zone glomérulée de la corticosurrénale.

Les glucocorticoïdes sont véhiculés dans la circulation sanguine sous forme liée (90-95%) à une protéine de transport : la transcortine ou Corticosteroid Binding Globulin (CBG), [13], seulement 5-10% de cortisol circulent sous forme libre et constitue la fraction biologiquement active [14]. L'aldostérone est également liée à des protéines plasmatiques comme la transcortine, l'orosomucoïde et l'albumine (50-70%) [3]

Le cortisol plasmatique a une demi vie de 60 à 70 minutes. On note une variation nyctémérale de la cortisolémie en relation avec l'ACTH. Les taux sont élevés le matin et bas la nuit. Tandis que la concentration plasmatique de l'aldostérone est plus faible avec demi-vie de 25 à 40 minutes. Les fractions libres de corticostéroïdes agissent par l'intermédiaire des récepteurs.

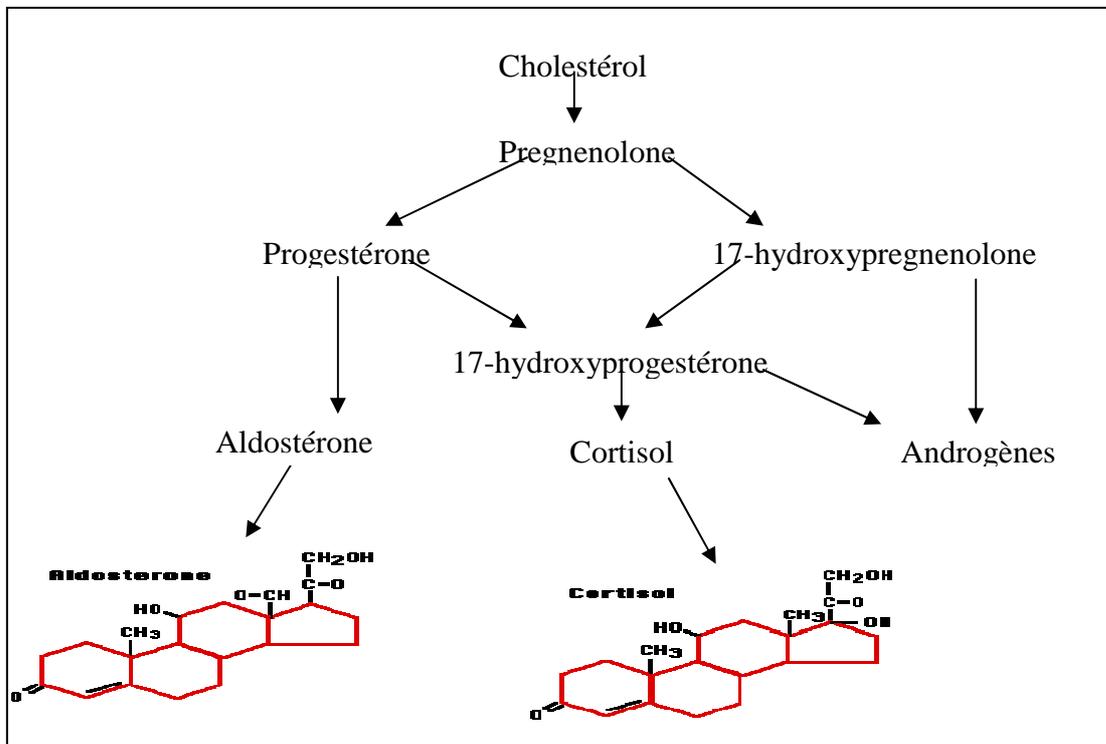


Fig.3: biosynthèse du cortisol et aldostérone.

### 1.5.3 Les récepteurs aux corticostéroïdes

Les corticostéroïdes agissent par l'intermédiaire des récepteurs intracellulaires [15] : récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). Dans le cerveau les récepteurs aux minéralocorticoïdes sont majoritairement présents au niveau de l'hippocampe, mais aussi de l'amygdale tandis que les GR sont ubiquitaires avec une forte concentration dans l'hippocampe et dans l'hypothalamus [14]. La corticostérone, principal corticostéroïde chez le rat, se lie avec une grande affinité aux MR et avec 10 fois moins d'affinité aux GR [16],[17].

Compte tenu des ces affinités, les glucocorticoïdes se lient préférentiellement aux MR en situation basale (faible concentration) alors que la saturation des GR n'a lieu qu'en situation d'hypersécrétion comme après un stress, pendant la phase active du rythme circadien ou en situation pathologique d'hypercorticisme.

Bien que les MR et GR soient différenciellement distribués dans le cerveau, tous deux sont coexprimés dans l'hypophyse et l'hypothalamus où ils agissent dans la régulation de l'activité de l'axe corticotrope [18], [19], [20]. D'autres fonctions physiologiques comme les états comportementaux sont influencées par les MR et GR dans le cerveau [21]. Les corticostéroïdes modulent les processus périphériques, tel que le métabolisme du glucose à travers les GR [22], ou l'équilibre minéral et hydrique via les MR [23].

Les récepteurs aux corticostéroïdes présentent 3 grands domaines sur le plan structural :

- un **domaine N-terminal** intervenant essentiellement dans la régulation de la transcription des gènes cibles et site d'action des protéines régulatrices comme le protéine kinase A par exemple [24], [25] ;
- un **domaine de liaison** à l'ADN constitué de deux doigts à zinc, et présentant un site de dimérisation [26], [27] ;
- un **domaine C-terminal** liant le ligand et interagissant avec des protéines chaperonnes et les microfilaments intercellulaires [28], [29] et présentant un signal de localisation nucléaire.

Les récepteurs sont des protéines à demi-vie courte et turn-over rapide (demi-vie de 20 à 30 minutes) en l'absence de ligand, et cette demi-vie est diminuée de moitié en présence de ligand [30]. Leurs concentrations cellulaires sont régulées par des ligands par auto- ou hétérorégulation, [31], [20], par le stade du cycle cellulaire [32] et par le rythme circadien [33], [34].

#### 1.5.4 Rythme circadien

L'activité de l'axe corticotrope varie au cours du nycthémère. Le taux de sécrétion présente des origines endogènes et dépend de l'innervation splanchnique de la glande surrénale [35], mais aussi de l'éclairement et de la prise alimentaire [36].

Le CRF et l'AVP sont sécrétés de façon pulsatile dans le système porte hypophysaire [37] et les pics de sécrétion de CRF et d'AVP sont atteints au début de la phase active du cycle circadien (le matin chez l'homme et le soir chez le rat), ce qui entraîne par la suite une augmentation de sécrétion d'ACTH et de corticostérone (ou cortisol).

Concentration plasmatique	Matin	Soir
Homme	7-25 µg/ml	2-9 µg/ml
Rat	0,1-5 µg/ml	10-15 µg/ml

**Tableau 1 :** Concentrations plasmatiques basales de cortisol chez l'homme et de corticostérone chez le rat

#### 1.5.5 Activation de l'axe corticotrope :

La première étape de la cascade qui engendre les réponses biologiques au stress, avant que les centres contrôlant les réponses périphériques du stress ne soient activés, est l'interprétation subjective du stimulus. Cette fonction est dédiée aux structures limbiques du cerveau tels que l'amygdale et l'hippocampe. Ainsi les variations du milieu extérieur sont triées et ressenties essentiellement par le système limbique qui envoie ces informations à l'hypothalamus par l'intermédiaire de nombreuses efférences nerveuses [38].

Lors d'un stress, l'hypothalamus reçoit des stimulations directes du système limbique ainsi que des stimulations noradrénergiques provenant du locus coeruleus et du noyau du tractus solitaire. En réponse à ces stimulations, l'hypothalamus libère dans le système porte hypothalamo-hypophysaire le CRF qui active l'adénohypophyse. La production d'ACTH qui en résulte, induit alors la synthèse de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Selon la nature, l'intensité et la durée du stress, d'autres facteurs comme l'angiotensine II ou les cytokines peuvent potentialiser l'activité et la réaction de l'axe corticotrope [39], [37] [18].

Les variations du milieu intérieur (perturbation de l'homéostasie) activent également l'axe corticotrope. Une hypoglycémie modérée induit par exemple la libération de CRF et d'AVP

alors qu'une hypoglycémie sévère met en jeu le système magnocellulaire de l'hypothalamus et la libération d'ACTH qui en résulte induit une hypercortisolémie.

Les glucocorticoïdes agissent sur de nombreux organes mais aussi sur des structures cérébrales afin de réguler leur propre sécrétion : c'est le rétrocontrôle négatif (**Fig.4**).

### **1.5.6 Le rétrocontrôle négatif**

A partir d'un certain seuil, les glucocorticoïdes exercent un rétrocontrôle négatif sur les structures cérébrales et limitent ainsi la durée d'exposition de l'organisme à ces stéroïdes, afin d'en minimiser les effets délétères (effets cataboliques, et immunodépresseurs). Keller-Wood et Dallman [40] ont montré que l'activité et la réactivité de l'axe corticotrope dépendent des deux types de récepteurs (MR et GR). Il est classiquement bien établi que les GR contrôlent la sécrétion des corticostéroïdes en réponse à une stimulation [41], [19] alors que les MR déterminent l'activité basale de l'axe corticotrope [42], [43].

L'activité de l'axe corticotrope varie au cours du rythme circadien, ainsi, l'intensité du rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes est accrue au moment de la phase active du cycle nyctéméral [44], [36]. L'intensité de rétrocontrôle sur les structures cérébrales tel que l'hippocampe est plus élevée en situation de stress aigu qu'en situation de stress chronique [45] [46] [47].

Trois structures se distinguent nettement comme étant les acteurs clé du rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes sur l'axe corticotrope : l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales.

Des structures extrahypothamiques (l'hippocampe) interviennent aussi dans le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes. Les récepteurs aux corticostéroïdes, par leur affinité, jouent un rôle régulateur clé aussi bien sur le contrôle basal de l'activité de l'axe corticotrope (MR) que sur la modulation de l'intensité et de la durée de la réponse au stress (MR et GR). Au niveau même des glandes surrénales, les glucocorticoïdes régulent directement la stéroïdogénèse [48] en inhibant l'expression des enzymes impliquées.

La sensibilité des surrénales à l'ACTH est un facteur de régulation essentiel des concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes tant en situation basale qu'après un stress. Cette sensibilité surrénalienne présente des variabilités interindividuelles et génétiques chez l'homme [49] et chez l'animal [50] [51].

De nombreux facteurs et conditions peuvent déterminer la sensibilité tissulaire aux corticostéroïdes [15] il s'agit de la disponibilité extracellulaire et intracellulaire des hormones, des niveaux d'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes et des affinités de liaison.

En effet une augmentation du feedback négatif par les glucocorticoïdes induit une hypocortisolémie sur les 24h. Cette hypersensibilité centrale aux corticostéroïdes caractérise certaines maladies comme le syndrome de stress post-traumatique (PTSD), [52], et le syndrome de fatigue chronique [37].

Il existe aussi une résistance aux glucocorticoïdes qui ne peut être, selon Cole et coll. [53], que partielle puisque l'inactivation complète de GR n'est pas viable. Les individus présentant une résistance aux glucocorticoïdes montrent une mutation [54], une délétion [55] ou une anomalie de l'expression [56] du gène GR.

La sécrétion de corticostéroïdes résulte de la mise en jeu de différents facteurs neuroendocriniens, dont l'action est non seulement régulée par des facteurs environnementaux (rythme circadien, stress) et génétiques, mais aussi se régulant entre eux. C'est ainsi que le moindre déséquilibre d'un système aussi complexe, et intervenant dans de nombreuses fonctions vitales, engendre un basculement de l'organisme vers un état pathologique.

### **1.5.7 Rôles des corticostéroïdes**

Les corticostéroïdes sont des substances indispensables à la vie : ils interviennent dans beaucoup de fonctions physiologiques via un système de doubles récepteurs en modifiant l'expression de gènes. Ils ont un rôle important dans la régulation des grandes fonctions de l'organisme (fonction immunitaire, cardiovasculaire et surtout les fonctions de nutrition sur lesquelles nous nous focaliserons dans le cadre de cette thèse).

#### **1.5.7.1 Rôle sur le système immunitaire**

Les glucocorticoïdes agissent essentiellement au niveau nucléaire, ce sont des effets génomiques. Ils pénètrent dans le cytoplasme des cellules cibles, se lient à une protéine cytoplasmique appelée récepteur qui change de conformation et le complexe hormone-récepteur ainsi formé pénètre dans le noyau où, sous forme de dimère, il module l'activité régulatrice de séquences d'ADN appelées GRE (glucocorticoid-response-elements) pour augmenter ou diminuer la transcription. En réalité les glucocorticoïdes interagissent avec leur récepteur quand celui-ci se trouve dans un état conformationnel particulier qui existe quand il est lié aux protéines hsp 90 et hsp 70 (heat shock protein). Le complexe glucocorticoïde-

récepteur formé dans le cytoplasme neutralise en outre le NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) activateur de la transcription de gènes à l'origine de molécules proinflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-2).

Les glucocorticoïdes sont immunosuppresseurs, ils réduisent la taille du thymus et abaissent le nombre de lymphocytes T4 et T8 en induisant leur apoptose (mort programmée précoce).

L'activité nyctémérale du système immunitaire est associée à une synchronisation inverse des concentrations plasmatiques de cortisol [57].

### **1.5.7.2. Rôle sur le métabolisme de l'eau et des électrolytes**

L'aldostérone intervient dans la régulation du métabolisme du sodium et du potassium, d'où le terme de minéralocorticoïde utilisé pour la désigner. Les minéralocorticoïdes régulent essentiellement le métabolisme de l'eau et des électrolytes aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau central.

L'effet essentiel de l'aldostérone est rénal : elle favorise la rétention de sodium et augmente l'élimination de potassium. Les mécanismes d'action de l'aldostérone ne sont pas complètement élucidés.

L'aldostérone a des effets rapides, quasi immédiats (moins d'une heure), et des effets retardés apparaissant deux à trois heures après son administration et se prolongeant six à douze heures, voire vingt-quatre heures. Ses effets rapides sont la conséquence de son action membranaire par stimulation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> qui favorise l'absorption de Na<sup>+</sup> au pôle apical des cellules du néphron. L'élévation de la concentration de sodium intracellulaire active ensuite la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase et la réabsorption du sodium. Ses effets tardifs seraient la conséquence de son action nucléaire : l'aldostérone pénètre dans la cellule, se lie à un récepteur cytoplasmique, pénètre dans le noyau, se fixe sur des récepteurs spécifiques et active la synthèse de protéines spécifiques souvent appelées AIP « aldosterone induced proteins ». Par ailleurs, peut-être par l'intermédiaire de ses effets sur les électrolytes, l'aldostérone a un effet inotrope positif et un effet coronaro-constricteur. Chez l'homme une hypertension artérielle associée à une hypercortisolémie [58].

Un déficit d'aldostérone (surrénalectomie) stimule l'appétit pour le sel [59], [60] et perturbe le maintien de l'équilibre sodique et le volume du liquide extracellulaire [61].

### **1.5.7.3 Rôle sur le comportement**

La plupart des comportements sont régulés par le système monoaminergique, qui lui-même est modulé par les glucocorticoïdes. L'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) exerce une action facilitatrice sur la synthèse de sérotonine en activant la synthèse de la tryptophane hydroxylase, enzyme clé dans la synthèse de 5-HT [62]. Les GR sont également abondants dans les neurones adrénergiques et activent la synthèse et la libération de la noradrénaline en réponse au stress suite à l'activation du locus coeruleus ce qui entraîne une augmentation de la vigilance et de l'anxiété chez les animaux. Ces réactions physiologiques s'accompagnent d'un comportement « fight or flight », attaque ou fuite visant à soustraire l'organisme au stimulus stressant. Le stress peut entraîner un comportement agressif, des réactions de peur, de passivité, et également inhiber le comportement reproductif (libido), ainsi que l'appétit. Les glucocorticoïdes régulent l'activité électrique de certains neurones de l'hippocampe, ce qui pourrait expliquer la modification des comportements impliquant les structures limbiques (comme l'activité locomotrice, la mémoire ou l'anxiété). L'administration d'une dose de corticostérone entraîne par exemple un effet anxiolytique chez le rat [63], [64], ou renverse l'effet anxiolytique induit par la consommation d'alcool [65]...

### **1.5.7.4 rôles sur la nutrition :**

Les glucocorticoïdes interviennent dans la régulation de l'équilibre énergétique au niveau des apports, du métabolisme et des dépenses énergétiques en interaction avec d'autres systèmes neuroendocrines.

#### ***1.5.7.4.1 La régulation du comportement alimentaire :***

Une surrénalectomie diminue la prise alimentaire totale [66], cette diminution de la prise alimentaire concerne les trois macronutriments (protéines, lipides et glucides) ce qui induit une perte de poids chez le rat [67]. Elle provoque une chute des réserves hépatiques de glycogène et du dépôt de tissu adipeux. Les glucocorticoïdes sont donc impliqués dans la régulation des apports énergétiques. Cette régulation dépend de la concentration de glucocorticoïdes circulants, elle s'effectue par une action centrale au niveau des deux récepteurs puisque une surrénalectomie entraîne une augmentation du taux de MR et GR chez

les rats Fischer et Brown Norway [66]. En outre elle augmente la prise hydrique, celle-ci est probablement due à l'élimination des minéralocorticoïdes (suite à la surrénalectomie) qui médie l'équilibre hydroélectrique via les récepteurs au niveau du cerveau et ou des reins [68], [69].

Les études concernant des rats surrénalectomisés, démontrent que l'administration de ligands spécifiques MR tels que l'aldostérone ou de faibles doses de corticostérone jouent un rôle dans la prise alimentaire en augmentant la préférence pour les lipides, alors que les GR eux ont un rôle plus important dans le contrôle des glucides. Aucune modification de l'ingestion de lipides n'a été observée après l'administration périphérique des agonistes GR telle que la dexaméthasone (RU28362). A dose physiologique normale, les glucocorticoïdes ont une action anabolisante, tandis qu'à dose élevée comme en situation de stress, ils induisent des effets cataboliques sur les réserves glucidiques et lipidiques via les GR, et en même temps exercent un effet anorexigénique via une hyperleptinémie [70], ou par les GR du NPV [22], ou indirectement via d'autres systèmes [50].

L'effet orexigène des glucocorticoïdes à faible dose s'effectue notamment par une stimulation de la sécrétion de neuropeptide Y (NPY) et de noradrénaline ainsi que par une inhibition de la sécrétion de CRH [71], [72]. D'autre part, l'administration de dexaméthasone chez le rat entraîne une augmentation de l'expression de NPY dans l'hypothalamus particulièrement dans le noyau arqué et le NPV où se situent les neurones CRH. Ceci atteste la stimulation de la sécrétion de NPY par les glucocorticoïdes tout en inhibant le CRH dans le NPV et démontre l'existence d'une boucle de rétrocontrôle entre CRH et NPY [73].

#### ***1.5.7.4.2 Effet sur le métabolisme des macronutriments:***

Les glucocorticoïdes ont une action hyperglycémiant (d'où leur nom) due à une augmentation de la production du glucose par stimulation de la néoglucogenèse et par une diminution de la consommation de glucose par les tissus périphériques. Au contraire la surrénalectomie provoque une tendance à l'hypoglycémie et une grande sensibilité à l'effet de l'insuline. En situation de surrénalectomie, l'organisme se trouve dans l'incapacité de mobiliser ses réserves pour maintenir une normo-glycémie en réponse à un stress [22]. Les actions métaboliques médiées par les GR entraînent une augmentation de la glycémie afin de fournir aux organes vitaux une source d'énergie rapidement utilisable.

Les glucocorticoïdes augmentent le catabolisme azoté et provoquent une fonte musculaire. Ils réduisent la synthèse protéique dans la plupart des tissus. Les acides aminés circulants sont

augmentés par une diminution de leur utilisation et de leur transport vers les cellules extra-hépatiques [74]. Par contre le transport intra-hépatique est accru permettant la néoglucogénèse. Un régime alimentaire riche en protéines est conseillé pendant un traitement par les glucocorticoïdes.

En ce qui concerne le métabolisme des lipides, l'action des glucocorticoïdes est multiple et dépend de ses concentrations plasmatiques. Une surrénalectomie entraîne une diminution de la masse grasse chez le rat, et l'administration de corticostérone à faible dose rétablit les réserves lipidiques [22]. Tannenbaum et coll. [75] ont montré que les régimes riches en lipides agissent comme un stress chronique en induisant une augmentation de la concentration plasmatique basale de glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes exercent différentes actions périphériques impliquées dans le métabolisme lipidique. Au niveau du tissu adipeux blanc, les glucocorticoïdes stimulent la lipolyse et diminuent la production de glycérol. Il y a une redistribution des lipides. Les glucocorticoïdes mobilisent les graisses et les redistribuent d'une manière particulière avec accumulation au niveau de certaines régions corporelles expliquant l'obésité abdominale liée au stress.

## **2 Relation stress et comportement alimentaire.**

### **2.1 Généralités sur le métabolisme énergétique et comportement alimentaire**

#### **2.1.1 Métabolisme énergétique :**

L'équilibre énergétique des mammifères homéothermes résulte du bilan qui s'établit entre les entrées et les sorties d'énergie.

Les **entrées d'énergie** correspondent à la consommation d'aliments. Ceux-ci sont constitués par les 3 catégories de macronutriments : glucides et les lipides qui ont un rôle énergétique, et les protéines dont le devenir est essentiellement structural. Ces composés sont ensuite transformés, au cours de la digestion, en nutriments plus simples (glucose, acides gras, acides aminés) qui pourront ensuite pénétrer dans les cellules et y être utilisés comme métabolites énergétiques.

Les **sorties** ou **dépenses d'énergie** d'un organisme vivant comprennent 3 volets :

**-Le métabolisme de repos ou métabolisme de base (MB)** représentée par le coût énergétique des réactions cellulaires et du fonctionnement neurovégétatif de l'organisme d'un individu au repos, à jeun et à neutralité thermique. Toute cette énergie est dissipée sous forme de chaleur. Chez la plupart des individus sédentaires, le métabolisme de base représente

approximativement 60-70% des dépenses énergétiques quotidiennes. Il est fortement corrélé à la masse adipeuse, à la taille, à l'âge et au sexe mais aussi à l'état nutritionnel. Ce métabolisme basal peut être mesuré par calorimétrie directe ou indirecte.

**-La thermogénèse alimentaire** due à la thermogénèse post-prandiale et qui se divise en 2 catégories : la *thermogénèse postprandiale* « obligatoire » qui correspond à la dépense énergétique liée aux processus de digestion et de stockage des nutriments, elle dépend des voies métaboliques impliquées dans la mise en réserves des nutriments et la *thermogénèse postprandiale* « facultative » qui représente une dépense d'énergie supplémentaire et correspond à la stimulation sympathique de la dépense énergétique pour dissiper, sous forme de chaleur, l'apport excessif d'énergie.

L'effet thermique des repas représente environ 10% des dépenses énergétiques quotidiennes [76]. Il varie selon la taille et la composition du repas, la palatabilité de l'aliment. Le stress peut perturber le métabolisme par libération d'adrénaline et de noradrénaline.

**- L'activité physique** est une dépense énergétique très variable et ne représente que 20 à 30% de la dépense énergétique totale chez des individus sédentaires [77]. Le coût énergétique lié à l'activité physique est fonction de la durée et de l'intensité de celle-ci. Il dépend aussi de la masse musculaire de l'individu. Chez un individu dont l'activité physique est légère, le métabolisme basal représente environ 65% de la dépense énergétique totale.

	<b>Facteurs intrinsèques</b>	<b>Facteurs extrinsèques</b>
Métabolisme basal	Masse de tissus maigres Age, sexe Hormones thyroïdiennes Turnover protéique	
Thermogénèse	État nutritionnel Activité du système nerveux sympathique Tissu adipeux brun ?	Prise alimentaire Ingestion de substances thermogéniques, stress exposition au froid
Activité physique	Masse musculaire Rendement des muscles VO <sub>2</sub> maximale	Durée et intensité des exercices musculaires

**Tableau 2:** Les principaux facteurs qui affectent la dépense énergétique

Le poids de l'homme est une variable très bien régulée puisqu'une variation de 20kg en 30 ans correspond à une variation moyenne de 4 g par jour, soit environ 0.4% des dépenses journalières. On retrouve la même conduite chez l'animal de laboratoire en conditions stables [78].

Pendant 24h, le rat est capable de maintenir son poids constant par des modifications métaboliques et physiologiques. Cet ajustement du régime alimentaire a été mis en évidence chez le rat adulte : il s'agit du comportement alimentaire.

## **2.1.2 Le comportement alimentaire**

L'organisme est amené à se pourvoir en substrats énergétiques nécessaires à son fonctionnement (glucose, acides gras, acides aminés, sels minéraux et vitamines) : c'est le processus de la nutrition. L'une des composantes fondamentales de la nutrition est le comportement alimentaire en ce sens qu'il constitue le point de départ de celle-ci.

Chez l'individu normal, le comportement alimentaire a pour fonction d'assurer la constance des paramètres physiques et physiologiques qui régissent l'organisme.

### **2.1.2.1 Description du comportement alimentaire**

L'étude du comportement alimentaire a vu son essor à partir d'observations sur le modèle animal par Richter, Brobeck, J. Mayer [79]. Dans les années 60-80 ces observations aboutirent à une bonne compréhension des bases neurobiologiques du comportement alimentaire par Le Magnen [80]. L'amélioration des techniques de mesure fait qu'aujourd'hui, la réponse alimentaire peut être quantifiée et séquencée de façon précise (taille et nombre de repas, intervalles entre les repas).

### **2.1.2.2 Rythmicité de la prise alimentaire (PA)**

Le comportement alimentaire se caractérise par des épisodes discontinus de prise alimentaire, de repas. Il existe une **variation circadienne** de la prise alimentaire inverse de celle existant sur le sommeil, opposant une période de prise alimentaire (**Fig. 5**) qui se fait pendant la période active (ou de vigilance), c'est-à-dire le jour pour les espèces diurnes comme l'homme, et une période de non consommation, qui correspond à la phase de repos (ou de sommeil). Ce caractère discontinu de la prise alimentaire, s'opposant à l'utilisation continue de substrats énergétiques par les cellules, implique une orientation différente des flux énergétiques (stockage ou libération de substrats énergétiques à partir des réserves) pendant la journée.

Pendant la période d'alimentation la prise alimentaire est épisodique chez la plupart des espèces ; chez l'animal, l'intervalle entre deux prises alimentaires est un des facteurs régulant le niveau énergétique, chez l'homme la répartition des épisodes de prise alimentaire est influencée par les normes sociales qui codifient le nombre et parfois la composition et la répartition des prises alimentaires.

### **2.1.2.3 Description d'un épisode de prise alimentaire**

Le Magnen [80] définissait la faim comme : «...un éveil spécifique du système nerveux central qui, en réponse à des stimuli internes, dirige le comportement de recherche, de sélection et d'ingestion des aliments en assurant par cette direction, un équilibre du bilan d'énergie et de matière de l'organisme... »

Ainsi, chez l'homme, aussi bien que chez l'animal, on peut mettre en évidence trois phases dans la sélection comportementale :

- *phase pré-ingestive* caractérisée par l'éveil spécifique orienté vers la recherche, la sélection, et parfois le stockage de la nourriture. C'est ce que nous appelons classiquement la faim et qui est déclenché par un besoin spécifique en macronutriments.
- phase prandiale correspondant à la période de prise alimentaire et au processus progressif d'établissement du rassasiement caractérisé par la diminution de la vitesse d'ingestion au cours du repas, aboutissant à son interruption.
- *phase post-prandiale*, caractérisée par un état de satiété dont la durée est variable.

### **2.1.2.4 Le comportement alimentaire : un comportement adaptatif**

Une des fonctions principales du comportement alimentaire est de participer au maintien de l'homéostasie énergétique. Il permet de compenser les dépenses énergétiques pour stabiliser le bilan énergétique de l'organisme qui est assuré par des adaptations métaboliques. En cas de déséquilibre de ce bilan, on observe soit un stockage de l'excès d'énergie sous forme de réserves glucidiques et lipidiques, soit une mobilisation des réserves, lorsque, au contraire, les apports ne couvrent pas les dépenses. Notre organisme est donc dans un équilibre dynamique énergétique se traduisant par la stabilité des réserves énergétiques, et donc de la masse grasse et du poids qui en sont le reflet. Cet équilibre énergétique des mammifères homéothermes résulte du bilan qui s'établit entre les entrées et les sorties d'énergie.

Ainsi plusieurs facteurs peuvent influencer le comportement alimentaire [81]. Parmi eux on peut citer l'effet de la disponibilité ou de la demande énergétique, les conséquences mêmes de

la prise alimentaire (digestion), l'influence d'autres facteurs extérieurs (principalement des stimuli sociaux ) mais aussi l'influence de certaines pathologies ou d'inflammations et la valeur émotionnelle ou hédonique des aliments (**Fig. 6**).

Dans des conditions physiologiques normales, deux paramètres semblent influencer le comportement alimentaire de façon importante. Il s'agit de la disponibilité en énergie d'une part et des phénomènes liés à la digestion d'autre part. La disponibilité en énergie a une forte influence pendant la phase de latence puisqu'elle augmente le temps de satiété lorsque les réserves en énergie sont élevées [82]. A l'inverse les informations générées au cours de la digestion participent à un rétrocontrôle immédiat des événements internes au repas en déterminant, par exemple, la durée des repas ou en régulant la fin des repas (rassasiement) [83].

A partir des principaux déterminants du comportement alimentaire jusqu'à maintenant présentés, il s'agit de comprendre comment, à partir de ces informations relatives au niveau des réserves, l'organisme va générer une réponse comportementale adaptée. La régulation de la prise alimentaire peut se faire à la fois sur la quantité et sur la qualité d'aliments ingérés. Ainsi chez la plupart des mammifères, la composition et la quantité d'aliments ingérés varient considérablement d'un repas à un autre mais aussi d'un jour à l'autre ce qui suggère d'avantage l'hypothèse selon laquelle la prise alimentaire est fortement régulée [84].

#### **2.1.2.5 Régulation quantitative du métabolisme énergétique**

La diminution de la valeur énergétique de l'aliment usuel des rats, en ajoutant une substance non nutritive comme la cellulose, a des répercussions sur le comportement alimentaire des animaux. Après une période d'adaptation, en général deux ou trois jours, ceux-ci ingèrent une quantité de calories suffisantes pour une croissance normale en augmentant leur prise alimentaire. Malgré l'ajustement des palatabilités aux propriétés nutritionnelles, l'anticipation de la qualité et de la quantité des aliments consommés reste imparfaite. Booth [85], montre que cet ajustement de l'amplitude des repas est souvent corrigé par une modification de la régulation en fréquence puis en taille des repas. Ces auteurs [86] ont montré une surconsommation calorique d'environ 34% chez les rats soumis à un régime « cafétéria » et constatent alors un rééquilibrage de la balance énergétique par une modification des dépenses qui se traduit essentiellement par une augmentation des dépenses métaboliques [87].

Après la modification des apports, c'est à dire les « entrées » dans le bilan énergétique, il est possible de modifier les dépenses, c'est à dire les « sorties ».

Dans certaines conditions particulières comme la gestation, la lactation ou la thermorégulation on assiste à une modification non seulement des besoins mais aussi des dépenses.

Le maintien en ambiance froide (5°C) provoque une augmentation de la prise calorique pour répondre plus efficacement à l'accroissement de la dépense énergétique liée à la thermogénèse [88].

Cependant la prise alimentaire n'a pas pour seul objectif de compenser les dépenses de l'organisme elle doit aussi reconstituer les réserves de glycogène ou de graisse qui ont été consommées et fournir à l'organisme les macro- et micronutriments et oligoéléments indispensables. Ainsi il existe également une régulation qualitative des apports alimentaires.

## 2.1.2.6 Régulation qualitative du métabolisme énergétique

### 2.1.2.6.1 Les différents macronutriments :

Chez un individu donné, l'apport énergétique quotidien, mesuré en kilocalories (kcal) vient des nutriments énergétiques contenus dans le repas et apportés par les protéines, glucides et lipides et dans certains cas par l'alcool. Les 3 macronutriments apportent respectivement 4, 4 et 9 kcal par gramme de nutriment pur consommé. La répartition idéale des protéines, glucides et lipides est, respectivement, de 15%, 55% et 30% de l'apport énergétique total journalier.

Chaque macronutriment a un rôle bien défini.

#### **Les Protéines :**

Les protéines tirent leur nom du mot grec *protos* qui signifie «premier» ou «de première importance», car elles sont les constituants de base des cellules vivantes. Les protéines servent à la construction, à la réparation et à l'entretien de l'organisme, fonctions essentielles de la matière vivante. De plus, elles accélèrent certaines réactions biochimiques, agissent comme messagères hormonales, comme constituantes du système immunitaire ainsi qu'à titre de neurotransmetteurs. Lorsque l'apport alimentaire en glucides et en lipides est insuffisant, elles peuvent être utilisées comme source d'énergie. Les recommandations concernant l'apport protéique journalier se situent à 0.8g/kg/jour.

Composées d'acides aminés dans des proportions relatives différentes, on dit des protéines qu'elles sont «complètes» ou «incomplètes». Parmi les 20 acides aminés dont elles peuvent être composées, 8 sont dits «essentiels» car l'organisme ne peut les fabriquer, tandis que les autres peuvent être synthétisés par le corps humain. Les protéines ont un effet satiétogène [89]. Ainsi de par leur pouvoir satiétogène important, les protéines sont largement conseillées dans les régimes alimentaires proposés aux personnes en surpoids.

#### **Les Glucides :**

Les glucides tirent leur nom de *glucis* qui signifie «doux». Ils représentent la principale source d'énergie nécessaire au métabolisme et fournissent l'énergie nécessaire au fonctionnement du cerveau et du système nerveux. Puisqu'ils sont digérés rapidement, les glucides libèrent leur énergie de façon relativement plus rapide que les protéines et les lipides.

On distingue trois principales sortes de glucides:

- les **glucides simples** formés d'un ou de deux oses tels que le glucose, le fructose, le saccharose et le lactose. Ces glucides sont absorbés directement par l'organisme.
- les **glucides complexes** constitués de trois molécules ou plus, tels que l'amidon, le glycogène et la cellulose; ils doivent être brisés lors de la digestion afin d'être absorbés sous forme de glucides simples par l'organisme.
- les **fibres alimentaires** composées en grande partie de glucides et aussi d'éléments de la structure de la plante qui résistent à la digestion. Les fibres ne sont pas nécessairement solides et filamenteuses (fibres insolubles), elles peuvent aussi se retrouver sous forme de gélatine et de mucilage (fibres solubles). N'étant pas digérées, les fibres ne fournissent pratiquement pas d'énergie; elles contribuent plutôt à stimuler le fonctionnement de l'intestin.

Les glucoses sont stockés sous forme de glycogène dans le foie et muscle constituant ainsi les réserves énergétiques de l'organisme mais ces réserves restent faibles comparées à celles des lipides. Les glucides ont un pouvoir satiétogène important et donc un rôle majeur dans la régulation de l'appétit ; puisqu'il a été proposé que les variations de réserves de glycogène soient à l'origine des signaux régulant l'appétit [90], [91].

## **Les Lipides**

Les lipides tirent leur nom du grec *lipos* qui signifie «graisse». Malgré leur mauvaise réputation, il faut rappeler que les lipides sont nécessaires au maintien d'une bonne santé: ils contribuent à la formation des membranes des cellules, à la synthèse des hormones; ils donnent de la saveur aux aliments ; sans oublier qu'ils représentent une source concentrée d'énergie: 9 kilocalories par gramme de lipides (37 kJ), soit deux fois plus que les glucides ou les protéines. De plus, les lipides servent de moyen de transport à certaines vitamines dites «liposolubles» (A,D,E et K) et facilitent ainsi leur absorption. Ils fournissent les acides gras essentiels, soit l'acide linoléique et l'acide alpha-linoléique, les seules matières grasses dont le corps ne peut se passer car il ne peut les fabriquer lui-même.

Dans les aliments, la plupart des lipides se retrouvent sous forme de triglycérides qui, eux, sont composés d'acides gras. Ces acides gras peuvent être polyinsaturés, monoinsaturés ou saturés, selon la présence ou l'absence de doubles liaisons entre les atomes de carbone dont ils sont composés.

Ainsi selon les recommandations de l’OMS, les acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés doivent être représentés respectivement moins de 10%, entre 10-15% et 5-10% de l’énergie fournie par les lipides.

L’augmentation de l’incidence des maladies tels que l’obésité, le diabète de type 2 est étroitement liée à l’accès facile aux aliments palatables c’est à dire aux régimes riches en lipides et/ou en sucre. Lorsque le pourcentage de lipides est élevé dans l’alimentation, de même que celui des glucides, l’apport énergétique spontané tend à être élevé : ce phénomène est qualifié de « surconsommation passive » [92], [32].

#### ***2.1.2.6.2 Régulation qualitative de l’apport en macronutriments : le choix alimentaire***

L’alimentation dissociée consiste à présenter aux animaux les 3 macronutriments séparément (protéines, glucides, lipides). En effet, depuis les travaux de Richter et coll. en 1938[93], il est bien établi que des rats soumis à un régime dissocié (protéines, lipides, glucides présentés dans 3 mangeoires différentes ; ayant la possibilité d’ingérer le macronutriment de leur choix) sont parfaitement capables d’équilibrer leurs apports nutritionnels afin d’assurer une croissance correcte et un développement normal [94],[95],[96]. Cependant il est important de remarquer que les choix alimentaires dépendent du type de macronutriment choisi. En effet plusieurs études [97], [98] ont montré que le type de protéines influençait la prise alimentaire : des rats jeunes ont une préférence nette pour un régime protéique à base de caséine plutôt que de lactalbumine.

Buettner et coll. [99] ont montré, quant à eux, que le type et la qualité des lipides d’un régime influençaient la prise alimentaire.

En ce qui concerne la consommation de glucides ; Wetzler et coll., [100] ont montré que la nature des glucides avait des effets, aussi bien sur le choix alimentaire, que sur la composition corporelle, l’insulinémie et la glycémie.

Il existe peu d’études expérimentales de choix alimentaire à partir de macronutriments purs chez l’homme, en raison des difficultés de procédures, inhérentes aux études employant des mesures directes de la prise alimentaire [101]. Le peu d’études menées chez l’homme sont souvent épidémiologiques et s’appuient sur des auto-estimations de consommation basées sur les tables de composition. Ces études sont donc difficilement comparables à celles mises en place chez l’animal de laboratoire. Le modèle « rongeur », qui peut être considéré comme un outil palliatif, est souvent retenu dans les expériences de choix alimentaire [102].

L'animal de laboratoire n'est pas soumis aux influences socio-éducatives comme l'homme, et la consommation spontanée des différents macronutriments pourrait être considérée comme un moyen d'évaluer le niveau optimal d'apport. C'est ainsi que Webster et coll.,[103] ont suggéré que la prise protéique est, chez le rat, sous la dépendance de ses besoins pour la croissance ou le développement de ses tissus maigres.

Nous voyons donc qu'il existe différents niveaux de régulation du métabolisme énergétique par le comportement alimentaire. On sait par ailleurs que la prise alimentaire est irrégulière ce qui implique que les mécanismes régulateurs mis en jeu interviennent à long terme. Le comportement alimentaire est un comportement instinctif dont les bases physiologiques se trouvent dans certaines structures du système nerveux central (SNC) mais aussi au niveau des organes périphériques. Nous allons voir dans la suite de l'introduction quelles sont les bases neurophysiologiques de ce comportement.

#### **2.1.2.7 Bases physiologiques et neurophysiologiques du comportement alimentaire**

Comme tous les comportements, le comportement alimentaire est contrôlé par le SNC. Sa régulation entre dans le cadre plus général de la régulation de l'homéostasie énergétique.

Il est actuellement admis que les principaux centres de contrôle du comportement alimentaire se trouvent au niveau de l'hypothalamus. La principale fonction physiologique de ce comportement alimentaire est d'assurer l'apport des substrats énergétiques et des composés biochimiques nécessaires à l'ensemble des cellules de l'organisme.

La régulation des apports alimentaires peut se faire à la fois sur la quantité d'aliments ingérés au cours d'un épisode de prise alimentaire, ce qui met en jeu le processus de **rassasiement**, et sur la durée de l'intervalle entre deux prises alimentaires, qui correspond à la période de **satiété**.

##### ***2.1.2.7.1 Les signaux métaboliques***

Les signaux issus du métabolisme sont conduits au niveau des récepteurs centraux par voie humorale. Selon les auteurs, plusieurs théories de la faim et de la satiété se sont développées : **La théorie glucostatique** a été énoncée par Mayer en 1953 [79] et confirmée par Louis-Sylvestre et Le Magnen en 1980 [104]. Ces derniers auteurs ont montré que chacune des prises alimentaires était précédée d'une légère hypoglycémie (**Fig.7**). Cette théorie s'est rapidement révélée insuffisante puisque des situations d'hyper et d'hypoglycémie non associées à des modifications de la prise alimentaire ont en effet été décrites [105], [106], [107].

D'autres théories ont été énoncées par la suite (**théorie lipostatique** de Kennedy [108], **théorie aminostatique** de Mellinkoff [109], **théorie ischymétrique** de Nicolaidis [110]), mais aucune ne rend compte à elle seule la complexité de la régulation de la prise alimentaire.

En effet le contrôle de la prise alimentaire ne dépend pas que d'un signal métabolique unique de faim ou de satiété [111], [112]. Il semble aussi que les nutriments eux mêmes modifient le comportement alimentaire. Par exemple l'ingestion de protéines provoque un puissant effet satiétogène généré par des signaux pré et postabsorptifs contribuant au contrôle de la PA [113].

L'homéostasie du poids corporel est maintenue par le biais d'un ensemble complexe d'interactions entre le SNC et les organes périphériques. Ces interactions comprennent des signaux afférents au cerveau, provenant de divers organes périphériques, une intégration centrale et plus particulièrement au niveau de l'hypothalamus, et des signaux régulateurs efférents pour réguler l'activité de la périphérie par l'intermédiaire, principalement, du système nerveux autonome endocrine [114].

### ***2.1.2.7 2 Les mécanismes centraux du contrôle du comportement alimentaire***

#### **2.1.2.7.2.1 Hypothalamus : le chef d'orchestre du comportement alimentaire**

##### **Anatomie**

L'hypothalamus est situé à la base du cerveau, à l'interface entre le SNC et le système endocrinien hypophysaire (**Fig.8**). De par sa position, il participe à l'intégration des informations provenant de l'environnement de l'organisme et des voies ascendantes du système nerveux périphérique. Il a ainsi un rôle prépondérant dans le contrôle de l'homéostasie auquel participe le comportement alimentaire.

Les expériences des années 1940 ont montré que des stimulations électriques ou des lésions de régions spécifiques de l'hypothalamus modifiaient la prise alimentaire et ont permis d'élaborer une théorie du contrôle du comportement alimentaire mettant en jeu deux centres hypothalamiques antagonistes : les noyaux ventromédians (VMH) et l'hypothalamus latéral (HL). La destruction de HL entraîne une aphagie. A l'inverse, sa stimulation entraîne une réponse ingestive immédiate, même chez le rat rassasié. On considère donc que le HL est une structure qui facilite la prise alimentaire. Par contre la destruction du V.M.H entraîne une hyperphagie liée, chez le rat adulte, à une disparition de la satiété : le VMH est une structure inhibitrice de la prise alimentaire. Ces observations, un peu trop simplistes, n'étaient qu'une

première étape suggérant l'implication de l'hypothalamus dans le contrôle de la prise alimentaire [115].

Dans les années 1970, Leibowitz et Coll. [116] ont montré que le noyau paraventriculaire (NPV) jouait un rôle important dans les processus d'ingestion. Sa stimulation lève l'inhibition portée sur le HL. Au contraire, des lésions de ce noyau entraînent immédiatement une augmentation de la prise alimentaire [117];[118].

Au cours des dix dernières années, la recherche s'est intensifiée et a permis d'identifier, dans l'hypothalamus, les facteurs orexigéniques et anorexigéniques ainsi que leurs sites neuronaux de production et d'action. Les relations morphologiques qui lient les neurones produisant ces facteurs neurochimiques et le fait qu'ils soient capables de co-produire plusieurs signaux régulateurs de l'appétit [119] sont en faveur de la présence, dans l'hypothalamus, d'un réseau de structures interconnectées participant à la régulation du comportement alimentaire.

La découverte en 1994 du gène codant pour la leptine, a constitué le premier pas vers une compréhension précise du fonctionnement hypothalamique comme coordinateur central du comportement alimentaire [120]. Ainsi l'hypothalamus a été proposé comme le site majeur de convergence de signaux provenant de la périphérie comme les signaux d'adiposité.

### **Les facteurs neurochimiques impliqués dans le comportement alimentaire :**

Un certain nombre de neurones sont impliquées dans la régulation du comportement alimentaire. Leur régulation et leurs rôles précis ne sont pas toujours parfaitement bien élucidés, notamment chez l'homme. De nombreux travaux chez le rat ont permis d'établir leur rôle dans le contrôle quantitatif mais aussi qualitatif de la prise alimentaire. Leurs actions sont complexes, et ils ont un effet soit orexigène ou au contraire anorexigène.

### **Neuropeptides Y (NPY) stimulateur de la prise alimentaire :**

Il s'agit d'un neurotransmetteur de 36 acides aminés distribué dans le cerveau. Le site hypothalamique principal du NPY est le noyau arqué. Le NPY est l'un des plus puissants neuropeptides orexigènes connus. Il agit sur le contrôle de l'appétit et du gain de poids favorisant ainsi l'obésité [121]. Administré au niveau intracérébroventriculaire, il stimule la prise alimentaire chez le rat rassasié [122], [123], [124]. L'administration de NPY a les mêmes effets que celle de NA, stimulant préférentiellement la consommation de glucides chez

le rats [125]. Par contre son administration périphérique a soit des effets inhibiteurs [126] soit aucun effet [127] sur la prise alimentaire.

La sécrétion du NPY dans l'hypothalamus est régulée notamment par les facteurs hormonaux : elle est inhibée par l'insuline et la leptine et stimulée par les glucocorticoïdes. La réponse hyperphagique à l'injection de NPY se fait par l'intermédiaire de ses récepteurs répartis dans l'hypothalamus mais aussi dans certains organes et tissus (intestin) [128]. Six différents récepteurs ont été identifiés [129], les isoformes Y1 et Y5 sont les plus impliqués dans l'effet orexigène.

### **Le système mélanocortine central hypothalamique: l'alpha-mélanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)**

Elle dérive de la proopiomelanocortine (POMC). L'administration intracérébroventriculaire de l' $\alpha$ -MSH entraîne une diminution de la prise alimentaire chez le rat [130]. L' $\alpha$ -MSH agit par l'intermédiaire des récepteurs aux mélanocortines, principalement MC3 et MC4. Ce peptide interagit avec l'AgRP qui est un antagoniste endogène du récepteur MC4 et a une action orexigénique. L'injection centrale d'AgRP entraîne une hyperphagie, une diminution de la dépense énergétique et par conséquent une obésité [131] : l' $\alpha$ -MSH est donc un inhibiteur de la prise alimentaire.

Le contrôle de la prise alimentaire est aussi étroitement lié aux taux de neuromédiateurs et à leurs actions sur l'hypothalamus parmi eux : *la Noradrénaline (NA), la dopamine, la sérotonine.*

### **Gestion des réserves en énergie à long terme : influence des signaux d'adiposité : exemple de la leptine et de l'insuline**

L'insuline est une hormone polypeptidique formée, après élimination du peptide C par hydrolyse, de deux chaînes de 21 et 30 acides aminés, reliées par deux ponts disulfures (**Fig.9**). Elle est sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas et exerce un effet hypoglycémiant. Elle fait partie du groupe des peptides appelés IGF (insuline like growth factors).

L'insuline est connue comme étant le premier signal hormonal impliqué dans le contrôle du poids corporel par l'intermédiaire du SNC. Elle stimule la prise alimentaire. A long terme l'insuline pourrait être un signal de satiété au niveau du SNC. La possibilité d'une action directe de l'insuline sur le cerveau a été décrite dès 1967 par Jean Mayer. Il postulait à cette époque que les glucorécepteurs de l'hypothalamus impliqués dans le contrôle de la prise

alimentaire étaient sensibles à l'insuline. Cette hypothèse était ensuite confirmée par Debons [132], [133].

La leptine, c'est est une hormone peptidique libérée par les adipocytes. C'est un régulateur essentiel de l'équilibre énergétique par ses actions combinées sur l'appétit et la dépense énergétique [134]; [135];[136]. Un de ses rôles essentiels est d'informer l'organisme, particulièrement le cerveau sur le niveau des réserves lipidiques. La production de leptine est stimulée in vitro par les glucocorticoïdes et l'insuline . Au niveau de l'hypothalamus, un ensemble de neurones sensitifs à la leptine a été identifié comme étant le système de contrôle homéostasique dans la régulation de l'adiposité et du poids corporel [137, 138].

La leptine agit sur les centres cérébraux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'équilibre énergétique comme l'hypothalamus ventromédian [139], [140], [141]. Elle inhibe la prise alimentaire et le gain de poids chez le rat. Ainsi l'injection intrapéritonéale de leptine modifie la sélection des macronutriments chez le rat par une diminution significative de l'ingestion des protéines alors que la prise glucidique n'est modifiée que chez les rats « gros mangeurs de glucides » [113] tandis que son injection dans le 3<sup>e</sup> ventricule n'entraîne qu'une diminution de l'ingestion protéique et lipidique [18].

Les cibles centrales de la leptine et de l'insuline sont les neurones POMC/CART et NPY/AgRP Les récepteurs de leptine et de l'insuline sont exprimés dans ces neurones [134, 142]. Ces deux facteurs circulants accèdent aux neurones du noyau arqué et inhibent l'activité des neurones NPY/AgRP, notamment leur activité inhibitrice GABAergique sur les neurones du PVN et sur les neurones POMC/CART du noyau arqué ce qui a pour effet de diminuer la prise alimentaire et d'augmenter la sensation de satiété (**Fig.10**)

En effet le contrôle de la PA ne dépend pas que d'un signal métabolique unique de faim ou de satiété. Il serait modulé par de nombreux facteurs métaboliques ou sensoriels périphériques dont les plus évidents sont la distension gastrique [143], [144], la chémosensibilité intestinale [145], les récepteurs porte-hépatiques [146] et les médiateurs humoraux d'origine digestive [147], [148],[149].

Ainsi la distension gastrique entraîne un certain degré de satiété grâce à des informations transmises au niveau central par l'intermédiaire du nerf vague et/ou par voie humorale. Elle déclenche la sécrétion de cholécystokinine (CCK) qui à son tour entraîne un effet de satiété aussi bien au niveau périphérique que central. Toutes ces informations convergent vers le noyau du tractus solitaire (NTS), qui intègre les informations sensorielles provenant du tractus gastro-intestinal. Ainsi les signaux induisant la satiété qui atteignent le NTS sont initiés par les **stimulations mécaniques** et **chimiques** de l'estomac et de l'intestin durant la digestion,

les **informations neuronales** liées au métabolisme énergétique et des **signaux humoraux** telle que la CCK. Il a été montré que la leptine et l'insuline améliorent l'effet satiétogène de la CCK. (**fig11**).

La CCK est une hormone digestive anorexigène produite par les cellules entéroendocrines. Elle est libérée dans le milieu interstitiel en réponse au passage, dans la lumière intestinale, de certains nutriments tels que les acides gras à longue chaîne et des oligopeptides [150], [151], [152]. L'action de la CCK est double. Elle régule les fonctions locales et participe à l'adaptation de la mécanique digestive aux capacités absorbatives du tube digestif. Elle a aussi une action physiologique sur l'appétit. La CCK administrée en voie périphérique diminue la PA de façon transitoire [153], [154], [155] et provoque un syndrome comportemental de satiété postprandiale. L'injection centrale de CCK diminue également la prise alimentaire [156], [157] et en même temps augmente l'activité sympathique [158].

Il est à noter que le comportement alimentaire est influencé, en plus des facteurs internes (signaux métaboliques et neuronaux) par des facteurs externes. Les publicités sur les aliments, les facteurs sociaux tels que le statut socio-économique, les habitudes culturelles ont une grande influence sur le comportement alimentaire [159]. Ajouter à cela le style de vie sédentaire entraînant une diminution de la dépense énergétique et le mode de vie actuelle qui est facteur de stress.

## **2.2 Stress et comportement alimentaire**

La réponse de l'organisme au stress est à la fois biologique et comportementale. La réponse biologique met en jeu de nombreux paramètres (cardiovasculaire, métabolique, immunologique et nerveux) et la réponse comportementale est une adaptation à une situation inattendue permettant à l'individu de se soustraire autant que faire ce peut à l'agent stressant.

### **2.2.1 Le stress et ses effets sur la prise alimentaire**

Le stress peut-il modifier la prise alimentaire ? dans quel sens ? dans quelles circonstances ? et chez qui ?

#### **2.2.1.1 Chez l'homme :**

Plusieurs études ont montré que les effets du stress sur la prise alimentaire sont affectés par certaines caractéristiques personnelles, en particulier psychologiques. Mais les quelques études publiées ne montrent pas d'effet cohérent sur la prise alimentaire lors de l'exposition de volontaires à un stress, même si ce stress induit des modifications biologiques. Par exemple, un stress sonore ne modifie pas de façon systématique la consommation alimentaire des sujets chez qui des modifications des paramètres cardio-vasculaires, respiratoires ou hormonaux confirment l'existence du stress [160]. Fantino [161] fait remarquer, avec justesse, qu'il semble bien difficile voire impossible de perturber, au moyen de stress expérimentaux compatibles avec l'éthique, le contrôle physiologique de la prise alimentaire chez l'homme. Selon lui, ce que l'on appelle communément le « stress de la vie courante » ne correspond en fait qu'aux sollicitations quotidiennes de notre homéostasie physiologique ou psychologique et n'est pas de nature à induire des dysrégulations alimentaires et énergétiques même lorsque ces sollicitations sont assez intenses pour induire les réponses adrénosympathiques de l'organisme. Ceci semble vrai chez la plupart des gens en bonne santé mais peut cependant être remis en question chez des personnes qui, pour diverses raisons, peuvent présenter une vulnérabilité particulière à ces mêmes conditions de vie. C'est ici qu'intervient la notion de « restriction alimentaire » qui se définit par une décision délibérée de limiter la consommation alimentaire, afin de contrôler le poids corporel, pratiquée par de nombreuses personnes, qu'elles soient obèses ou non.

Il semble que l'habitude de restreindre leur consommation alimentaire pour contrôler leur poids rende effectivement les gens plus vulnérables et plus susceptibles à répondre à un stress par une augmentation de la prise alimentaire [162]. Ces auteurs ont remarqué que l'application d'un stress au cours d'études expérimentales (bruit intense, épreuve psychologique, stress interpersonnel ou social) n'a pas d'influence stimulante sur la prise alimentaire de personnes qui ne présentent pas de restriction alimentaire chronique. En revanche, les individus qui montrent un niveau élevé de restriction alimentaire chronique mangent plus dans ces situations de stress. Les aliments choisis dans ces situations d'hyperphagie induite par le stress sont des aliments palatables : au goût très agréable, souvent très gras et sucré.

### **2.2.1.2 Chez le rat :**

Des études chez les animaux de laboratoire soumis à des conditions de stress, montrent que la prise alimentaire est soit stimulée, soit inhibée. La nature du stimulus, son intensité et sa durée déterminent la réponse observée. Par exemple, le pincement non douloureux de la queue de rat le fait manger (le fameux « tail-pinch paradigm ») même si l'animal est rassasié [163]. Dès que le stress est interrompu, l'animal compense la consommation excessive induite par le stress par une hypophagie correctrice. D'autres types de stress, peu intenses et non douloureux, induisent le même comportement d'augmentation de la prise alimentaire chez plusieurs espèces animales. Si l'intensité du stress est forte, alors la réponse de l'animal est inverse : il cesse de manger. Cette hypophagie se prolonge même après l'élimination du stimulus agressif et peut entraîner une perte de poids significatif [160]; [164]; [165]. En outre l'effet du stress sur la prise alimentaire et du gain de poids dépend aussi de l'heure à laquelle le stress est appliqué [166].

Toutes les études précédentes concernaient la consommation d'un aliment unique, qu'en est-il lorsque les animaux ont le choix entre les 3 macronutriments ?

## **2.2.2 Stress et choix alimentaire**

Peu d'études se sont intéressées aux effets du stress sur la sélection en macronutriments. Les réponses physiologiques et comportementales du stress sont orchestrées par l'activation du système CRF. C'est ainsi que certains auteurs ont examiné les effets de l'infusion de CRF [167] sur la prise alimentaire et les effets de l'injection centrale ou périphérique de

corticostérone sur le choix alimentaire des rats. L'injection de 1 µg de CRF dans le ventricule latéral de l'hypothalamus inhibe la prise lipidique, tandis que la dose de 5µg inhibe à la fois les prises lipidique et protéique sans affecter les glucides [168]. Ces résultats confirment l'inhibition de la prise alimentaire par le CRF hypothalamique et démontrent que cette inhibition de la prise alimentaire totale résulte de la diminution de l'ingestion de certains macronutriments. Ces auteurs concluent qu'il s'agit d'animaux ayant une grande préférence pour les lipides, et il serait intéressant d'étudier ces mêmes effets sur des rats préférant les glucides afin de séparer les effets de l'administration de CRF sur l'ingestion d'un macronutriment spécifique de celle de l'aliment préféré. Les glucocorticoïdes sécrétés après le stress, suite à l'activation de l'axe corticotrope, influencent aussi la sélection de macronutriments. Les rats surrénalectomisés soumis à un régime en choix abolissent la prise lipidique, réduisent la prise glucidique et augmentent l'ingestion protéique. L'injection des récepteurs GR restaure les préférences en macronutriments [169]. De même, Castonguay et coll. [170] ont montré une réponse dose dépendante de l'injection de corticostérone rétablissant la prise lipidique chez les rats surrénalectomisés. Il existe une corrélation positive entre le taux basal d'excrétion urinaire de corticostérone et la préférence pour les lipides [171].

Des modèles de stress aigu ont montré, chez l'animal, une augmentation du taux de sérotonine hypothalamique ainsi que de ses métabolites (5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)) [172] [164] [173]. L'hypothèse selon laquelle les récepteurs 5-HT pourraient être impliqués dans la modulation de la prise alimentaire a été récemment étendue aux effets du stress ; puisque selon Fdez-Espejo et coll. [174] l'injection des agonistes de 5-HT inverse les effets comportementaux de certaines formes de stress. Chez le rat, des traitements pharmacologiques qui tendent à augmenter la disponibilité de 5-HT ou à stimuler directement les récepteurs 5-HT, diminuent la prise alimentaire totale, mais ceci est dû essentiellement à la diminution de l'ingestion de glucides [175]. Par ailleurs une corrélation inverse entre le taux de sérotonine et la prise glucidique a été observée [176]. Cependant l'ingestion d'un régime riche en glucides et pauvre en protéines mobilise l'insuline pancréatique [177], [178] ce qui améliore l'utilisation des acides aminés neutres par les tissus périphériques aux dépens du tryptophane. L'insuline augmente la quantité de tryptophane disponible qui traverse la barrière hémato-méningée et facilite ainsi la synthèse de 5-HT [179] [178]. L'ingestion de glucides potentialise alors directement la synthèse de 5-HT dans le cerveau et entraîne ainsi une inhibition de la prise glucidique [180].

En relation avec ces données chez l'animal, des études cliniques ont mis en évidence l'importance de 5-HT dans la prise alimentaire et plusieurs manipulations du système sérotonergique chez l'homme entraînent des changements marqués dans le comportement alimentaire [181]. Ainsi Ericsson et coll. [182], ont montré qu'un faible taux de 5-HT est associé à une augmentation de la prise glucidique chez les femmes.

### 2.2.3 Mécanismes centraux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire par le stress

Les mécanismes centraux impliqués dans l'inhibition de la prise alimentaire et du gain de poids par le stress ne sont pas très bien élucidés. Mais certains peptides et monoamines semblent être impliqués. Il est bien établi que les monoamines [183] et le CRF [184] influencent le comportement alimentaire et médient les réponses physiologiques et comportementales du stress [185]; [186]. Plusieurs études ont attribué l'anorexie induite par le stress à l'activation du CRF et /ou du 5-HT. Ces neuromédiateurs sont élevés après le stress dans plusieurs régions du cerveau particulièrement celles impliquées dans la régulation du comportement alimentaire. L'administration intracérebroventriculaire de CRF produit des comportements typiques de stress induisant la dépression de l'appétit [187], [188]. L'anorexie est aussi observée après l'injection de CRF au niveau du NPV et le traitement au préalable des animaux avec les antagonistes du CRF ( $\alpha$ -hélice CRF) ou des anticorps anti-CRF, bloque les effets du stress et l'anorexie induite par le 5-HT suggérant que l'activation du 5-HT entraîne la sécrétion de CRF qui à son tour inhibe la prise alimentaire.

Malgré l'implication de CRF et du 5-HT dans la régulation de la prise alimentaire chez les rats stressés, des mécanismes spécifiques d'action et d'interaction possibles restent mal élucidés.

Un mécanisme alternatif par lequel le stress pourrait supprimer la prise alimentaire est l'inhibition de la sécrétion de NPY par le CRF. NPY est un stimulateur potentiel de la prise alimentaire quand il est injecté au niveau du NPV. Le blocage de CRF par des antagonistes dans le NPV produit des effets semblables à l'injection de NPY dans la même région [123], [189].



Par ailleurs la réactivité aux stimulations de l'environnement et la sensibilité aux troubles induits ou favorisés par le stress sont très variables selon les individus. Une partie de cette

variabilité est d'origine génétique, en interaction avec les facteurs d'environnement. En effet, les hormones corticostéroïdes libérées par les glandes surrénales au cours du stress sont impliquées dans de nombreuses régulations fonctionnelles, dans les métabolismes, le système immunitaire et le système nerveux central. La variabilité fonctionnelle de l'axe corticotrope est associée à divers dysfonctionnements métaboliques et nutritionnels telle que l'obésité.

### **3 Stress et obésité**

Les corticostéroïdes régulent de nombreuses fonctions vitales. Un dysfonctionnement de leur régulation peut donc entraîner des déséquilibres qui feront basculer l'organisme vers un état pathologique. Leur régulation dépend de beaucoup de facteurs et varie d'un individu à l'autre, et d'une souche ou d'une lignée à l'autre chez l'animal. Cette variabilité peut être influencée par des facteurs environnementaux [190], [191] mais aussi génétiques [192], [193].

#### **3.1 Variabilité génétique de l'axe corticotrope**

Il existe une importante variabilité inter-spécifique mais aussi inter-individuelle de l'activité et de la réactivité au stress. L'interaction entre facteurs environnementaux et prédispositions génétiques induit de fortes différences inter-individuelles de variabilités aux maladies liées au dysfonctionnement de l'axe corticotrope [34].

##### **3.1.1 Chez l'homme :**

Chez l'homme, la cortisolémie basale (mesurée le matin) varie d'un individu à l'autre mais est stable chez un même individu [194]. L'origine partielle génétique de cette variabilité a été montrée grâce à des études faites sur différentes familles. La cortisolémie présente en effet une plus faible variabilité au sein d'une fratrie qu'entre individus sans lien de parenté. Ces études familiales présentent toutefois des inconvénients du fait de la non dissociation entre les influences environnementales (milieu et niveau de vie, culture, éducation...) et les facteurs purement génétiques sur le phénotype étudié. Des études portant sur l'adoption ou la comparaison de jumeaux monozygotes et dizygotes élevés ensemble ou séparément permettent de dissocier plus nettement les influences génétiques des influences environnementales sur la variabilité de l'activité de l'axe corticotrope chez l'homme. La cortisolémie montre une variabilité plus faible entre jumeaux monozygotes qu'entre jumeaux dizygotes [195], [196].

Le cycle nyctéméral de sécrétion de cortisol varie également d'un individu à un autre, sans relation apparente avec le contexte psychosocial de ces individus [197].

La variabilité interindividuelle de l'activité et la réactivité de l'axe corticotrope au stress est en partie déterminée par des facteurs génétiques chez l'homme. Cette variabilité sous-entend des vulnérabilités différentes à certaines pathologies liées à l'axe corticotrope comme par exemple l'obésité, la dépression et l'anorexie nerveuse. L'étude de l'origine génétique de cette variabilité peut être simplifiée par l'utilisation de modèles animaux.

### **3.1.2 Chez l'animal**

La variabilité des réponses neuroendocriniennes et comportementales au stress chez les animaux est partiellement d'origine génétique.

La réponse au stress, bien que peu étudiée comme cause ou conséquence de la domestication, a certainement un impact considérable sur l'adaptation des animaux d'élevage [198]. En effet, les poissons en élevage sont soumis d'une part à des manipulations différentes, et d'autre part à un confinement (densité d'élevage) bien supérieurs à ceux de leurs congénères sauvages et ceci peut avoir des conséquences négatives plus ou moins importantes aussi bien sur la croissance que sur la reproduction.

Les lignées de rongeurs de laboratoires sont d'excellents modèles d'études des bases moléculaires de la variabilité de l'activité et de la réactivité de l'axe corticotrope au stress. Ceci peut être dû à l'utilisation d'un grand nombre d'animaux, à l'homogénéité des populations, à la reproduction très rapide et à la facilité de manipulation. Les différences mesurées entre souches en environnement constant, sont alors d'origine génétique, et la variabilité interindividuelle au sein d'une même souche peut être attribuée à des influences purement environnementales.

Les rats consanguins sont souvent utilisés pour l'étude des variations génétiques de l'activité et de la réactivité de l'axe corticotrope au stress. En effet, les concentrations de corticostéroïdes et d'ACTH mesurées en situation basale ou en réponse au stress varient fortement d'une souche de rats à l'autre [199], [200], [201]. Ainsi, des études comparatives sur des souches consanguines de rats différentes par leur réactivité au stress ont été utilisées afin de rechercher des mécanismes génétiques de variation dans le fonctionnement de leur axe corticotrope [202]. Il existe une différence de réactivité et d'activité de l'axe corticotrope entre les rats Brown Norway (BN) et les rats Fischer (F344) [203]. Comparée à la souche F344, la souche BN sécrète moins de corticostéroïde pendant la phase obscure de rythme circadien. Cette différence est associée à une différence de la densité des récepteurs MR au

niveau de l'hippocampe et de la concentration plasmatique de transcortine entre ces deux souches.

Il existe aussi une variabilité de l'axe corticotrope liée au sexe [204]. Il est bien établi que les hormones sexuelles interagissent avec les neuromédiateurs impliqués dans la dépression. C'est ainsi qu'une déplétion des taux d'œstrogène est associée à la dépression [205].

### **3.2 Axe corticotrope et physiopathologie de l'obésité**

#### **3.2.1 L'obésité**

L'obésité est un état caractérisé par un excès de masse grasse, résultat d'un déséquilibre entre l'apport calorique quotidien et les dépenses énergétiques. Cependant, de nombreux facteurs peuvent renforcer ce déséquilibre, et favoriser l'obésité ou du moins la prise de poids.

L'obésité est définie par un Indice de Masse Corporelle (IMC) ou Body Mass Index (BMI). L'IMC est calculé en divisant le poids de la personne par le carré de sa taille (Kg / m<sup>2</sup>). Si cet indice est supérieur ou égal à 30, l'individu est considéré comme obèse. Entre 25 et 30, on parle de surpoids. A partir de 40 Kg / m<sup>2</sup>, on parle d'obésité morbide. C'est le seuil à partir duquel on risque de voir apparaître une morbidité secondaire à différents types de complications.

#### **3.2.2 Epidémiologie**

L'obésité est devenue la première maladie non infectieuse de l'Histoire. C'est une véritable épidémie qui frappe aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) place actuellement sa prévention et sa prise en charge comme une priorité dans le domaine des pathologies nutritionnelles.

- Sur 6 milliards d'individus, il y a plus d'un milliard d'adultes en surpoids et au moins 300 millions d'entre eux sont obèses.
- 50 % des américains sont en surpoids et 25 % franchement obèses.
- On dénombre en France, selon l'enquête ObEpi 2003 réalisée auprès de 20000 foyers, 41.6% de personnes en surpoids (IMC>25) ce qui représente environ 19.8 millions d'individus.

On observe dans les pays industrialisés, un gradient social inverse de l'obésité, c'est à dire

que les populations de faible niveau socio-économique sont plus touchées par le surpoids et l'obésité que les classes aisées [206].

Ainsi l'obésité cause ou exacerbe de nombreuses maladies non transmissibles tels que le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires [207]. Le risque de mortalité augmente de manière exponentielle lorsque l'IMC dépasse 30.

### 3.2.3 Les causes de l'obésité

Les causes de l'obésité sont multifactorielles parmi elles :

- **les facteurs génétiques** : ils ont un rôle indéniable mais ne sont pas les seuls responsables.

Un petit nombre de gènes aurait un impact important sur la corpulence et le pourcentage ou la distribution régionale de la masse grasse.

Les enfants en surpoids âgés d'une dizaine d'années ayant au moins un parent obèse ont un risque de 80 % de devenir obèses à l'âge adulte contre 10 % de risque si les deux parents sont maigres.

- **les facteurs environnementaux et les modifications comportementales** la « malbouffe » avec une alimentation trop riche en énergie. Les populations occidentales ont tendance à consommer moins de calories et moins de graisses qu'avant les années 1960 alors qu'elles grossissent régulièrement. Cela s'explique par un changement du style de vie qui devient de plus en plus sédentaire.

- **les facteurs endocrinologiques** : une anomalie d'un des systèmes neuroendocriniens (dérèglements hormonaux) peut conduire à une dysrégulation du comportement alimentaire, du stockage et/ou de la dépense énergétique. La prise alimentaire, le stockage et les dépenses énergétiques sont en partie régulés par les corticostéroïdes.

### 3.3 Fonctionnement de l'axe corticotrope et obésité :

L'importance des glucocorticoïdes dans le développement et le maintien de l'obésité ainsi que la genèse de ses complications métaboliques et cardio-vasculaires est maintenant bien connue. Les glucocorticoïdes interviennent dans la régulation de l'équilibre énergétique. Non seulement ils modulent les effets des neuropeptides, et ceux de certains signaux afférents au SNC, tels que ceux de la leptine, mais ils influencent aussi directement le métabolisme périphérique. Une altération de cet équilibre comme dans le cas des syndromes d'obésité liés à des pathologies telle que l'insulino-résistance met-elle en cause un dysfonctionnement de l'axe corticotrope ?

### **3.3.1 Chez l'homme :**

Le stress engendre des émotions négatives. Ce stressor est généralement combattu à l'aide de réponses spécifiques adaptées utilisant les compétences de chacun. Or, lorsque le problème ne peut être résolu, l'organisme fait appel à des mécanismes de défense non spécifiques, destinés à diminuer l'anxiété et les émotions négatives. Cela peut se traduire par une augmentation de la prise alimentaire surtout avec des aliments jugés aptes à apporter du réconfort (aliments palatables), d'où une prise de poids, qui elle-même risque de générer du stress et c'est le départ d'un véritable cercle vicieux. Sur le plan physiopathologique, plusieurs études ont rapporté une hyperactivité de l'axe corticotrope associée à l'obésité viscérale chez l'homme. Rosmond, [208], et Wajchenberg, [209] ont montré une forte association entre l'obésité abdominale et l'hypercortisolémie dans le syndrome de Cushing.

Ainsi, après une stimulation de l'axe corticotrope (injection de CRF, stress), on observe une augmentation plus élevée de la sécrétion de cortisol chez les patients obèses comparés aux sujets normaux ce qui démontre une plus grande vulnérabilité des obèses au stress. En outre la gravité des anomalies métaboliques associées à l'obésité (hyperinsulinémie, hyperlipidémie) est très fortement corrélée au dérèglement de l'axe corticotrope [208]. L'hyperglycémie induite par une hypercortisolémie serait par exemple à l'origine de l'insulino-résistance notée chez les patients obèses. En effet, l'existence, chez l'obèse, de concentrations circulantes normales de cortisol laisse envisager la possibilité d'anomalies du métabolisme local des glucocorticoïdes, en particulier dans le tissu adipeux. Un ensemble de données récentes a mis en évidence, dans ce tissu, une surexpression de la 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11 $\beta$ HSD1), enzyme qui convertit la cortisone (inactif) en cortisol (actif). Cette surexpression engendre un hypercorticisme local [210].

### **3.3.2 Chez l'animal**

Des modèles animaux obèses révèlent des dysfonctionnements de leur axe corticotrope. Chez les souris mutante ob/ob ou knock-out (ko) du gène de la leptine, une hypercorticostéronémie et une obésité se manifestent, elles peuvent être réversibles après surrénalectomie [211], [212]. Ce modèle monogénique de souris obèse présente en outre une sensibilité accrue à la

corticostérone entraînant une hyperphagie, une hyperinsulinémie et une augmentation du poids corporel [213]. Il a été prouvé qu'une seule séance de stress suffit à provoquer une prise de poids chez les animaux prédisposés à l'obésité [214]; l'augmentation de la prise alimentaire, cause de la prise de poids, contribuerait à mettre fin au stress ou éventuellement à le prévenir [211].

Des expériences menées sur des rats Zucker (génétiquement prédisposés à l'obésité) ont révélé que la privation de nourriture provoquait une hausse de corticostérone [215]. Chez ces rats, trois heures de jeûne suffissent pour provoquer ce stress alors que chez les rats normaux aucun effet n'a été observé même après 48h de jeûne. En effet les rats Zucker obèses sont caractérisés par un taux plasmatique élevé de corticostérone lié à une hyperactivité de leur axe corticotrope [216], cette souche est caractérisée par une surexpression de CRF en situation de stress [217], [218].

La plupart des anomalies métaboliques présentes dans le phénotype obèse du rat Zucker (hyperphagie, hyperinsulinémie, hyperlipidémie) sont réversibles après une surrénalectomie et restaurées par une complémentation en corticostérone [219], [211].

Ainsi certains modèles d'animaux transgéniques confirment l'implication des glucocorticoïdes dans l'expression des phénotypes d'obésité. Le modèle de souris transgénique surexprimant la 11 $\beta$ HSD1 dans le tissu adipeux manifeste une obésité abdominale associée à une augmentation du taux de corticostérone locale [220]. Cette surexpression de la 11 $\beta$ HSD1 peut constituer une étiologie possible d'obésité en relation avec l'axe corticotrope en modifiant la biodisponibilité des corticostéroïdes. Les glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur direct sur l'axe corticotrope, mais les doses chroniques (sur plusieurs jours) de ces stéroïdes sur le cerveau sont globalement excitatrices. Il est intéressant de constater que l'absence de glucocorticoïdes empêche tous les effets de l'infusion centrale chronique de NPY chez le rat normal [221]. En effet, l'augmentation de la prise alimentaire et celle du poids corporel consécutives à l'administration centrale de NPY ainsi que les altérations hormono-métaboliques observées sont absentes lorsque le rat est surrénalectomisé et ne réapparaissent que lorsque les glucocorticoïdes sont administrés centralement en même temps que le NPY [222]. Ceci permet de conclure que la présence centrale de glucocorticoïdes est nécessaire pour permettre l'action du NPY dans l'induction d'un syndrome d'obésité.

Des doses élevées chroniques de glucocorticoïdes agissent fonctionnellement selon trois voies :

-les glucocorticoïdes augmentent l'expression de CRF dans le noyau central de l'amygdale (zone du cerveau impliquée dans l'émotion).

-Les glucocorticoïdes entraînent l'augmentation des activités compulsives (ingestion accrue de glucides, lipides)

-Les glucocorticoïdes favorisent la prise de poids et l'établissement d'un syndrome d'obésité abdominale associé à l'insulino-résistance, par le biais d'une action centrale induisant une activation du système nerveux parasympathique (**Fig.12**) [208]; [223], .

Dans cette perspective, il est intéressant de constater que, bien que ne s'accompagnant pas toujours d'un état d'hypercorticisme à l'état basal, l'obésité chez le rongeur présente souvent une hypersécrétion de corticostérone en réponse à la prise alimentaire. Ceci se reflète d'ailleurs par une excrétion urinaire de corticostérone exagérée chez le rat génétiquement obèse par rapport à son témoin mince [224]. De plus, la consommation d'un régime riche en graisses chez l'animal normal, qui produit un syndrome d'obésité et d'insulino-résistance, s'accompagne également d'un excès de production de glucocorticoïdes [75]. Ceci constitue des éléments importants dans le constat de l'importance d'un dysfonctionnement de l'axe corticotrope dans les troubles métaboliques accompagnant l'obésité.

Chez l'animal d'expérience, les mesures phénotypiques caractérisant le paramètre étudié (activité basale de l'axe corticotrope, réponse neuroendocrinienne au stress etc..) peuvent être réalisées de manière systématique sur des souches ou lignées pures afin d'en sélectionner le couple le plus divergent pour ce caractère. Et ce couple constituera un excellent modèle des différences d'origine génétique de l'activité et de la réactivité de l'axe corticotrope au stress, étudié dans la 2<sup>e</sup> partie de cette thèse.

## TRAVAUX PERSONNELS

Il y a 40 ans, le mot "stress" commençait à peine à être connu. Maintenant, c'est une réalité qui est considérée comme un problème normal de la vie moderne. Le stress est le lot quotidien d'une majorité de personnes dans leur travail, mais il atteint également les enfants, les adolescents et les personnes âgées

Le stress est le résultat de ce que l'on ressent au plus profond de soi ou de ce qui se passe dans notre environnement et vient perturber notre équilibre. L'organisme déploie alors différents moyens pour le gérer afin de retrouver le calme et l'équilibre. Ces moyens peuvent être biologiques et/ou comportementaux. Puisque le stress fait partie intégrante de notre quotidien, la manière dont nous mangeons quand nous sommes stressés peut avoir des répercussions sur notre alimentation et notre santé. Ainsi les études montrant les effets post stress sur le comportement alimentaire sont contradictoires du fait d'une part de la complexité du terme stress mais aussi de la différence de méthodologie entre les études. Des études chez les animaux de laboratoire soumis à des conditions de stress, montrent que la prise alimentaire est soit stimulée, soit inhibée. La plupart de ces études ont utilisé l'aliment standard mixte sans chercher à déterminer si la réponse comportementale au stress était due plus particulièrement à l'effet d'un des macronutriments présents dans l'aliment standard (protéines, lipides, glucides).

Dans la **première partie** de notre travail, nous essayerons de déterminer l'influence du stress sur le choix alimentaire, le gain de poids et sur la cinétique des hormones (corticostérone et insuline).

L'impact des circonstances de stress sur l'activité sécrétoire des systèmes neuroendocriniens cérébraux impliqués dans la régulation de la balance énergétique est bien connu.

Par ailleurs l'activation de l'axe corticotrope à la suite d'un stress entraîne la libération des glucocorticoïdes. L'importance des glucocorticoïdes dans le développement et le maintien de l'obésité est maintenant bien établie. Les glucocorticoïdes modulent non seulement les effets des neuropeptides et ceux de certains signaux afférents au SNC, tels que ceux de la leptine, mais aussi influencent directement le métabolisme périphérique. Plusieurs études ont montré que les syndromes d'obésité chez le rongeur sont normalisés après une surrénalectomie et restaurés par une administration de glucocorticoïdes, attestant ainsi que ces derniers sont impliqués dans la réponse au stress et jouent un rôle important dans le développement de l'obésité. La prévention de l'obésité augmente de façon importante aussi bien dans les pays

développés que dans les pays en développement et devient dès lors un véritable problème de santé publique. Cette prévention passe par une meilleure compréhension des causes mais aussi des conséquences. Sur le plan physiopathologique, des études ont montré une hyperactivité de l'axe corticotrope associée à l'obésité viscérale. Or la réactivité aux stimulations de l'environnement et la sensibilité aux troubles induits par le stress sont très variables selon les individus. Une partie de cette variabilité est d'origine génétique. En effet, l'analyse de la variabilité génétique de l'activité et de la réactivité de l'axe corticotrope permettra, d'une part, de mettre en évidence les mécanismes responsables et la compréhension des processus physiopathologiques associés, en particulier nutritionnels et métaboliques d'autre part. Les souches consanguines de rongeurs sont donc des modèles intéressants pour cette recherche du fait d'une grande variabilité phénotypique entre souches. En outre, l'existence, chez l'obèse, d'une concentration basale élevée de glucocorticoïdes met-elle en cause un dysfonctionnement de l'axe corticotrope ?

Afin d'apporter une réponse à cette question, nous avons mené dans la **2<sup>ème</sup> partie** de ce travail, une étude comparative sur le plan neuroendocrinien, nutritionnel et métabolique entre deux souches de rats : Lou (souche résistante à l'obésité) et Fischer F344 (tendance à l'obésité).

Le processus de régulation et d'adaptation au stress par l'organisme implique, entre autre, les facteurs nutritionnels. En effet, certains nutriments jouent un rôle biologique spécifique en intervenant dans la régulation des neuromédiateurs impliqués dans le stress ; puisqu'il existe un lien direct entre les apports nutritionnels et la biosynthèse de ces neuromédiateurs. Enfin dans la **3<sup>ème</sup> et dernière partie** de cette thèse nous nous sommes intéressés au processus d'adaptation et de régulation du stress par un extrait de levure.

**Etude 1 : Relation stress et comportement alimentaire : influence  
du stress sur le choix alimentaire.**

Le lien habituellement admis entre stress et poids passe par une modification du comportement alimentaire sous l'effet d'une contrainte, d'une agression ou d'une restriction qui sont des stress. L'effet du stress sur la prise alimentaire est cependant variable, engendrant selon les sujets une réduction ou un accroissement de la prise alimentaire.

Plusieurs travaux indiquent que le stress inhibe la prise alimentaire et le gain de poids chez les rats. Mais la question la plus importante est de savoir si certaines caractéristiques psychologiques ou physiologiques prédisposent les sujets à adopter une alimentation malsaine. Exemple : le degré d'hypophagie induit par le stress dépend de l'état des réserves de l'animal avant une situation stressante suggérant ainsi qu'une restriction alimentaire pouvait accroître la prise alimentaire et par conséquent le gain de poids lors du stress [225]

La plupart de études mesurant les effets post stress sur la prise alimentaire et le gain de poids se sont basées sur un régime standard mixte excluant la possibilité de savoir si le stress inhibe tous les macronutriments ou bien si cette diminution résulte du refus d'un macronutriment spécifique présent dans l'aliment standard ? d'où l'objectif de cette partie qui a fait l'objet d'un article soumis à **Appetite** (voir Article 1 à la fin de la partie)

### **Résumé de l'article :**

L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence du stress sur le gain de poids et sur la prise alimentaire totale plus particulièrement sur le choix en macronutriments chez les rats Wistar mâles et femelles soumis à deux situations alimentaires différentes :

**Expérience 1** : les rats reçoivent l'alimentation à volonté (ad-lib)

**Expérience 2** : les rats reçoivent 2 repas par jour (1<sup>er</sup> repas : 10h-11h et 2<sup>e</sup> repas : 15h-17h).

Après deux semaines d'habituation au régime et au cycle inversé, la ligne de base pour chaque macronutriment est établie. Les rats (sauf les groupes témoins) sont soumis à un stress aigu de 15 minutes de nage pendant 3 jours consécutifs. Du sang est aussi prélevé à différents intervalles afin de voir l'influence du stress sur la cinétique des hormones telles que la corticostérone et l'insuline. Le gain de poids et la consommation alimentaire sont comparés d'une part aux valeurs basales et d'autre part à celles des groupes témoins.

Les résultats montrent dans les deux expériences, que 3 jours consécutifs de stress entraînent une diminution significative du gain de poids journalier chez les rats Wistar mâles et femelles.

En ce qui concerne la consommation alimentaire, aucune modification de la prise alimentaire totale des 24h n'a été observée. Par contre si on examine la prise alimentaire à différents

intervalles de temps (toutes les 3 heures pendant la phase nocturne), on constate, dans l'**expérience 1**, que la réduction de la prise alimentaire a lieu seulement au cours des trois premières heures après le stress. Chez les groupes témoins aucune modification n'a été notée. Chez les rats mâles, la diminution de la prise alimentaire observée pendant les trois premières heures concerne tous les trois macronutriments : protéines, lipides et glucides sont réduits de 40%, 39.8% et 29.2% respectivement ; alors que chez les femelles seule l'ingestion lipidique est significativement réduite.

Dans l'**expérience 2**, la diminution de la prise alimentaire affecte seulement la 1<sup>ère</sup> période alimentaire. Elle concerne comme dans l'expérience 1, les trois macronutriments chez les mâles tandis que seules les consommations de protéines et lipides sont réduites chez les femelles. Un rebond hyperphagique est constaté chez les femelles six heures après le stress dans l'expérience 1 et durant la seconde période alimentaire donnée 5 heures après le stress dans l'expérience 2 ; dû essentiellement à l'augmentation de la prise lipidique.

En ce qui concerne les profils hormonaux, le stress entraîne, chez les mâles aussi bien chez les femelles, une augmentation de la corticostéronémie, elle redevient normale 3 heures après. Alors que pour l'insulinémie on observe l'inverse c'est à dire une diminution et un retour à la valeur basale 3 heures après le stress.

### **Conclusion de l'étude**

Nous avons montré à partir de nos deux protocoles expérimentaux qu'un stress aigu (15 min de nage par jour pendant 3 jours consécutifs) appliqué en début de nuit, juste avant la phase active entraîne une diminution du gain de poids journalier chez les rats Wistar mâles et femelles. La prise alimentaire quotidienne n'est pas modifiée, par contre les prises alimentaires examinées à différents intervalles de temps durant la phase nocturne révèlent une dépression de la prise alimentaire durant les 3 premières heures après le stress (expérience 1) et durant le 1<sup>er</sup> épisode alimentaire (expérience 2) aussi bien chez les mâles que chez les femelles.

Chez les mâles, cette diminution de prise alimentaire concerne les trois macronutriments aussi bien dans l'expérience 1 que dans l'expérience 2 alors que chez les femelles, seule la prise lipidique est significativement réduite (expérience 1) ; les prises lipidique et protéique sont diminuées dans l'expérience 2. Un rebond hyperphagique est constaté chez les femelles 5 à 6 heures après le stress et cela ne concerne que la prise lipidique. Le stress induit aussi une modification des taux plasmatiques circulants de corticostérone et d'insulinémie.

Ces résultats démontrent que la modification du choix alimentaire en réponse au stress est différente selon les rats mâles ou femelles. Ils démontrent aussi que le stress induit, en plus d'un effet quantitatif, des effets qualitatifs sur la prise alimentaire.

L'hypothèse de Linnie et al.[226] selon laquelle les rats en restriction alimentaire mangeraient plus et par conséquent grossiraient à la suite d'un stress n'a pas été observée dans l'expérience 2. Dans nos deux protocoles expérimentaux, le stress a entraîné une diminution du gain de poids journalier. Vraisemblablement dû au choix de la souche Wistar, puisqu'il existe une variabilité génétique de la réponse au stress.

# **ARTICLE 1**

## Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats.

Abdoulaye DIANE, M.VICTORIANO, G. Fromentin, D.TOME and C.LARUE-

### ACHAGIOTIS

#### 3 Abstract

The present study investigates the effects of acute stress (15-min of swimming/day for 3 consecutive days) applied at the onset of the dark phase, just before the usual feeding time, on energy intake and more specifically on macronutrient selection, in male and female Wistar rats. The influence of stress regarding corticosterone and insulin kinetics was also examined.

In the two experiments (1: food ad lib and 2: two feeding periods/day), three consecutive days of stress reduced daily body weight gain for both sexes.

In **the first experiment**, the reduction in energy intake only occurred during the first three hours after stress. In males, the 3-h decrease in energy intake affected the three macronutrients, while in females, only the fat intake was decreased. In **the second experiment**, the stress only affected intake during the first feeding period. Protein, fat and CHO intakes were reduced in males, while in females only the protein and fat intakes were decreased. Unlike males, an increase in fat ingestion was observed in females; this occurred 6 hours after stress in experiment 1, and during the second feeding period 5 hours after stress in experiment 2. Stress raised plasma corticosterone levels in both sexes, while plasma insulin levels were decreased.

These results demonstrate that the response to stress differed in males and females regarding macronutrient selection. Moreover, stress induced not only a quantitative effect on energy intake but also a qualitative one.

**Key words:** stress, macronutrient selection, energy intake, body weight gain, corticosterone, insulin.

## **INTRODUCTION:**

Stress has been described as a state characterized by a set of nonspecific responses of the organism to factors that tend to alter an existent equilibrium. Many investigators have shown that stress suppresses energy intake and body weight gain in rats (Kenett, Chaouloff, Marcou & Curzon, 1986; Krahn, Gosnell & Majchrzak, 1990). The inhibition of energy intake and weight loss in rats exposed to stress is well established, although specific feeding effects may be modulated by the degree of stress imposed, the duration and frequency of exposure, and the time of day when stress is applied (Krahn, Gosnell & Majchrzak, 1990; Marti, Marti & Armario, 1994; Rybkin et al., 1997). The central mechanisms involved in the stress-induced inhibition of energy intake have not been fully elucidated, but certain peptides and neurotransmitters are thought to be involved in the response. It is generally accepted that corticotropin-releasing factor (CRF) is responsible for initiating and coordinating neurological, behavioural, endocrine and immunological responses to stress (Koob et al., 1993; Dunn & Berridge, 1990]. CRF levels are elevated in response to stress in many brain areas, including those involved in the regulation of feeding behaviour (Makino, Smith & Gold, 1995; Shimizu, Take, Hori & Oomura, 1992). The intracerebroventricular administration of CRF inhibits energy intake, probably by reducing expression of the orexigenic protein neuropeptide Y (NPY) in the hypothalamus (Heirichs et al, 1993). NPY is a potent stimulator of energy intake when injected via the intracerebroventricular route (Stanley, Kyrkouli, Lampert & Leibowitz, 1986).

Under conditions of stress, stimulation of the CRF system results in activation of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and a disruption of feeding behaviour. Koob et al., 1993 (Koob et al., 1993; Owens & Nemrroff, 1991) and Dallman et al. (Dallman et al., 1995) suggested that the balance between

corticosterone and insulin is a primary determinant of energy intake and nutrient utilization because the two hormones have opposite effects on feeding, when administered centrally. More extreme stressors inhibit food intake, but the effect of stress on energy intake has produced discrepant results. The majority of studies examining the effects of stress on energy intake involved the use of adult male rats which maintained a normal body weight, except for the Wang study which used females (Wang, 2002). However, some data have indicated that the degree of hypophagia induced by stress is dependent upon the energy balance status of the animal at the time of exposure to stress (Harris et al., 2000). All these studies were carried out using standard laboratory chow diets, which thus excluded the opportunity to determine whether stress inhibited the appetite for all nutrients or whether the decline in energy intake resulted specifically from the avoidance of a specific macronutrient present in a standard diet. Moreover, most of these studies measured the effects of stress on 24-h energy intake, and did not take account of the periodicity of the rat's energy intake. Rodents are nocturnal animals, and most of their physical and feeding activities occur during the dark cycle. The aim of the present study was therefore to investigate the effects of stress applied at the beginning of the nocturnal phase on the self-selection of macronutrients measured every 3-h during the night, and on corticosterone and insulin time course.

## **Material and methods**

### **Animals**

Eighty male and female, ten-week old, adult Wistar rats were studied (DEPRE, St Doulichard, France) [males: n=40, (221-226 g body weight); females: n=40, (151-154 g body weight)]. They were housed individually in stainless steel cages in a temperature-regulated room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with a 12:12h light-dark reverse cycle (lights off at 10:00 am). Water was available ad libitum in their cages. The rats were provided with separate sources of the three

macronutrients: protein, fat and carbohydrate. Experiments were performed in accordance with the principles and guidelines of the French Ministry of Agriculture concerning animal welfare.

The study was divided into three experiments. **Experiment 1:** the experimental group: 10 males and 10 females, and the control group: 10 males and 10 females, received food ad libitum. **Experiment 2:** the experimental group: 10 males and 10 females, and the control group: 10 males and 10 females, were fed during two periods each day (first feeding period of 1h, from 10:00 am to 11:00 am, and second feeding period of 2h, from 3 :00 pm to 5:00 pm. Experiment 2 was performed in order to examine the effect of stress during a shorter period of time (one hour) (Larue, 1978). Moreover, this feeding paradigm induced a permanent lower body weight which could be considered as an indicator of chronic stress. The aim was to determine whether these food-restricted rats would increase their energy intake and gain weight following the stress. It is well known that the effect of stress on energy intake is dependant upon the size of body energy stores, which would imply that the response to stress is regulated to prevent excessive tissue catabolism (Lennie, McCarty & Keeseey, 1995).

## **2- Self-selection diet:**

The self-selection diet was composed of separate sources of the three pure macronutrients. The protein component (metabolizable energy 3.9 kcal/g) was composed of 90.27% total milk proteins. The fat component (7.6 kcal/g) contained 36% lard and 54.27% soybean oil, while the carbohydrate component (3.7 kcal/g) consisted in 80.27% pregelatinized cornstarch and 10% commercial sucrose. Each macronutrient diet was supplement with 5% alpha-cellulose, 1% vitamins, 3.5% salt mixture and 0.23% choline bitartrate. The protein and carbohydrate diets were available in a powdered form while the fat diet was in a paste form. All diets were prepared in the laboratory and made up using the same ingredients.

### **3- Procedure**

In the stainless steel cages, the three diets were placed in separate food cups anchored to three of the four sides of the cage. The positioning of food cups was modified randomly in order to avoid diet selection due to position preferences. After two weeks of adaptation to the self-selection diet, body weight was recorded every day at 10:00 am at the end of diurnal period, at the time of food cup refilling. Food intakes were recorded during **experiment 1** at 10:00 am, 1:00 pm, 4:00 pm, 7:00 pm and during **experiment 2**, after each feeding period, in order to establish a baseline intake for each macronutrient. The intake was measured by subtracting the amount of food uneaten from the fixed amount provided to the rat. During each experiment and for each sex, the rats were divided into two groups, the experimental group being exposed to stress consisting of 15-min of swimming in water (37°C) each day at the onset of the dark cycle for three consecutive days (stress1, stress2, stress3), while rats in the control group remained in their cages without food and water.

#### **Experiment 3:**

At the end of these two experiments, and after 10 days of identical feeding schedules, the same rats (20 males and 20 females from experiment 1; 20 males and 20 females from experiment 2) were anaesthetized with a ketamine/xylazine mixture (0.2 ml/100g body weight) for catheter implantation. The catheter was inserted in the right lateral jugular vein for blood sampling. It was then tunneled subcutaneously so that it could be externalized and fixed to the skull using dental cement. One week after surgery, blood samples (0.3 ml) were collected from the jugular catheter vein into EDTA- TRASYLOL-coated tubes at various time points: 9:45 am was the baseline, and then stress was applied at 10:00 am (except in control groups). Thereafter, blood samples were collected at various time points (10:15 am, 11:00 am and 1:00 pm) with food being available according to the two feeding protocols. The blood

samples were centrifuged and then the plasma were aliquoted and stored at -20 °C until hormone assays. Considering the time allowed before experiment 3, it was hypothesized that there was no habituation to stress under these conditions (Harris et al., 2004).

Plasma insulin concentrations were determined using rat insulin RIA kit produced by Diasorin Insik (Antony, France). Plasma corticosterone concentrations were determined using rat corticosterone RIA kit (MP Biomedicals, NY, USA).

**4**

## **5 Statistical analysis**

Values are presented as means  $\pm$  standard errors (S.E.M). Differences in energy intake and body weight gain between control and stressed groups for each sex were tested using Student's t-test. Energy intake and body weight gain values were also compared with baseline and analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA), with stress and sex as the main factors. ANOVA for repeated measures was performed on total and separate macronutrient intakes during the experimental periods. When significant differences were detected, post-hoc comparisons of means were performed using the Tukey test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS :**

### **Experiment 1**

#### **Body weight gain (Table 1):**

At the end of baseline period, the body weight of male rats was  $301.8 \pm 5.0$  g, while in females it was  $173.6 \pm 3.0$  g. After three days of acute stress (15 min per day), daily body weight gains were significantly decreased in both sexes when compared to their own baseline and to control groups.

#### **Energy intake (Table 2)**

During the baseline period, male control rats ingested 91.2 kcal daily and male stressed rats ingested on average 95.7 kcal/day, made up of  $49.4 \pm 6.6\%$  protein,  $29.8 \pm 18.7\%$  fat and  $20.8 \pm 6.2\%$  CHO. In females, the control group ingested 59.9 kcal daily and stressed group rats ingested 51.2 kcal/day, consisting of  $24.6 \pm 2.5\%$  protein,  $69.0 \pm 3.6\%$  fat and  $6.4 \pm 2.2\%$  CHO. During the baseline period, both groups (control and stress) displayed identical energy intakes, irrespective of sex. However, there was a significant effect of sex on total energy intake ( $p < 0.001$ ): males ingested more calories than females, although when energy was expressed in kcal/100 g body weight, the values were similar: males =  $32.7 \pm 1.3$  kcal/100 g and females =  $30.6 \pm 2.2$  kcal/100 g body weight ( $p = 0.4$ , ns). As for baseline macronutrient intakes (expressed as percentages), males ingested more CHO and protein than females while the opposite was observed with respect to fat intake. These differences persisted even when the energy was expressed in kcal/100 g body weight. No significant differences in energy intakes were observed during the baseline period between the two groups (control and experimental for males and females), so that after stress, intakes were compared to their own baseline and to the control groups.

The total 24-h energy intake was not modified by stress applied at the beginning of the nocturnal period, whatever the sex. Energy intake measured at intervals during the dark cycle in both sexes showed that 15 min of stress induced a significant decrease in the total energy intake (Protein + Fat + CHO), but only during the first 3-h after the stress (44% in males and 29.5% in females;  $p < 0.01$ ). During subsequent periods, no significant differences were found regarding total energy intake, except in females between 9-24-h. (**Table 2**). **In males**, the stressed group ate less than control animals during the first 3-h, and this reduction mainly affected protein (40%) and fat (38%) intakes ( $p < 0.01$ ). Moreover, the reduction in fat ingestion varied considerably from one rat to another. In the experimental group, a very significant effect of stress was observed in seven rats (total group = 10) who preferentially

ingested fat (i.e. more than 35% calories in the form of fat); fat intake was reduced by 40% on day 1 and by 68% on days 2 and 3 ( $p < 0.05$ ). In the other three rats, fat ingestion was low (average/day =  $7.6 \pm 3.7$  kcal) and was not affected by stress. On day 1, CHO intake was not significantly reduced (29%) due to a marked inter-individual differences, but on days 2 and 3, these reductions attained statistical significance (**Fig .1**).

**In females**, energy intake was not significantly decreased during the first day of stress when compared to baseline (**Table 2**). But on the second day, stressed rats significantly reduced their energy intake during the first 3-h compared to baseline and the control group, this reduction mainly concerning the fat intake ( $p < 0.001$ ). During the two recovery days, rats failed to return to their baseline fat intake. Protein intake was not modified while the CHO intake, already low, was reduced by 11.4% although the difference was not statistically significant. But unlike what we observed in males, the energy intake was significantly enhanced during subsequent hours (9-24-h) after the stress period in females (**Table 2**). This increase was limited to fat intake which persisted during the recovery period (30%). (**Fig 2**).

### **Hormone profiles:**

The resting level of corticosterone was 1.3-fold higher in female rats than in male rats. In response to stress, plasma corticosterone values were elevated in both sexes. The plasma corticosterone peak was reached immediately after stress in females, while it appeared later in males (1 hour after stress). In control groups, corticosteronemia remained unchanged. Unlike plasma corticosterone, plasma insulin were significantly reduced in both sexes, an effect which was sustained until three hours after the stress in female rats (**Figs 5 and 6**).

### **Experiment 2:**

### **Body weight gain (Table 1):**

At the end of the habituation period, the body weight of male rats was  $244.7 \pm 8.2$  g, while in females it was  $175.0 \pm 2.2$  g. After three days of stress, daily body weight gain was significantly reduced in both sexes, while in control groups the body weight gain was not significantly modified. When compared with baseline values or controls, stress for 15 min induced a significant reduction in daily body weight gain. This reduction in body weight gain disappeared during the recovery period in both sexes.

### **Energy intake: (Table 2)**

Energy intake was measured after each feeding period. The baseline 24-h intake (1<sup>st</sup> +2<sup>nd</sup> feeding periods) was identical. In control male rats =  $55.6 \pm 7.4$  kcal; stress= $50.4 \pm 5.7$  kcal and in control female rats =  $43.3 \pm 2.5$  kcal. In males, the **first feeding** period represented 39.2% of the total energy intake, consisting of 28.6% protein, 26.2% fat and 45.2% CHO, and the second feeding period 60.8% (P=30.2%, fat=26.2%, CHO=43.6%), while in females these values were 44% (P=16.9%, fat=74.6%, CHO=8.5%), and 56% (P=28.3%, fat=64.3%, CHO=7.4%). When energy intake was expressed in kcal/100g body weight, the two groups ingested identical quantities: males =  $20.3 \pm 0.8$  kcal and females =  $24.9 \pm 1.4$  kcal (p= 0.8, ns). There was a significant effect of sex on fat and CHO intakes. Similar to experiment 1, male rats ingested more CHO than females while the opposite was found for fat intake. When compared to the baseline period, stress only induced a significant energy intake reduction during the first feeding period in both sexes (p<0.01).

**In males**, after stress, a 53% reduction in energy intake was observed during the first feeding period on the first day. Almost identical reductions on the second and third days after stress (about 30%), related to significant decreases in protein (52.7%), and CHO (30%), were observed. Fat intake was reduced by 39.6%, but this difference did not attain statistical significance: in fact, as during experiment 1, there were marked inter-individual variations, a significant reduction in fat intake (37.8%; p<0.05) being observed in rats which preferentially

ingested fat (n=7), while the others (n=3) ingested, on average,  $0.76 \pm 0.1$  kcal as fat during the first baseline feeding period (**Fig. 3**).

**In females**, a reduction in total energy intake was only observed during the first feeding period after stress (**Table 2**). The reduction was significant on days 1 (42%) and 2 (37%) of stress. This reduction significantly affected the protein and fat intakes (34% and 38%), while the CHO intake was not significantly reduced (17.2%) (**Fig. 4**). As during experiment 1, energy intake during the second feeding period (5 hours after stress) was slightly but not significantly increased. This increment was more marked on day 1 (22%) and reached about 15% on the second and third days of stress, mainly affecting fat intake (26%).

### **Hormone profiles:**

In both sexes, stress induced a significant elevation of plasma corticosterone. However, this increase was significantly higher in females than in males. As for insulinemia, both males and females significantly increased their insulin levels after stress. These values returned to baseline 180 min after stress (**Figs. 7 and 8**).

### **Discussion:**

This work once more clearly demonstrated a difference in food selection between male and female rats in response to stress. At the same age, male rats ingested more protein and carbohydrate than females while the opposite was observed with respect to fat intake. These results agree with those found by Jean et al. (Jean et al., 2002). This study also revealed not only a quantitative effect of stress on food intake but also a qualitative one. Moreover, food choice was not modified in the same way in males and females. There was no clear difference in the effect of stress between experiments 1 and 2 as regards body weigh gain and energy

intake reductions. Thus the hypothesis that rats in experiment 2, already stressed by chronic food restriction, would ingest more and gain body weight (Lennie, McCarty & Keeseey, 1995), was not confirmed by the present study.

This stress model caused a temporary suppression of energy intake and a significant reduction in body weight gain. Body weight responses during the two experiments were similar to those observed in young rats that had been stressed by immobilization for 3 hours on three consecutive days (Harris et al., 1998). The total 24-h energy intake was not modified, despite the reduction in body weight gain. This suggests that the mechanisms responsible for this reduction in stressed rats are not solely dependent on a reduction in energy intake. Under the two experimental conditions, the reduction in energy intake occurred during the first hours after stress, whatever the sex. These results are consistent with those reported by Krahn et al. (Krahn et al., 1986) and Rybkin et al. (Rybkin et al., 1997), who showed that the energy intake depression of rats exposed to stress at the end of the light period only occurred during the first 2h of the dark cycle.

During the two experiments, our results show that the two groups of rats did not respond identically in terms of reductions in macronutrient intake after stress. Furthermore, within the same experiment, the two sexes responded differently. Both groups of rats (males and females) reduced their energy intake during the first 3-h after stress, but in females a rebound of fat ingestion was observed, probably to compensate for the hypophagia immediately following stress. **In male rats**, the reduction in intakes concerned the three macronutrients, while **in females** only the protein and fat intakes were reduced. This last finding was in close agreement with that of Wang (Wang, 2002) who did not observe any reduction in CHO intake in female rats after an acute stress.

In the present study, carbohydrate intake was less sensitive to the effect of stress, perhaps because of the very low intake of this nutrient in females. Together with this low CHO intake,

there was a high consumption of protein in this group. The ingestion of food with a high protein content enhances the peripheral tissue use of amino acids with the exception of tryptophan; the amount of tryptophan available for transport across the blood brain barrier thus increases and facilitates 5-HT synthesis (Turner et al., 1991; Brewerton, 1995). As a result of this mechanism, protein ingestion directly potentiates 5-HT synthesis and CRF in the brain and may explain the inhibition of energy intake. Modulations of neurotransmitter concentrations during stress have been extensively investigated. Both CRF and 5-HT inhibit energy intake when infused centrally (Spina et al., 1996; Leibowitz et al., 1993). It has also been observed that ICV CRF reduces hoarding behaviour in male rats by achieving a negative balance, influencing the set-point for body weight regulation (Cabanac&Richard, 1994). Moreover, it has been also demonstrated that the reduction in energy intake that immediately follows a stress period can partially be prevented by the CRF receptor antagonist  $\alpha$ -helical CRF (Krahn et al., 1986). Activation of the CRF system by stress also results in increased peripheral corticosterone levels (Koob et al., 1993). In the present study, measurements of plasma corticosterone levels at different times after the stress endorsed this role. During our experiments, stress was applied at the onset of the dark period. It is well known that in normal rats fed ad-lib, peak circulating corticosterone levels are attained at the beginning of the dark phase, declining slowly thereafter (Marissal-Arvy et al., ). Thus the high corticosterone values measured during the two experiments were related to a stress effect.

In females, plasma corticosterone levels were elevated immediately after stress and returned to baseline three hours later, which was consistent with previous reports [(Harris et al., 2004; Armario et al., 1985; Natelson et al., 1987). The different peak corticosterone values in male and female rats after stress were probably due to the greater vulnerability to stress of females, reported by numerous studies (Haleem, Kennett & Curson, 1988; Kant et al., 1983; Yoshimura et al., 2003), and to a difference in sex hormones (principally estradiol which

influences the hypothalamic-pituitary axis (HPA) function (Norman et al., 1992; Xiao et al., 1994). In normal rats, plasma insulin levels after a feeding episode are high (Strubbe, Steffens & Ruiter, 1997); thus, the lower plasma insulin levels observed in rats after stress [consistent with previously published results; (Michel et al., 2005)], could be explained by the balance of these two hormones as a primary determinant of energy intake and nutrient utilization. Insulin release is probably inhibited by the direct action of corticosterone on pancreatic beta cells promoting non-insulin-dependent nutrient utilization, but the mechanism remains unclear, and further experiments are necessary to confirm this hypothesis. However, the two hormones exert opposite effects on feeding when administered centrally, and on nutrient partitioning in the periphery (Dallman et al., 1995). The anabolic effect of insulin was altered by the high serum corticosterone levels induced by stress. In addition to promoting the release of corticosterone, stress, and its activation of the HPA axis, promotes the release of inflammatory cytokines (Zhou et al., 1996) and prolactin (Armario, Gavalda & Marti, 1995) and suppresses the release of growth hormone (Marti & Gavalda, 1993), all of which have also been shown to influence feeding and body weight gain. Therefore, the effects of stress on energy balance and body weight gain probably involve interactions between numerous systems.

## References

- Armario A, Gavaldà A, Martí J. (1995). Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology*, 20, 879-890.
- Armario A, Restrepo C, Castellanos JM, Belasch J. (1985). Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Science* ; 36, 2085-2092
- Brewerton TD. (1995). Toward a unified theory of serotonin dysregulation in eating and related disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 20, 561-590
- Cabanac M, Richard D. (1994). Acute Intraventricular CRF lowers the hoarding threshold in male rats. *Physiology & Behavior*, 57, 705-710.
- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Sebatian RJ. (1995). The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. *Annals New York Acad. Science*, 771, 730-742.
- Dunn AJ, Berridge C.W. (1990). Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Research Review*, 15, 71-100.
- Haleem DJ, Kennett G, Curzon G. (1988). Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis. *Brain Research*, 458, 339-347.
- Harris RB, Gu H, Michell TD, Endale L, Russo M, Ryan D. (2004). Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. *Physiology & Behavior*, 81, 557-568.
- Harris RBS, Zhou J, Youngblood B D, Rybkin II, Smagin GN, Ryan DH. (1998). Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat

- diets. *American Journal of Physiology - Regulatory Comparative Physiology*, 275, 1928-1938.
- Harris RBS, Howell LA, Mitchell TD, Youngblood BD, York DA, Ryan DH. (2000). Stress and macronutrient selection. in : Berthoud HR, Seeley RS. *Neural and metabolic control of macronutrient intake : Psychology*. CRC Press LLC; 473-483.
- Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GF. (1993). Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuro peptide Y. *Brain Research*, 611, 18-24
- Jean C, Fromentin G, Tome D, Larue-Achagiotis C. (2002). Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high-protein, high-lipid diet. *Physiology & Behavior*, 76, 65-73.
- Kant GJ, Lenox RH, Bunnell BN, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL. (1983). Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology*, 8, 421-428.
- Kennett GA, Chaouloff F, Marcou M, Curzon G. (1986). Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the possible role of serotonin. *Brain Research*, 382, 416-421.
- Koob GF, Heinrichs S.C, Pich E M, Menzaghi F, Baldwin H, Miczek K, Britton K T. (1993). The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. *Ciba Foundation Symposium*, 172, 277-289.
- Krahn DD, Gosnell BA, Grace M, Levine AS. (1986). CRF antagonist partially reverses CRF and stress-induced effects on feeding. *Journal of Nutrition*, 116, 2067-2077.
- Krahn DD, Gosnell B.A, Majchrzak MJ. (1990). The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures. *Biological Psychiatry*, 27,1094 -1102.

- Larue Christiane. (1978). Oral cues involved in the rat's selective intake of fats. *Chemical Senses and Flavour*, 3, 1-6.
- Leibowitz SF, Alexander JT, Cheung WK, Weiss GF. (1993). Effects of serotonin and the serotonin blocker metergoline on meal patterns and macronutrient selection. *Pharmacology Biochemical & Behavior*, 45, 185-194
- Lennie TA, McCarty DO, Keeseey RE. (1995). Body energy status and the metabolic response to acute inflammation. *American Journal of Physiology*, 269, R1024-R1031.
- Makino S, Smith MA., Gold PW. (1995). Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology*, 136, 3299-3309.
- Marissal-Arvy N, Gaumont A, Langlois A, Dabertrand F, Bouchecareich M, Tridon C, Mormède P. Different nutritional responses to corticosterone chronic treatments between Fischer 344, obesity-resistant Lou/C and Lewis rats. (Submit)
- Marti O, Gavalda A, J. (1993). Effect of regularity of exposure to chronic immobilization stress on the circadian pattern of pituitary adrenal hormones, growth hormone, and thyroid stimulating hormone in the adult male rat. *Psychoneuroendocrinology*, 18, 67-77.
- Marti O, Marti J, Armario A. (1994). Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology & Behavior*, 55, 747-753.
- Michel C, Duclos M., Cabanac M, Richard D. (2005). Chronic stress reduces body fat content in both obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Hormones and Behavior*; 2, 172-179.
- Natelson BH, Creighton D, McCarty R, Tapp WN, Pitman D, Ottenweller JE. (1987). Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiology & Behavior*, 39, 117-125.

- Norman RL, Smith CJ, Pappas JD, Hall J. (1992). Exposure to ovarian steroids elicits a female pattern of plasma cortisol levels in castrated male macaques. *Steroids*, 57, 37-43.
- Owens MJ, Nemeroff CB. (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacological Review*, 43, 425-473
- Rybkin II, Zhou Y, Volaufova J, Smagin G N, Ryan D H, Harris R B S. (1997). Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *American Journal of Physiology*, 273, R1612-R1622.
- Shimizu N, Take S, Hori t, Oomura Y. (1992). In vivo measurement of hypothalamic serotonin release by intracerebral microdialysis: significant enhancement by immobilization stress in rats. *Brain Research Bulletin*, 28, 727-734.
- Spina M, Merlo-Pich E, Chan RB, Basso AM, Rivier J, Vale W, Koob GF. (1996). Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science*, 273, 1561-1564
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*, 7, 1189-1192.
- Strubbe J. H, A. B. Steffens, L. De Ruiter. (1977). Plasma insulin and the time pattern of feeding in the rat. *Physiology & Behavior*, 18, 81-86.
- Turner MS, Foggo M, Bennie J, Carroll S, Dick H, Goodwin GMI. (1991). Psychological, hormonal and biochemical changes following carbohydrate bingeing: a placebo controlled study in bulimia nervosa and matched controls. *Psychological Medicine.*; 21, 123-33.
- Wang SWJ. (2002). Effects of restraint stress and serotonin on macronutrient selection: a rat model of stress-induced anorexia. *Eating Weight Disorders*, 7, 23-31.

Xiao E, Xia L, Shanen D, Khabele D, Ferin M. (1994). Stimulatory effects of interleukin-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis on gonadotropin secretion in ovariectomized monkeys replaced with estradiol. *Endocrinology*, 135, 2093-2098.

Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto R. (2003). Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*, 68, 439-445.

Zhou D, Shanks N, Riechman SE, Liang R, Kusnecov AW, Rabin BS. (1996). Interleukin 6 modulates interleukin-1-and stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats. *Neuroendocrinology*, 63, 227-236.

## Tables and Figures

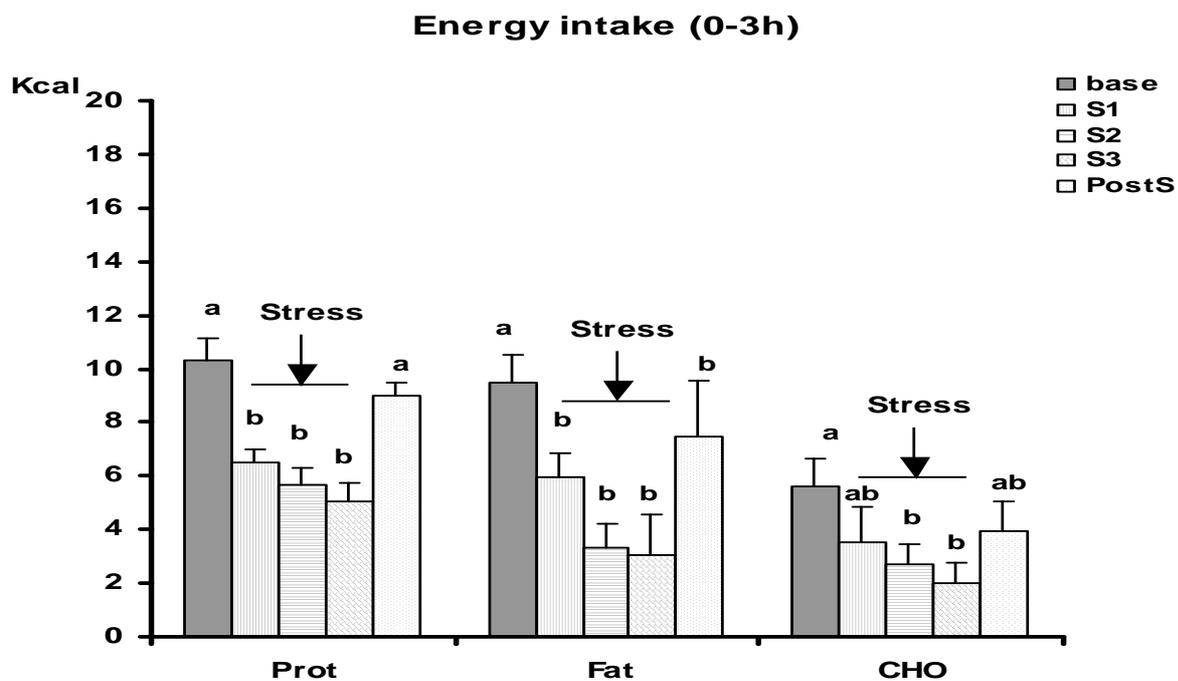
<b>Experiment 1</b>		Base (g)	Stress (g)
<b>Males</b>	<i>Stress</i>	5.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.4 <sup>b</sup>
	<i>Control</i>	4.8 ± 0.5	5.2 ± 0.8 <sup>*</sup>
<b>Females</b>	<i>Stress</i>	2.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>b</sup>
	<i>Control</i>	2.6 ± 0.4	2.8 ± 0.4 <sup>*</sup>
<b>Experiment 2</b>			
<b>Males</b>	<i>Stress</i>	3.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.5 <sup>b</sup>
	<i>Control</i>	2.6 ± 0.6	3.1 ± 0.5 <sup>*</sup>
<b>Females</b>	<i>Stress</i>	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>
	<i>Control</i>	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.5 <sup>*</sup>

**Table 1:** Effect of stress on body weight gain in male and female rats in the two experiments. Data are expressed in means ± SEM. Superscripts (a-b) within the same line, indicate difference in body weight gain when compared to the baseline period (p<0.01). \* indicates difference between stressed and control rats.

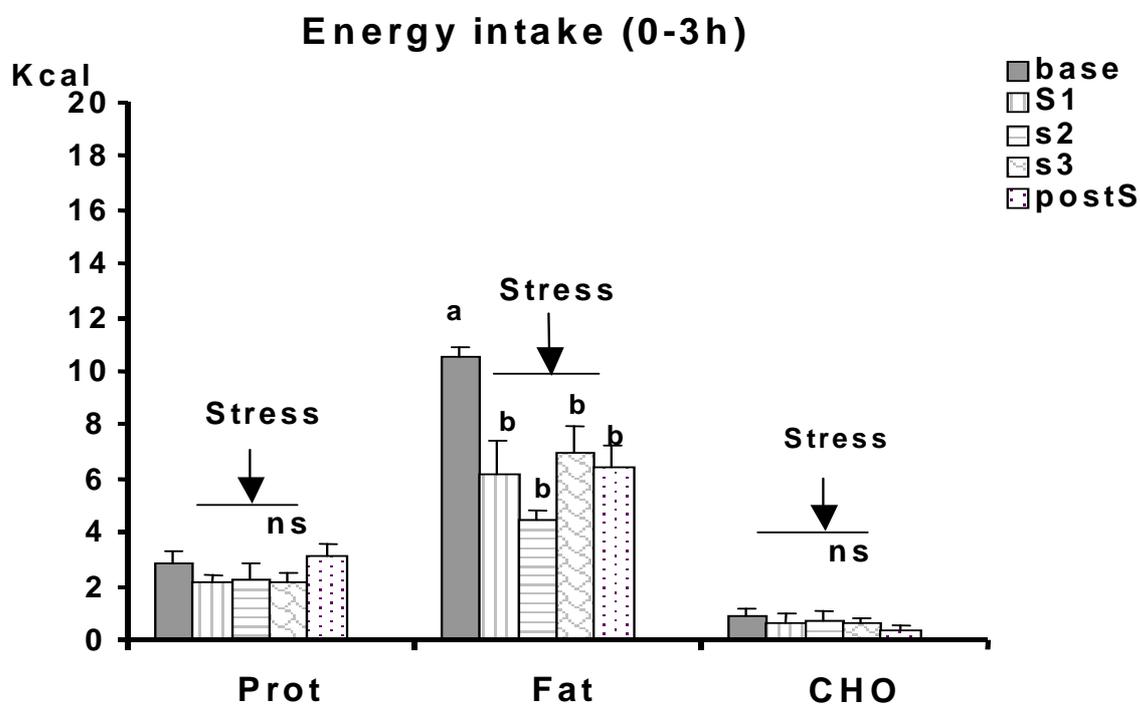
## A- Experiment 1

Males ad lib						
Kcal		Base	Stress1	Stress2	Stress3	Post-Stress
<b>0-3h</b>	Stress	25.4 ± 8.4 <sup>a</sup>	17.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	13.6 ± 4.2 <sup>b</sup>	11.7 ± 5.7 <sup>b</sup>	17.8 ± 5.9 <sup>ab</sup>
	control	23.6 ± 3.4	21.8 ± 1.5	18.3 ± 1.1	19.1 ± 1.8	18.6 ± 1.5
<b>3-6h</b>	Stress	23.9 ± 5.7	25.6 ± 6.1	25.3 ± 7.1	24.7 ± 8.5	21.1 ± 4.7
	Control	20.4 ± 2.9	22.3 ± 3.1	18.8 ± 2.5	23.3 ± 1.3	18.2 ± 1.7
<b>6-9h</b>	Stress	19.7 ± 4.9	17.1 ± 5.2	15.9 ± 5.2	17.8 ± 5.7	20.8 ± 3.3
	Control	16.2 ± 2.7	18.2 ± 3.4	19.6 ± 2.5	16.9 ± 3.6	19.4 ± 4.2
<b>9-24h</b>	Stress	26.7 ± 4.1	34.5 ± 6.3	31.4 ± 9.6	29.9 ± 7.3	29.9 ± 7.3
	Control	31.1 ± 6.4	35.4 ± 4.5	32.8 ± 3.6	26.4 ± 5.1	35.4 ± 3.7
<b>Total 24h</b>	Stress	95.7 ± 9.0	94.6 ± 11.7	86.2 ± 10.6	84.2 ± 11.6	89.7 ± 12.6
	Control	91.2 ± 11.9	97.7 ± 6.4	89.6 ± 5.2	88.5 ± 5.1	91.6 ± 2.8
Females ad lib						
<b>0-3h</b>	Stress	14.9 ± 1.8 <sup>a</sup>	8.8 ± 1.2 <sup>ab</sup>	7.5 ± 1.0 <sup>b</sup>	9.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	11.6 ± 1.2 <sup>ab</sup>
	control	16.7 ± 2.6	18.7 ± 2.2 <sup>*</sup>	15.4 ± 2.1 <sup>*</sup>	16.5 ± 2.4 <sup>*</sup>	15.4 ± 1.6
<b>3-6h</b>	Stress	12.9 ± 1.6	13.2 ± 1.4	16.0 ± 1.2	10.2 ± 1.0	10.2 ± 1.2
	Control	14.2 ± 1.9	11.1 ± 2.2	14.2 ± 1.3	13.2 ± 2.2	15.3 ± 2.7
<b>6-9h</b>	Stress	9.6 ± 1.4	10.9 ± 0.7	10.4 ± 2.0	12.8 ± 1.2	10.1 ± 1.6
	Control	12.5 ± 2.3	13.3 ± 1.5	12.5 ± 3.1	15.8 ± 2.3	14.2 ± 1.8
<b>9-24h</b>	Stress	15.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	15.4 ± 1.4 <sup>a</sup>	26.4 ± 1.4 <sup>b</sup>	21.1 ± 1.6 <sup>b</sup>	22.1 ± 1.6 <sup>b</sup>
	Control	16.5 ± 1.8	16.2 ± 2.4	19.4 ± 1.7	17.2 ± 2.5	16.5 ± 2.4
<b>Total 24h</b>	Stress	53.0 ± 4.3	52.3 ± 2.6	60.4 ± 3.1	53.7 ± 2.0	54.0 ± 2.4
	Control	59.9 ± 5.8	59.3 ± 3.5	61.5 ± 4.7	62.7 ± 5.2	61.3 ± 3.9

**Table 2** : Energy intake measured at several time points in male and female rats. Data are means ± SEM. Superscripts (a-b) within the same line, indicate difference in energy intake when compared to the baseline period (p<0.01). \* indicates difference between stress and control during the same period.



**Fig. 1 :** Males' macronutrient intakes during the 3 first hours after stress . Data are means  $\pm$  SEM. Bars labelled with different letters within the same macronutrient are statistically different ( $p < 0.01$ )

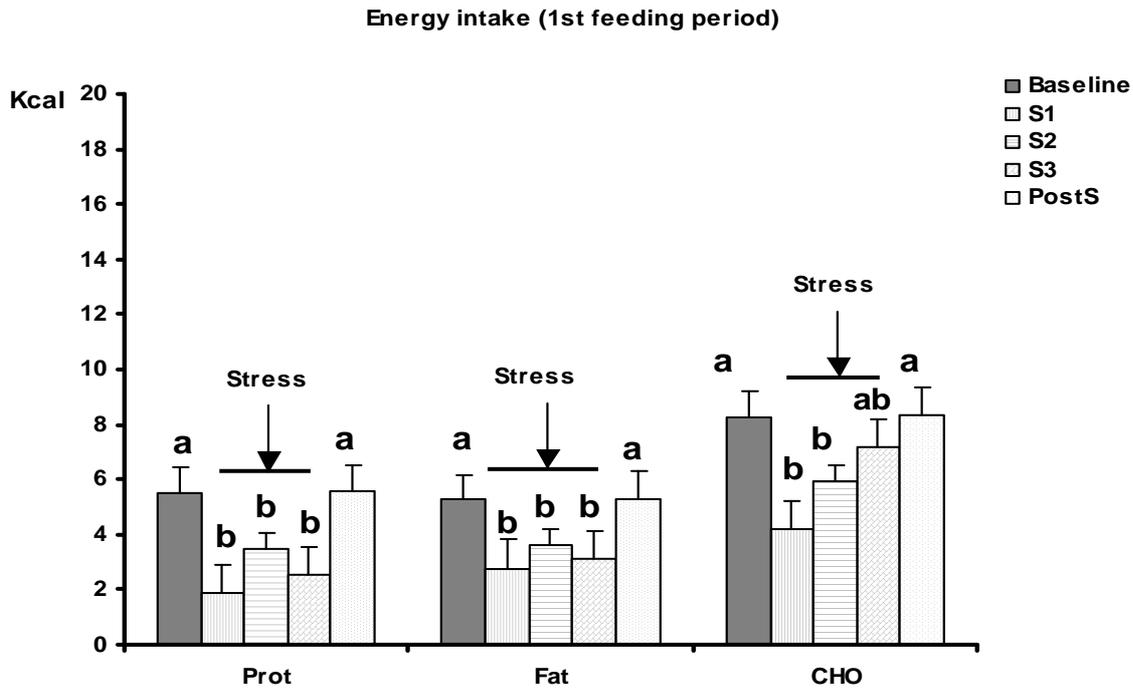


**Fig. 2 :** Females' macronutrient intakes after stress. Data are means  $\pm$  SEM. Bars labelled with different letters within the same macronutrient are statistically different ( $p < 0.01$ ).

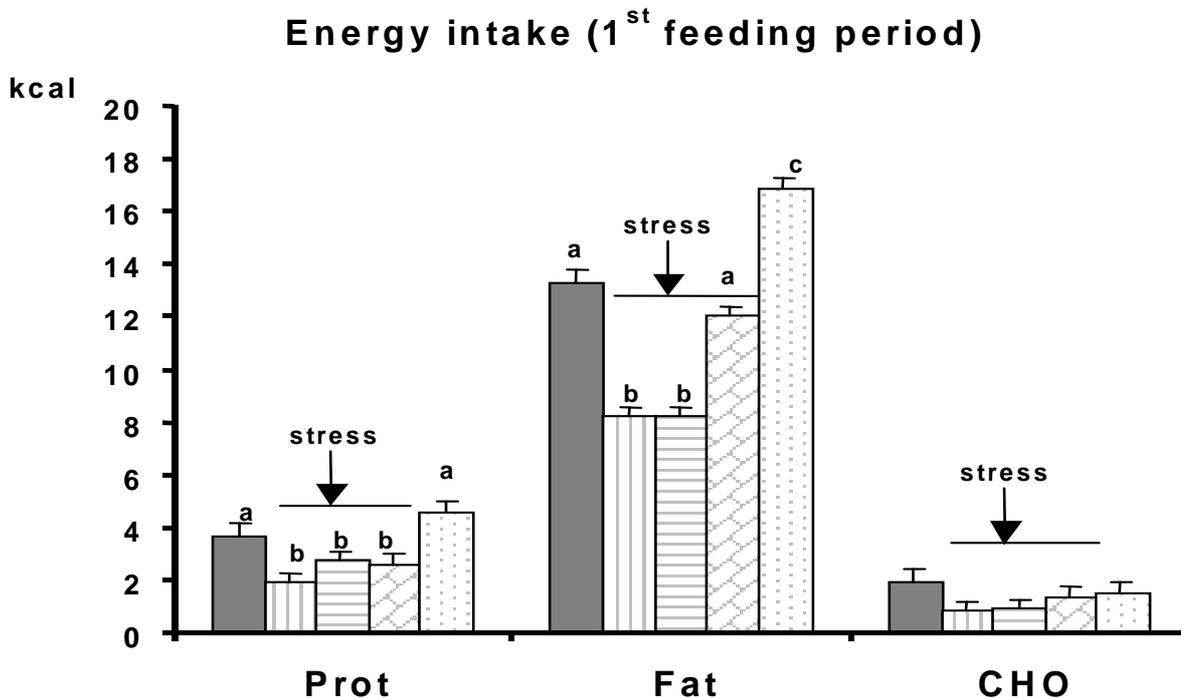
## B- EXPERIMENT 2

Males						
Kcal		Base	Stress1	Stress2	Stress3	Post-Stress
<b>1<sup>st</sup> feeding period</b>	<i>Stress</i>	19.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	8.8 ± 2.3 <sup>b</sup>	12.1 ± 1.4 <sup>b</sup>	12.9 ± 1.6 <sup>b</sup>	19.1 ± 3.0 <sup>a</sup>
	<i>Control</i>	22.2 ± 4.1	24.5 ± 3.8 <sup>*</sup>	21.1 ± 1.2 <sup>*</sup>	23.5 ± 2.6 <sup>*</sup>	21.4 ± 0.9
<b>2<sup>nd</sup> feeding period</b>	<i>Stress</i>	31.3 ± 4.2	33.1 ± 5.7	32.8 ± 4.1	34.2 ± 4.5	33.0 ± 2.2
	<i>Control</i>	33.5 ± 3.5	30.2 ± 3.4	32.1 ± 1.2	31.4 ± 3.6	28.7 ± 2.7
<b>Total</b>	<i>Stress</i>	50.4 ± 5.7	41.9 ± 7.9 <sup>*</sup>	44.9 ± 5.5 <sup>*</sup>	47.1 ± 5.8	52.1 ± 4.4
	<i>Control</i>	55.6 ± 7.4	54.8 ± 4.3	53.2 ± 4.1	54.9 ± 4.5	50.1 ± 3.4
Females						
<b>1<sup>st</sup> feeding period</b>	<i>Stress</i>	18.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	10.9 ± 1.2 <sup>b</sup>	11.8 ± 1.5 <sup>b</sup>	15.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	23.0 ± 1.5 <sup>a</sup>
	<i>Control</i>	21.1 ± 1.3	24.8 ± 2.1 <sup>*</sup>	23.8 ± 1.8 <sup>*</sup>	25.4 ± 3.9 <sup>*</sup>	23.9 ± 5.2
<b>2<sup>nd</sup> feeding period</b>	<i>Stress</i>	24.5 ± 1.9 <sup>a</sup>	31.5 ± 2.5 <sup>b</sup>	29.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	27.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	23.3 ± 1.5 <sup>a</sup>
	<i>Control</i>	25.9 ± 5.8	23.3 ± 2.3 <sup>*</sup>	22.2 ± 6.1	23.0 ± 4.3	24.8 ± 2.9
<b>Total</b>	<i>Stress</i>	43.3 ± 2.5	42.5 ± 2.4	41.3 ± 2.0	43.5 ± 2.5	46.3 ± 1.9
	<i>Control</i>	47.1 ± 6.1	48.1 ± 3.8	46.1 ± 6.3	48.4 ± 6.6	48.2 ± 6.7

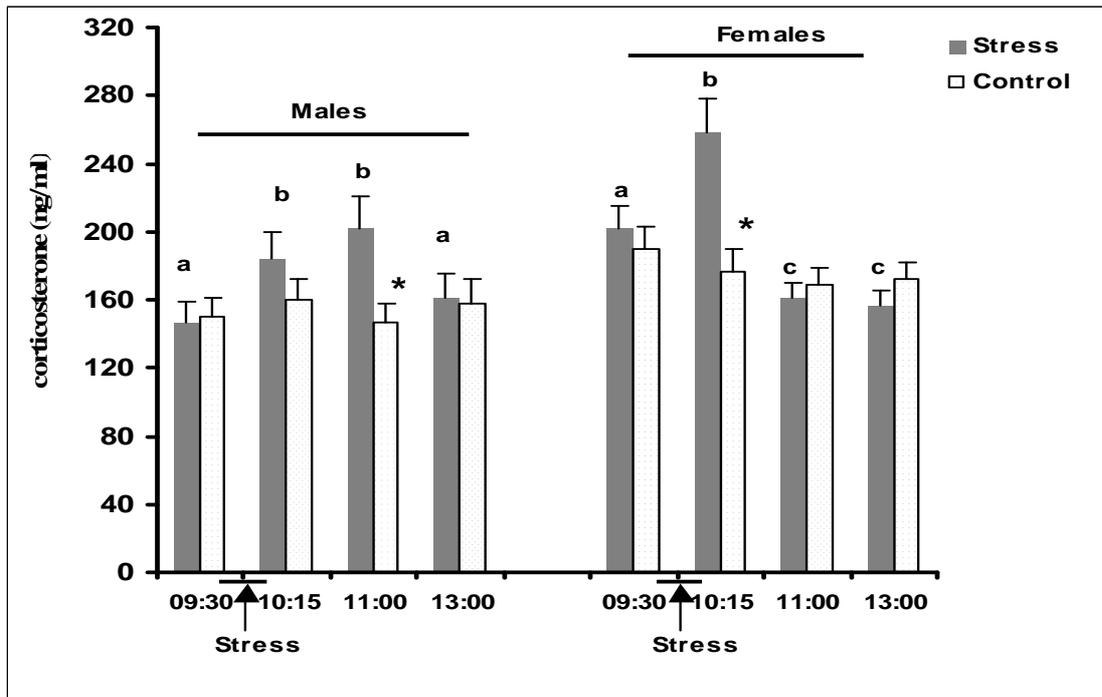
**Table 3:** Total energy intake in male and female rats during the first and second feeding periods. Superscripts (a-b) within the same line, indicate a difference in energy intake when compared to the baseline period (p<0.01). \* indicates difference between stressed and control rats during the same period.



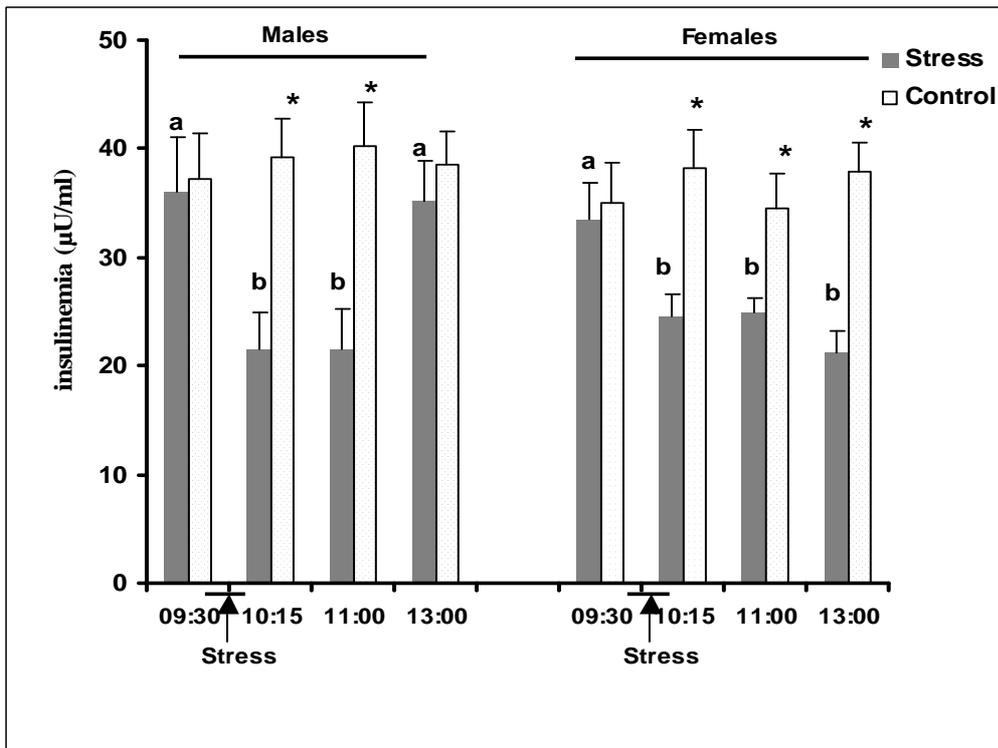
**Fig. 3 :** Males' macronutrient intakes during the first feeding period. Data are means  $\pm$  SEM. Bars labelled with different letters within the same macronutrient are statistically different ( $p < 0.01$ ).



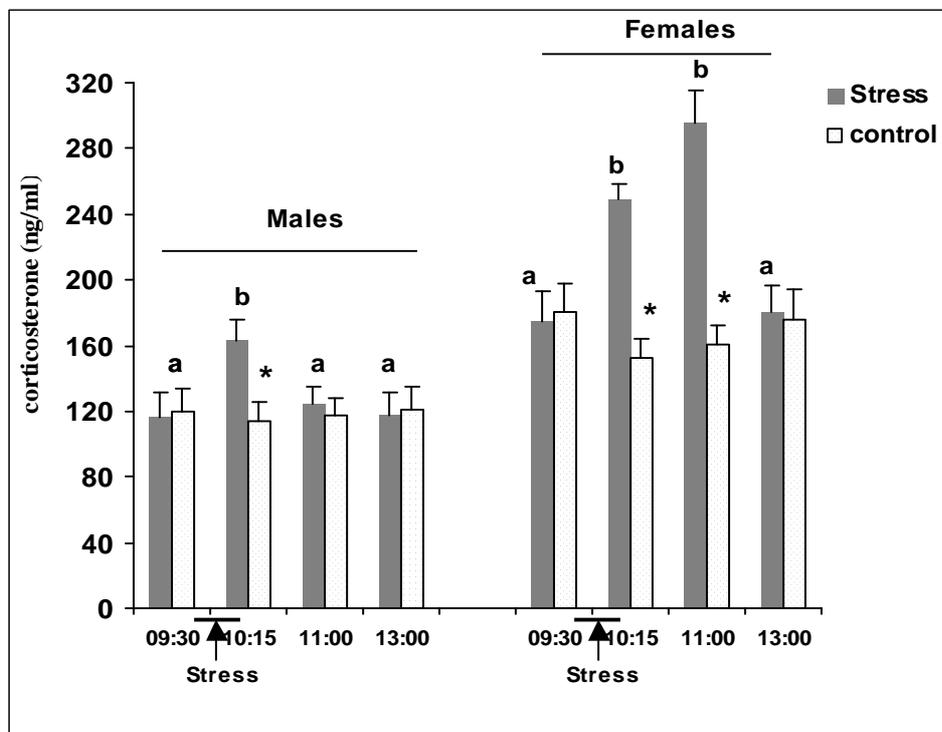
**Fig. 4 :** Females' macronutrient intakes during the first feeding periods. Data are means  $\pm$  SEM. Bars labelled with different letters within the same macronutrient, are statistically different ( $p < 0.01$ ).



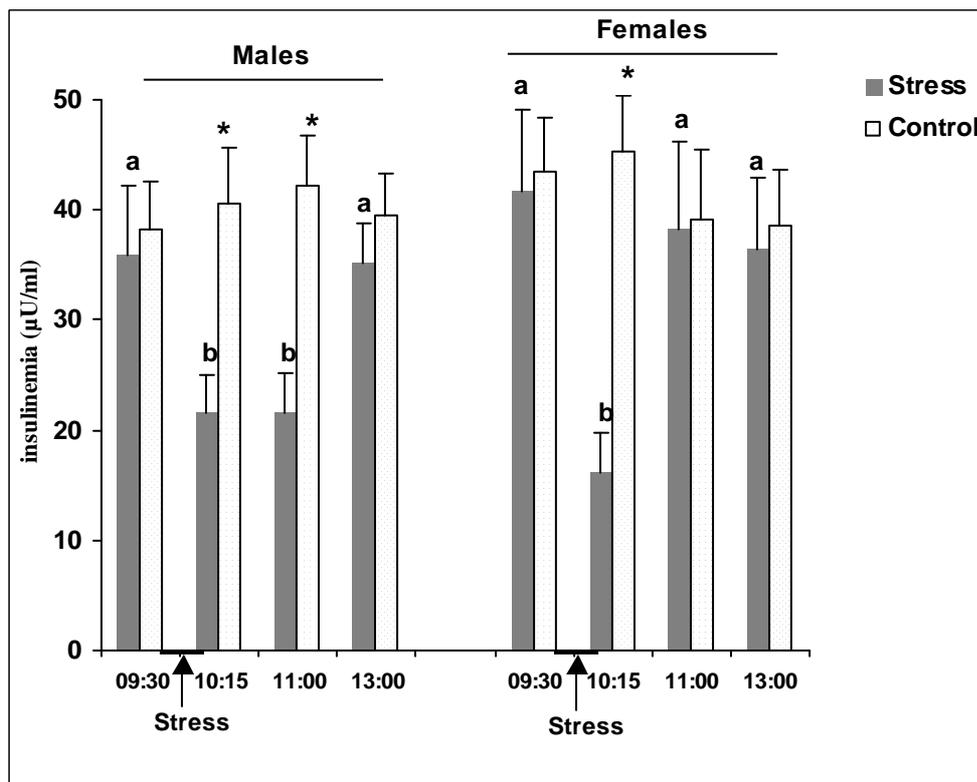
**Fig. 5 :** Corticosteronemia in male and female rats (**experiment 1**). Data are means  $\pm$  SEM. Bars labelled with different letters within the same sex, are statistically different ( $p < 0.05$ ). \* indicates difference between stress and control groups during the same period.



**Fig. 6 :** Insulinemia in male and female rats (**experiment 1**). Data are means  $\pm$  SEM. Bars labelled with different letters within the same sex, are statistically different ( $p < 0.05$ ). \* indicate difference between stressed and control rats ( $p < 0.05$ ) during the same period.



**Fig. 7** : Corticosteronemia in male and female rats(**experiment 2**). Data are means  $\pm$  SEM. Bars labelled with different letters within the same sex, are statistically different ( $p < 0.05$ ). \* indicate difference between stressed and control rats ( $p < 0.05$ ) during the same period.



**Fig. 8** : insulinemia in male and female rats( **experiment 2**). Data are means  $\pm$  SEM. Bars labelled with different letters within the same sex, are statistically different ( $p < 0.05$ ). \* indicates difference between stressed and control rats ( $p < 0.05$ ) during the same period.

**Etude 2 : Variabilité génétique de l'axe corticotrope et régulation  
du métabolisme énergétique.**

L'activation de l'axe corticotrope sous l'effet du stress provoque la libération de glucocorticoïdes. On évoque une perturbation de l'axe corticotrope modifiant ainsi la régulation du bilan énergétique et des « centres » de contrôle de la prise alimentaire. L'importance d'un excès de glucocorticoïdes dans le syndrome d'obésité a fait l'objet de nombreuses études : chez les patients schizophrènes l'obésité centrale est fréquente et est associée à des niveaux plus élevés de cortisol plasmatique [227]. De même la dépression est souvent associée à une obésité viscérale et à une hypercortisolémie [228]. Il existe également, chez l'homme, une réponse hypothalamo-corticotrope accrue associée à l'obésité centrale [229]. La conclusion qui ressort de ces études est que l'hyperactivité de l'axe corticotrope se traduit par une augmentation de la production de cortisol, mais du fait d'une augmentation de sa clearance son taux plasmatique reste souvent normal [230]. Ceci suggère qu'il existe une sensibilité de certains tissus cibles aux glucocorticoïdes. Puisque dans de nombreux cas d'obésité, particulièrement l'obésité de type central (abdominale) on note une augmentation locale omentale de l'activité de la 11 $\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénase [231]. Celle-ci accroît la production de cortisol ce qui aboutit à une production locale de corticoïdes actifs susceptibles de stimuler la différenciation des préadipocytes en adipocytes et d'augmenter leur taille.

Ainsi les relations entre poids et stress sont complexes. L'activation de l'axe corticotrope sous l'effet du stress joue un rôle important du fait sans doute d'une susceptibilité individuelle génétiquement conditionnée, liée à l'activité de 11- $\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénase et pouvant favoriser l'obésité [232]. En effet les animaux génétiquement prédisposés à l'obésité sont caractérisés par un taux plasmatique élevé de corticostérone lié à une hyperactivité de leur axe corticotrope comparés aux animaux maigres. Les souches consanguines de rats sont d'excellents modèles pour la compréhension des différences d'origine génétique de l'activité et de la réactivité de l'axe corticotrope en relation avec l'obésité : d'où l'objectif de cette partie.

## **But et objectifs**

Les travaux présentés dans cette partie, en collaboration avec le laboratoire de neurogénétique et stress INRA de Bordeaux, ont pour objectif de caractériser les différences neuroendocriniennes, nutritionnelles et métaboliques résultantes du fonctionnement de l'axe corticotrope entre les souches de rats Lou et Fischer F344 en relation avec ses implications dans une pathologie métabolique : l'obésité.

## **Les particularités nutritionnelles et métaboliques du rat Lou :**

Le rat Lou d'origine Wistar est une souche consanguine apparue en 1970 à l'université de Louvain en Belgique. Utilisé au départ comme modèle en cancérologie (plasmocystomes spontanés) et producteur d'anticorps monoclonaux, le rat Lou s'est ensuite distingué pour ses particularités nutritionnelles et métaboliques. Les données disponibles démontrent une évolution des préférences alimentaires avec l'âge (augmentation de la fraction lipidique aux dépens des glucides), de faibles quantités alimentaires ingérées ainsi qu'une efficacité de la régulation du poids corporel [233].

Sur le plan nutritionnel, la comparaison avec des rats Wistar soumis à un régime restrictif pour assurer le même apport énergétique dans la ration montre que les rats Lou sont plus maigres à ingestion alimentaire égale, avec un rapport protéines/lipides plus faible [234]. Ces résultats suggèrent l'existence d'adaptations métaboliques spécifiques chez cette souche. L'efficacité de régulation de la composition corporelle est associée à des particularités métaboliques et anatomiques (glycémie basale et poids des surrénales plus faibles chez le rat Lou) comparables à celles observées chez les rats soumis à un régime restrictif ; or chez le rat Lou ces adaptations sont physiologiques. Etant donné le rôle des corticostéroïdes dans la régulation de l'équilibre énergétique, et notamment dans le métabolisme lipidique et le comportement alimentaire, il est intéressant d'explorer les particularités de l'axe corticotrope des rats Lou. Au vu de ces données, le rat Lou constitue un modèle intéressant pour l'étude des facteurs responsables d'une régulation efficace du poids corporel en relation avec l'activité/réactivité de l'axe corticotrope.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi pour la comparaison avec le rat Lou, le rat Fischer 344 (F344), souche consanguine, ayant une tendance à l'obésité et résistant à l'insuline.

Les comparaisons neuroendocriniennes, nutritionnelles et métaboliques entre les souches Lou et Fischer F344 font l'objet de cette 1<sup>ère</sup> partie, afin de retenir les traits discriminants pour le

phénotypage. L'exploration de l'axe corticotrope notamment l'activité et la réactivité ainsi que l'efficacité des récepteurs aux corticostéroïdes seront aussi examinés.

La première étape : elle a été effectuée au laboratoire de neurogénétique de stress de Bordeaux pour l'exploration de l'axe corticotrope. La 2<sup>ème</sup> étape : étude du comportement alimentaire, de la composition corporelle post mortem et des profils métaboliques s'est déroulée au sein de notre laboratoire.

## **A. ETUDE FONCTIONNELLES DES SYSTEME NEUROENDOCRINIENS**

### **1 Matériel et Méthodes :**

#### **1.1. Animaux :**

L'étude concerne des rats Lou (Harlan France) et F344 (Iffa Credo France) âgés de 12 semaines (n= 32 : Lou : 8 mâles + 8 femelles ; et F344 : 8 mâles + 8 femelles). Les animaux sont hébergés par cage de deux, dans des conditions standards (température  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , cycle normal lumière-obscurité 12h :12h avec début de nuit à 19h). Ils ont libre accès à l'aliment standard et à l'eau. Après deux semaines d'habituation, les animaux sont soumis à différentes séries d'études (un lot composé de rats Lou et F344 mâles et femelles, par étude).

#### **1.2. Activité et réactivité de l'axe corticotrope :**

##### **1.2.1 Corticostéronémie basale sur 24h :**

L'extrémité de la queue des rats étant préalable coupée, du sang est prélevé toutes les 6 heures (00 :00, 06 :00, 12 :00, 18 :00h) sans que l'animal ne soit perturbé.

##### **1.2.2 Corticostéronémie après le stress :**

Ici les animaux sont soumis à un stress de contention pendant 20mn. Pour cela les rats sont enfermés dans un sac plastique conique percé à l'extrémité et fermé avec un ruban adhésif ce qui facilite l'accès à la queue. Le sang est prélevé à la queue avant le stress, 30 min, et 1h après le stress (T0, T0+50, T0+80).

Dans ces cas, le sang est recueilli dans des tubes eppendorf contenant de l' EDTA 10% puis centrifugé à  $4^\circ\text{C}$  à 3500g pendant 20min. 10 $\mu\text{l}$  de plasma est aliquoté pour chaque prélèvement puis congelé à  $-80^\circ\text{C}$  en vue du dosage de corticostérone.

Le corticostérone est dosé par RIA à partir d'un kit Linco (voir annexe).

#### **1.3. Efficacité des récepteurs aux corticostéroïdes (GR et MR)**

L'efficacité d'un récepteur réside dans sa capacité à produire un effet lorsqu'il est soumis à un ligand à dose fixe. Pour chercher à démontrer une variation d'efficacité d'un récepteur entre

nos deux souches Lou et F344, on administre la même dose d'un ligand spécifique et on mesure l'amplitude de l'effet produit par ce récepteur.

### **1.3.1 Efficacité GR**

Ce protocole consiste à faire une injection sous-cutanée de dexaméthasone aux deux souches de rats et à effectuer des prélèvements de sang à différents moments au cours du cycle nycthéral. La dose utilisée est de 5µg/100g de poids corporel, dose jugée suffisamment forte pour induire une action inhibitrice sur l'axe corticotrope (les GR sont activés par une forte dose de corticoïdes). L'efficacité des GR entre ces deux souches est mesurée au niveau central et périphérique par :

#### **1.3.1.1 Rétrocontrôle négatif :**

Une forte dose de corticoïdes inhibe au niveau central la sécrétion de CRF et d'ACTH ce qui entraîne une diminution de la sécrétion de corticostérone chez le rat au niveau des glandes surrénales. Le rétrocontrôle négatif se manifeste par une diminution de la corticostéronémie après administration de dexaméthasone.

##### **1.3.1.1.1 La glycémie**

Un dosage de glycémie est effectué afin d'examiner les différences de variations pendant 90 minutes entre les deux souches après injection d'insuline induisant une hypoglycémie par augmentation du transport membranaire et donc de l'utilisation du glucose. Pour cela une dose d'insuline est injectée aux rats et du sang est prélevé à la queue avant, 30min et 90min après et la glycémie est mesurée avec un glucomètre.

##### **1.3.1.1.2 Numération-Formule sanguine.**

Il s'agit de la modification de la numération-formule sanguine induite par une action des corticoïdes sur les GR présents dans toutes les cellules du système immunitaire. Pour cela, chez les deux souches de rats, des échantillons de sang sont prélevés sur EDTA 10% avant et 2 heures après une injection sous cutané de 5µg/100g de poids corporel. L'effet GR s'évalue par une numération lymphocytaire.

### **1.3.2 Efficacité MR**

Les minéralocorticoïdes tel que l'aldostérone régulent essentiellement le métabolisme de l'eau et des électrolytes. Au niveau périphérique, l'action des minéralocorticoïdes sur les MR se manifeste par l'activation des canaux ioniques et des pompes ATPases Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, ce qui augmente la kaliurèse et diminue la natriurèse.

L'efficacité des récepteurs MR entre les deux souches a été mesurée par le rapport Na/K urinaire après injection d'aldostérone.

Pour cela une dose aiguë de 100µg/100g de poids corporel d'aldostérone par voie sous cutanée, a été injectée aux deux souches de rats placés en cage de métabolisme. Cette dose est

capable d'induire une diminution du ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  6 à 8 h après injection [235, 236]. L'urine est collectée 8 h après injection. 3 ml d'eau stérile ont été également injectés par voie intrapéritonéale préalablement afin d'assurer une quantité d'urine suffisante (puisque les minéralocorticoïdes inhibent la prise hydrique par une action MR au niveau central). Les dosages des concentrations urinaires de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  ont été effectués.

## **2 Analyses statistiques**

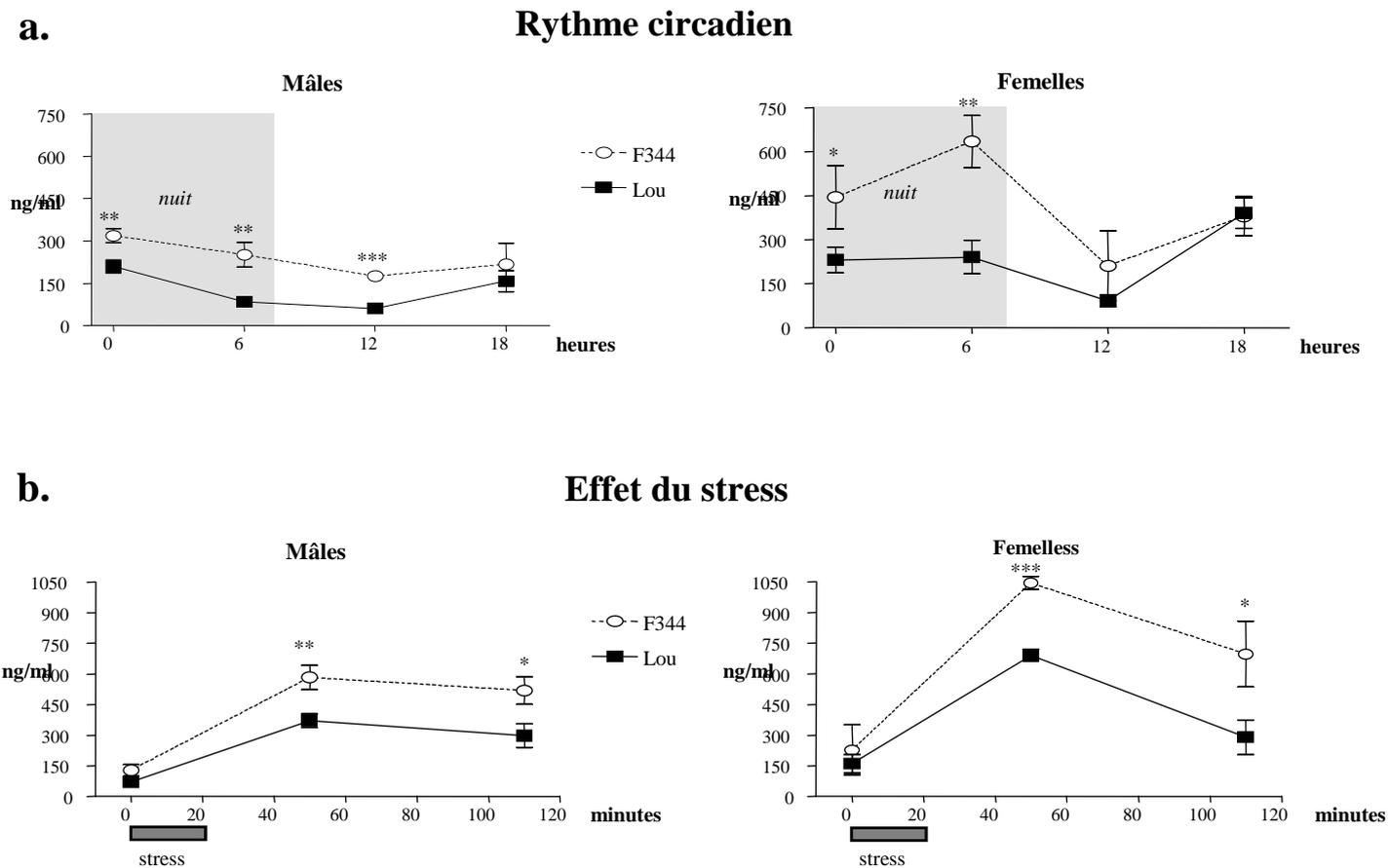
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. L'analyse de variance ANOVA two-way a été

effectuée avec souche, sexe et temps comme facteurs. Après une différence statistique, la comparaison post-hoc entre les groupes est effectuée en utilisant le test de Tuckey. La signification statistique est retenue avec  $p < 0,05$ .

### 3 Résultats

#### 3.1 Activité/réactivité de l'axe corticotrope

##### 3.1.1 Cycle nyctéméral de la corticostéronémie



**Figure 13:** corticostéronémie basale (a) et corticostéronémie après un stress de contention (b)

Pour les niveaux de base de corticostérone dans le plasma au cours du nyctémère, l'ANOVA révèle un effet souche ( $p < 0.01$ ), un effet sexe ( $p < 0.01$ ), une interaction souche-sexe ( $p < 0.001$ ), et un effet temps ( $p < 0.01$ ). Chez les mâles, aussi bien que chez les femelles la corticostéronémie des F344 est plus élevée que celle des Lou durant la phase nocturne ( $p < 0.01$ ). Pendant la phase diurne la corticostéronémie est plus élevée chez les F344 mâles que chez les Lou mâles à 12h ( $p < 0.01$ ). Aucune différence à 18h n'a été notée entre ces deux souches quel que soit le sexe.

A 06h la corticostéronémie basale est plus élevée chez les femelles que chez les mâles au niveau des deux souches Lou et F344.

### 3.1.2 Réponse au stress de contention

L'ANOVA révèle un effet souche ( $p < 0.01$ ), un effet sexe ( $p < 0.01$ ), un effet temps ( $p < 0.01$ ), une interaction souche-temps ( $p < 0.001$ ). 20 minutes de stress entraînent une augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone chez les deux souches et l'effet est plus élevé chez les F344 que chez les Lou.

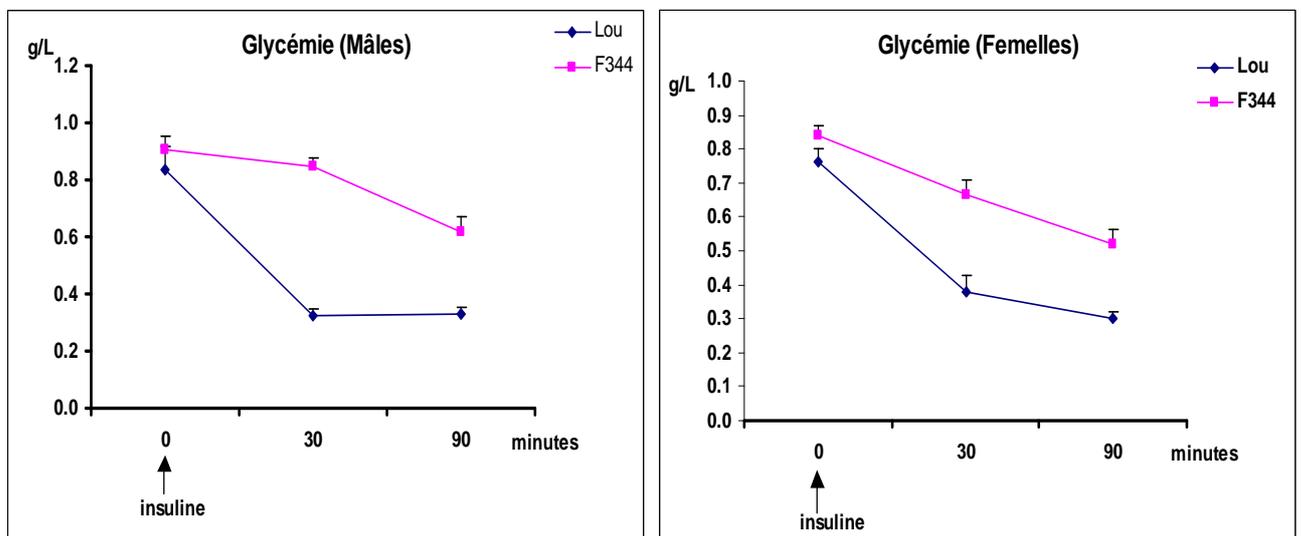
Chez les F344, aussi bien chez les mâles et femelles, 20mn de stress entraînent une augmentation de la corticostéronémie plasmatique, avec un pic qui est atteint 30mn après et diminue ensuite, mais reste élevée jusqu'à 100mn après l'élimination du stress (sans retrouver la valeur basale) alors que chez les Lou 100mn après le stress, la corticostéronémie reste comparable à la valeur basale, et ceci quel que soit le sexe.

Ces résultats montrent aussi un effet sexe en réponse au stress : la corticostéronémie après le stress est plus élevée chez les femelles comparée à celle des mâles.

## 3.2 Efficacité aux récepteurs corticoïdes

### 3.2.1 Efficacité GR :

#### 3.2.1.1 Glycémie



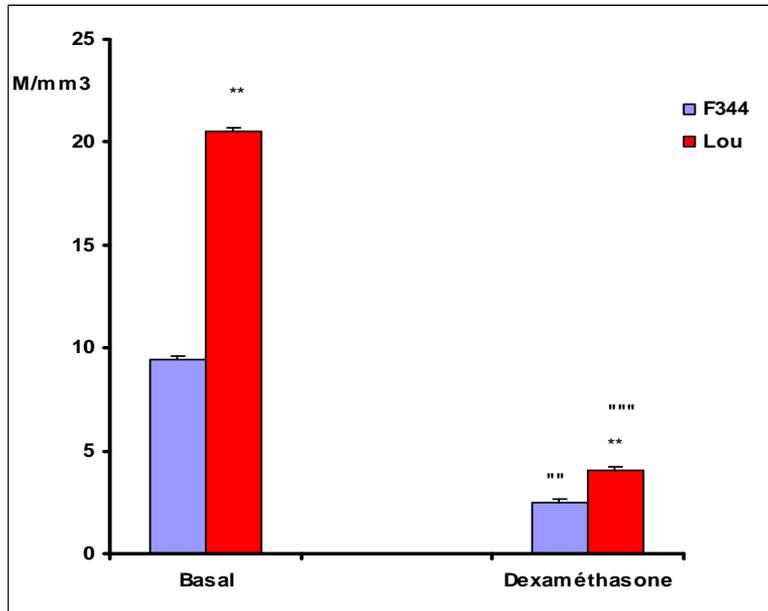
**Figure 14:** Glycémie après un stress métabolique entre Lou et F344

ANOVA révèle un effet souche ( $p < 0.05$ ), un effet sexe ( $p < 0.01$ ) et un effet temps ( $p < 0.05$ ) et une interaction souche-temps ( $p < 0.01$ ).

En situation basale, les rats Lou et F344 présentent une glycémie identique. L'injection d'insuline entraîne, 30min et 90 min après, une diminution de la glycémie chez les deux

souches et les deux sexes ; mais plus marquée chez les LOU que chez les F344 quel que soit le sexe.

### 3.2.1.2 Numération-formule

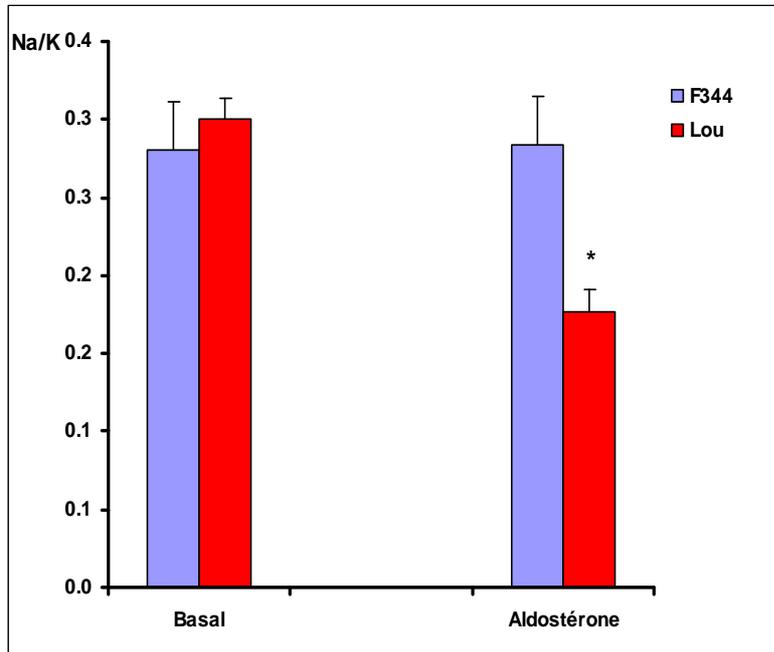


**Figure 15 :** Effet immunodépresseur de l'injection de dexaméthasone chez les F344 et Lou  
Mâles

L'ANOVA révèle un effet souche ( $p < 0.001$ ), un effet traitement ( $p < 0.001$ ) et une interaction souche-traitement ( $p < 0.05$ ). En situation basale, la concentration plasmatique de lymphocytes chez les mâles est plus élevée chez les Lou que chez les F344 ( $p < 0.01$ ). L'injection de dexaméthasone entraîne une diminution du nombre de lymphocytes chez les deux souches ( $p < 0.001$ ) mais cette diminution est plus marquée chez les Lou (-80.30%) que chez les Fischer (-73.3%).

### 3.2.2 Efficacité MR

#### 3.2.2.1 Rapport Na/K urinaire



**Figure 16:** Effet de l'injection d'aldostérone sur l'excrétion urinaire de Na et K

En situation basale, les rats Lou et F344 ont un rapport Na/K urinaire identique.

8h après injection d'aldostérone, seul le rapport Na/K urinaire chez les Lou a diminué de façon significative ( $p < 0.01$ ). Chez les F344, le traitement à l'aldostérone n'a aucun effet sur l'excrétion urinaire de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ .

#### 4 Discussion :

Les résultats concernant le système neuroendocrinien indiquent que la variabilité de l'activité et de la réactivité de l'axe corticotrope dépendent de la souche de rat, ce qui confirme l'importance des facteurs génétiques dans l'expression de la variabilité inter-individuelle.

En ce qui concerne l'activité de l'axe corticotrope, nos résultats montrent que, globalement, la corticostéronémie des rats F344 est plus élevée que celle des rats Lou au cours des points du nyctémère. Chez les F344, il existe un dimorphisme sexuel dans la sécrétion de corticostérone : la corticostéronémie basale est plus élevée chez les femelles que chez les mâles. Cette différence est plus accrue pendant la nuit que le jour ce qui atteste une plus grande activité de l'axe corticotrope des femelles F344 durant la phase active. Chez les mâles des deux souches ainsi que chez les femelles Lou le pic de corticostérone basal est observé en début de nuit. Les résultats similaires ont déjà été observés par Windle RJ et coll. [237] sur des rats femelles Sprague-Dawley ; alors que chez les F344 femelles ce pic n'a été observé qu'en fin de nuit.

La réactivité de l'axe corticotrope s'évalue par la réponse de celui-ci suite à un stress (pic de corticostéronémie et par la vitesse de régulation de celle-ci). Le retour aux valeurs basales se fait grâce au rétrocontrôle négatif de la corticostérone qui s'exerce sur les centres impliqués dans le stress tels que l'hypophyse, l'hypothalamus et l'hippocampe par l'intermédiaire des GR. Compte tenu des leurs affinités, les GR ne se saturent qu'en situation d'hypersécrétion comme après un stress. Plus les GR sont efficaces, plus le rétrocontrôle est important et le retour de la corticostéronémie aux valeurs basales est rapide. Le pic de corticostérone 30mn après le stress de contention est plus élevé chez les F344 que chez les Lou. On note aussi un effet sexe par rapport à la réactivité au stress : les femelles quelle que soit la souche sont plus réactives que les mâles ce qui se traduit par une différence de pic de corticostérone. Cette différence est probablement due à une forte vulnérabilité des femelles au stress comme l'ont rapporté d'autres auteurs [238], [239], [240], mais aussi au fait que les hormones sexuelles sont différentes principalement l'estradiol qui influence le fonctionnement de l'axe corticotrope [102]; [241]. Cependant le retour de la corticostéronémie aux valeurs basales est plus rapide chez les Lou que chez les F344 ce qui traduit une plus grande efficacité des récepteurs GR chez les rats Lou.

La réponse insulinémique induisant une diminution de la glycémie est plus marquée chez les rats Lou que chez les F344. Ceci atteste une tendance à l'insulino-résistance décrite chez le rat F344 [242]. La corticostéronémie élevée observée chez le rat F344 pourrait être la cause de la

non efficacité de l'insuline sur la glycémie puisque ces deux hormones présentent des effets opposés au niveau périphérique comme l'ont constaté Duclos et coll. [211]. L'effet anabolisant de l'insuline est altéré par un taux élevé de corticostérone.

La régulation du rapport Na/K est l'un des effets les plus importants de l'action des MR. L'aldostérone diminue la natriurèse tout en augmentant la kaliurèse via ce récepteur [60], [3]. Ce rapport peut également être modifié par de fortes doses de corticostérone ou de dexaméthasone dans le sens inverse (augmentation de natriurèse et de kaliurèse). Au niveau basal, le rapport Na/K urinaire est comparable entre les deux souches chez les mâles. Le traitement à l'aldostérone est sans effet chez les F344 mâles alors que chez les Lou il diminue fortement le rapport Na/K. ce qui est en accord avec l'hypothèse d'un MR plus efficace chez les Lou mâles. Cette diminution est essentiellement liée à une kaliurèse plus importante chez le rat Lou. Chez les F344 ce rapport inchangé de Na/K est dû à une natriurèse particulièrement élevée et probablement à leur plus forte corticostéronémie (et donc à un effet médié via les GR), observée par plusieurs auteurs [237], [243], [244].

Cependant lorsqu'on injecte de la dexaméthasone, on observe surtout un effet GR mais aussi un effet MR selon la dose utilisée. Cette injection entraîne un rétrocontrôle négatif sur l'axe corticotrope donc de la production endogène de glucocorticoïdes. Lorsqu'on cherche à évaluer l'effet GR périphérique par une injection de glucocorticoïdes, chez les rats non surrénalectomisés, on se retrouve confronté aux effets supplémentaires des glucocorticoïdes endogènes et de la réactivité de l'axe corticotrope, autant de variable qui peuvent biaiser l'interprétation de l'efficacité GR. En effet des études sur rats surrénalectomisés réalisées par Marissal-Arvy et coll., [245] ont mis en évidence une différence d'efficacité des récepteurs aux corticostéroïdes entre Lou et F344. ce qui confirme le rôle négligeable des effets supplémentaires des glucocorticoïdes endogènes dans notre protocole utilisé.

Au vu de ces données, et étant donné le rôle des glucocorticoïdes dans l'homéostasie, notamment dans le métabolisme énergétique et le comportement alimentaire, il est intéressant d'explorer les particularités nutritionnelles et métaboliques les plus discriminantes entre ces deux souches de rats Lou et F344, d'où l'objet de cette 2<sup>e</sup> partie de l'étude.

## **B. ETUDE COMPARATIVE DES CARACTERISTIQUES NUTRITIONNELLES ET METABOLIQUES**

Ce travail a fait l'objet de 2 articles : le premier a été publié dans la revue **Obesity Research** en 2005 et le second dans **Physiology & Behavior** en 2005.

Dans cette étude nous avons essayé de caractériser les différences nutritionnelles et métaboliques entre les 2 souches de rats Lou et F344 à différents âges et leur susceptibilité à développer l'obésité afin de valider le choix des rats F344 comme souche consanguine contrastant la souche Lou pour des études de génétique moléculaire.

La première partie de l'étude (**article 2**) a porté sur des rats Lou et F344 mâles et femelles âgés de 18 semaines et soumis à différents types de régimes.

L'obésité se définit comme étant un excès de tissu adipeux résultant du déséquilibre entre les entrées et les sorties d'énergie, qui se développe dans la plupart des cas au cours du vieillissement. Elle est aussi associée au syndrome métabolique telles que l'insulino-résistance et la leptino-résistance.

### **Résumé de l'étude 2:**

Le but de cette étude est de caractériser sur le plan nutritionnel les deux souches de rats (Lou et F344). Afin d'examiner l'effet du régime, sur le gain de poids et sur la composition corporelle, les deux souches de rats, reçoivent à volonté pendant cinq semaines 3 régimes différents : un régime standard, un régime de choix en macronutriments, un régime hypercalorique d'une part et d'autre part les rats sont soumis à un environnement de 4°C censé induire une augmentation de la dépense énergétique.

La prise énergétique, le gain de poids et la composition corporelle ont été mesurés.

Dans chacun des régimes, l'efficacité alimentaire a été déterminée : elle correspond au gain de poids (par semaine) exprimé en mg divisé par la quantité totale d'énergie ingérée (kJ) pendant cette même période.

Les résultats montrent que malgré une prise énergétique élevée, le rat Lou, comparé au rat F344, manifeste un faible gain de poids et de masse adipeuse alors qu'on observe l'inverse pour la masse maigre.

La présentation d'un régime dissocié montre une différence de choix en macronutriments entre ces deux souches. Chez les mâles, les rats Lou ingèrent moins de protéines (25% vs 34%) que les F344 tandis qu'on observe l'inverse chez les femelles.

Ainsi l'obésité induite par un régime hypercalorique n'est observée que chez la souche F344 entraînant un développement plus important de sa masse adipeuse.

L'exposition à un environnement froid entraîne, chez les deux souches, une augmentation du tissu adipeux brun comparée à celle des témoins mais aussi une augmentation de la prise énergétique. Quel que soit le type de régime, l'efficacité alimentaire est plus élevée chez les F344 que chez les Lou.

Ces résultats montrent une nette différence nutritionnelle entre le rat Lou, souche maigre et résistante à l'obésité induite par un régime hypercalorique et le rat F344 qui est une souche tendant à l'obésité.

Dans la deuxième partie de cette étude (**article 3**) nous nous sommes intéressés également, en plus de la prise énergétique (entrées) et de la composition corporelle, à la dépense énergétique exprimée par la thermogenèse et au profil hormonal de ces deux souches à un âge un peu plus précoce (8 semaines d'âge).

### **Résumé de l'étude 3 :**

L'objectif de cette étude est de comparer la balance énergétique, la composition corporelle, les profils métaboliques entre les deux souches consanguines de rats (Lou et F344 ) mâles et femelles âgés de 8 semaines.

Dès leur arrivée, les rats sont pesés et soumis à un régime alimentaire en choix. A la fin de l'expérience (après 3 semaines) et après une nuit de jeûne, les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale au pentobarbital (50 mg/kg de poids corporel) et héparinés (100U héparine/100g de poids corporel). Le sang est collecté à partir de la veine cave inférieure, centrifugé et le plasma est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour des dosages ultérieurs. Les concentrations plasmatiques d'insuline et de leptine sont déterminées par dosage radio-immunologie (RIA) (voir annexes). La composition corporelle est déterminée : 4 dépôts de tissu adipeux blanc (périgonadal, rétropéritonéal, mésentérique et sous-cutané) sont disséqués et pesés. Le foie, la rate, le thymus, les reins, les surrénales et la carcasse (muscles + squelette) sont aussi prélevés et pesés.

Le tissu adipeux brun interscapulaire est rapidement disséqué et pesé. Il sera utilisé pour la détermination de la thermogenèse par respiration mitochondriale selon la méthode de Cannon et Lindberg [246] (voir annexes).

Tous les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  SEM. Le gain de poids, la prise énergétique durant toute la durée de l'expérience sont enregistrés et exprimés par semaine et total des 3 semaines. La consommation de chaque macronutriment est exprimée en pourcentage. Les différences concernant le choix alimentaire et la composition corporelle entre les deux souches et pour chaque sexe sont comparées à l'aide du test de Student. Par ailleurs, une

ANOVA pour mesures répétées est utilisée pour comparer l'évolution de la consommation pendant les 3 semaines d'expérimentation entre les deux souches.

Les résultats montrent que, durant les 3 semaines d'expérience, la prise énergétique est identique pour les deux souches de rats (mâles : Lou =  $5619.2 \pm 349.4$  kJ, F344 =  $5875.4 \text{ kJ} \pm 171.4$  ; femelles : Lou =  $3864.4 \pm 166.4$  kJ, F344 =  $4058.8 \pm 118.7$  kJ), **néanmoins le gain de poids, le pourcentage de masse adipeuse sont beaucoup plus importants chez les F344 que chez les Lou quel que soit le sexe et l'inverse pour le pourcentage de la masse maigre.**

En ce qui concerne le pourcentage des macronutriments dans la ration, on constate, chez les mâles, que les Lou ingèrent plus de protéines que les F344 (**47.5%** vs **37.5%**) alors que chez les femelles on note l'inverse pour l'ingestion des glucides (**32.5%** vs **45%**).

L'activité thermogénique mesurée par respiration mitochondriale au niveau du tissu adipeux brun interscapulaire est plus élevée chez les rats Lou comparée à celle des F344 quel que soit le sexe.

**Ainsi la faible efficacité alimentaire notée chez le rat Lou accompagnée d'une faible accumulation de tissu adipeux blanc suggère une forte perte d'énergie par thermogénèse observée chez cette souche.**

La leptinémie et l'insulinémie sont beaucoup plus élevées chez les rats F344 comparées à celles des rats Lou aussi bien chez les mâles que chez les femelles et ceci malgré une importante masse adipeuse chez les F344 ce qui atteste une tendance à la leptino-résistance chez ces animaux.

Ces résultats montrent que les mécanismes responsables de la régulation efficace de la composition corporelle chez le rat Lou se mettent en place très tôt au cours de la vie donnant à cette souche un grand intérêt pour l'étude des facteurs de résistance à l'obésité.

### **Conclusion de l'étude**

Ces travaux nous ont permis de préciser les différences nutritionnelles, métaboliques entre les souches Lou et F344. Ainsi, quel que soit le régime, le rat Lou présente un poids inférieur comparé au rat F344 lié principalement à une adiposité faible attestant une régulation efficace de son comportement alimentaire et de sa composition corporelle.

Les comparaisons neuroendocriniennes, entre les souches Lou et F344 révèlent des traits discriminants. Le taux de corticostérone plasmatique basal ainsi celui observé après un stress sont plus élevés chez le rat F344 que chez le rat Lou. Ceci peut s'expliquer par une faible efficacité des récepteurs GR et MR notée chez la souche F344 obèse.

## **ARTICLE 2**

# Comparison of Fat Storage between Fischer 344 and Obesity-Resistant Lou/C Rats Fed Different Diets

Jean-Marie Héliès,\* Abdoulaye Diane,† Allan Langlois,\* Christiane Larue-Achagiotis,† Gilles Fromentin,† Daniel Tomé,† Pierre Mormède,\* and Nathalie Marissal-Arvy\*

## Abstract

HÉLIÈS, JEAN-MARIE, ABDOULAYE DIANE, ALLAN LANGLOIS, CHRISTIANE LARUE-ACHAGIOTIS, GILLES FROMENTIN, DANIEL TOMÉ, PIERRE MORMÈDE, AND NATHALIE MARISSAL-ARVY. Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. *Obes Res.* 2005;13: 3–10.

**Objective:** We aimed to characterize further the Lou/C (LOU) and Fischer 344 (F344) rat strains for nutritional traits to validate their use as contrasting strains for molecular genetic studies.

**Research Methods and Procedures:** Five batches of LOU and F344 rats were used to measure caloric intake, weight gain, and body composition when fed a chow diet, a self-selection diet (together with the study of preferences for macronutrients), hypercaloric diets, and a chow diet in a cold environment.

**Results:** Despite a higher caloric intake when fed a chow diet, LOU rats showed a lower weight gain, final body weight, and percentage of fat tissue, together with a higher percentage of carcass weight, than F344 rats. When fed a self-selection diet, LOU males ingested less protein and more fat than F344 males, and the reverse was observed for females. In this condition, feed efficiency was reduced in LOU but increased in F344 rats compared with the chow diet. Diet-induced obesity was observed in F344 rats but not in LOU rats fed hypercaloric diets. In a cold environment,

both LOU and F344 rats displayed an increased percentage of brown adipose tissue compared with control groups, together with a higher caloric intake.

**Discussion:** The study shows robust nutritional differences between the LOU rat, a lean strain with a low feed efficiency and resistant to diet-induced obesity, and the contrasting F344 rat strain. It also shows the interest in these strains for studying the genetic components of resistance to obesity.

**Key words:** diet-induced obesity, self-selection diet, body composition

## Introduction

Environmental factors such as lack of exercise and excessive food intake correlate with the increased prevalence of obesity in humans (1,2). However, it is also clear that, in a favorable environment, some individuals have a genetic predisposition to store excessive caloric intake mainly as fat or, conversely, to maintain a low percentage of adipose tissue (3). In laboratory rats, when fed a hypercaloric diet, individual rats from an outbred strain differ widely in diet-induced obesity (4). Such a variability in fat storage regulation can be also found among inbred strains, which are useful models to study the genetic components of complex traits such as obesity or, conversely, resistance to obesity (5).

The inbred Lou/C rat (LOU),<sup>1</sup> originating from a Wistar strain (6), has been described as a good model to study healthy aging (7) and resistance to obesity with age (8). Compared with Wistar rats, they exhibit a low caloric intake and a low body weight (9), associated with a stable percentage of adipose tissues throughout life (13% for males and 11% for females) (10), despite the fact that LOU rats also display a preference for fat at the expense of carbohydrates

Received for review May 5, 2004.

Accepted in final form November 11, 2004.

The costs of publication of this article were defrayed, in part, by the payment of page charges. This article must, therefore, be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

\*Laboratory for Neurogenetics and Stress, UMR 1243 INRA, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux cedex, France and †Physiology of Nutrition and Food Behaviour, UMR 914, INRA, Paris cedex 05, France.

Address correspondence to Pierre Mormède, Institut F. Magendie, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.

E-mail: pierre.mormede@bordeaux.inra.fr

Copyright © 2005 NAAASO

<sup>1</sup>Nonstandard abbreviations: LOU, Lou/C; F344, Fischer 344; ME, metabolizable energy; LARD, fat diet; OCC, occidental diet; CTL, control diet.

**Table 1.** Initial body weight of rats used in the four experiments

Experiment	Treatment	LOU				F344			
		Male		Female		Male		Female	
		<i>n</i>	BW ± SE	<i>n</i>	BW ± SE	<i>n</i>	BW ± SE	<i>n</i>	BW ± SE
1		8	285 ± 12	8	169 ± 7	8	347 ± 13	8	196 ± 12
2		6	275 ± 20	9	170 ± 7	8	312 ± 12	9	186 ± 8
3	LARD diet	4	258 ± 16			4	300 ± 13		
	OCC diet	4	252 ± 9			4	287 ± 12		
	CTL diet	2	245 ± 7			4	291 ± 10		
4a	COLD	4	252 ± 6			4	303 ± 12		
	CTL	4	266 ± 5			4	322 ± 8		
4b	COLD	4	245 ± 7			4	308 ± 5		
	CTL	4	239 ± 1			4	276 ± 6		

Values are number of animals (*n*) per sex and treatment, and mean body weight ± SE in grams (BW ± SE). BW, body weight.

during aging. For those reasons, the LOU strain is considered an interesting model of resistance to the development of obesity. However, thus far, the effect of an excessive caloric intake on their body composition has not been studied in young adult rats.

The quantitative trait loci analysis is recognized as a valuable approach to find the chromosome regions influencing complex traits such as fat storage (11). The success of this technique lies mainly in the choice of two inbred contrasting strains. The Fischer 344 (F344) strain expresses a number of metabolic and nutritional traits that differ from LOU rats. F344 rats are predisposed to obesity and accumulate lipid excessively in liver and muscle (12). Moreover, there is evidence that, although F344 rats have normal glucose tolerance, they show insulin resistance, leptin resistance, and dyslipidemia (12). F344 rats exhibit traits that are also common in human obesity such as insulin resistance, dyslipidemia, and fat accumulation, generally described as syndrome X.

The aim of this study was to characterize further the LOU and F344 rat strains for nutritional traits and their sensitivity to diet-induced obesity and to validate F344 rats as a contrasting strain to the LOU strain for further molecular genetic studies. Caloric intake, weight gain, and body composition in LOU and F344 rats were measured 1) in a control condition using chow diet and then a self-selection diet of macronutrients, 2) using high caloric diets, and 3) in an environment of 4 °C, inducing an increased energy expenditure.

## Research Methods and Procedures

### Animals and Housing

LOU and F344 rats were housed in standard cages in a temperature-controlled room (23 ± 1 °C) with a 12:12-hour

light:dark cycle (lights on at 7:00 AM). All animals were born and raised in the laboratory from LOU and F344 breeders supplied, respectively, by Harlan (Gannat, France) and Iffa Credo (L'Arbresle, France). They were fed with SAFE-A03 chow [3.2 kcal/g metabolizable energy (ME)] until weaning at 28 days of age and subsequently with SAFE-A04 (2.9 kcal/g ME) chow until the beginning of the experiments. Diets were supplied by SAFE (Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-orge, France). Water was available ad libitum. Initial mean body weight and number of rats per strain used in each experiment are shown in Table 1.

### Experiment 1: Caloric Intake on a Balanced Chow Diet

Eighteen-week-old rats were housed individually and given ad libitum access to the SAFE-A04 chow diet for 2 weeks. Animals, food, and water were weighed once a week for 2 weeks. Mean energy intake (mean of kilocalories ingested per week for 2 weeks per 100 grams of body weight) and feed efficiency (milligrams gained per total ingested kilocalories for 2 weeks) were calculated from food intake and weight gain.

### Experiment 2: Food Intake, Percentages of Macronutrients Ingested, and Body Composition on a Self-Selection Diet

**Diet.** The three macronutrients (protein, carbohydrate, and fat) were presented separately. The protein diet (3.9 kcal/g) was composed of 90.5% total milk proteins (Nutri-nov, Rennes, France). Total milk protein is a mixture of casein (85%) and other milk proteins (albumins and globulins). These other milk proteins constitute a direct source

of limiting sulfur amino acids. The carbohydrate diet (3.7 kcal/g) consisted of 80.5% pregelatinized cornstarch and 10% sucrose. The fat diet (7.6 kcal/g) contained 36.2% lard and 54.3% soybean oil. Each diet contained 3.5% minerals (AIN 93-Mx; ICN Pharmaceuticals, Orsay, France), 1% vitamins (AIN 93-Vx; ICN Pharmaceuticals), and 5%  $\alpha$ -cellulose (Alphacel; ICN Pharmaceuticals). The protein and carbohydrate diets were in powdered form, whereas the fat diet was semisolid (13).

**Protocol.** Sixteen-week-old rats were housed individually. Rats were given the self-selection diet for 3 weeks. The three food cups containing macronutrients in each cage were weighed and refilled daily. Rats were also weighed daily. Mean caloric intake was calculated as kilocalories ingested per week per 100 grams of body weight by adding the intake from the three sources. Feed efficiency (milligrams gained per total ingested kilocalories for 2 weeks) was calculated from food intake and weight gain. Percentages of macronutrients were calculated as the relative amount of calories provided by each source against the total calories ingested. Before death at 20 weeks, rats were fed the SAFE-A04 chow for 1 week. Then rats were fasted for one night, weighed, and killed by decapitation (starting at 9:00 AM). Four depots of adipose tissue were carefully removed and weighed: epididymal (around testis and ductus deferens) or periovarian (around ovaries), retroperitoneal (along the posterior wall, from the kidney to the hip region), mesenteric (along the mesentery, starting from the lesser curvature of the stomach and ending at the sigmoid colon), and inguinal (subcutaneous fat between the lower part of the rib cage and the thighs). The addition of the adipose tissues was considered total fat mass. Liver, kidneys, heart, spleen, adrenals, and thymus were weighed. Other internal organs (e.g., lungs, genitals, and intestines) were also removed but not weighed. After dissection, the carcass (i.e., muscle mass and skeleton, excluding the tail) was weighed (14).

#### **Experiment 3: Effect of Hypercaloric Diets on Caloric Intake and Body Composition**

Male rats of each strain were housed in groups of two per cage and received SAFE-A04 chow for 1 week of habituation (Table 1). Then, three different diets were given ad libitum for 5 weeks (from 16 to 21 weeks of age): 1) a fat diet (LARD) diet with access to pork subcutaneous fat (8.5 kcal/g ME) and SAFE-A04 chow (2.9 kcal/g ME); 2) occidental (OCC) diet from SAFE (3.82 kcal/g ME), composed of 16% protein, 16% lipid, 46% carbohydrate, and 1% vitamins; and 3) control (CTL) diet composed of SAFE-A04 chow. Animals, food, and water were weighed every 2 days. Mean energy intake (mean of kilocalories ingested per week for 5 weeks per 100 grams of body weight) and feed efficiency (milligrams gained per total ingested kilocalories for 5 weeks) were calculated from food intake and weight gain. After 5 weeks, the rats were killed as described pre-

viously. Animals were weighed, and mesenteric and inguinal fat were removed and weighed.

#### **Experiment 4: Effect of Cold on Caloric Intake and Body Composition**

Two subexperiments were carried out separately.

**Experiment 4a.** Food intake was recorded in 12-week-old male rats of each strain housed in groups of two per cage at room temperature (CTL) or at 4 °C (COLD) (Table 1). Animals, food, and water were weighed before and after 1 week of the experiment. Mean energy intake per week (mean of kilocalories ingested for 1 week per 100 grams of body weight) and feed efficiency (milligrams gained per total ingested kilocalories for 1 week) were calculated from the food intake and weight gain.

**Experiment 4b.** Twelve-week-old male rats of each strain were housed two per cage at room temperature and at 4 °C for 1 week and killed as described previously for body composition analysis.

During these experiments, rats were fed SAFE-A04 chow ad libitum.

All experiments were conducted in strict compliance with European conventional and institutional regulations.

#### **Statistical Analysis**

Data are presented as means  $\pm$  SE. Organ and tissue weights are expressed as the percentage of total body weight. Food intake, food efficiency, weight gain, and body composition were analyzed by two-way ANOVA, with strain and sex or strain and treatment as main factors. When significant differences were detected, post hoc comparisons of means were performed with the Newman-Keuls test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

#### **Experiment 1: Caloric Intake on a Balanced Chow Diet**

**Caloric Intake.** Strain ( $p < 0.001$ ) and sex ( $p < 0.001$ ) main effects and the strain  $\times$  sex interaction ( $p < 0.01$ ) were significant for caloric intake (Table 2). In both sexes, LOU rats ingested more calories than F344 rats. LOU males ingested fewer calories than LOU females, whereas there was no sex difference in F344 rats.

**Weight Gain.** Strain ( $p < 0.001$ ) and sex ( $p < 0.001$ ) main effects and the strain  $\times$  sex interaction ( $p < 0.01$ ) were significant for weight gain. LOU rats gained less weight than F344 rats, and females gained less weight than males. The sex difference was larger in F344 rats.

**Feed Efficiency.** Strain ( $p < 0.001$ ) and sex ( $p < 0.001$ ) main effects and the strain  $\times$  sex interaction ( $p < 0.01$ ) were significant for feed efficiency. LOU rats displayed a lower feed efficiency than F344 in both males and females. In both strains, males showed a higher feed efficiency than females, but the difference was larger in F344 rats.

**Table 2.** Caloric intake (CI, kilocalories per week per 100 grams of body weight), weight gain (WG, grams per week), and feed efficiency (FE, milligrams per kilocalories) of LOU and F344 rats fed chow diet during 2 weeks (experiment 1)

	LOU		F344		<i>p</i>		
	Male ( <i>n</i> = 8)	Female ( <i>n</i> = 8)	Male ( <i>n</i> = 8)	Female ( <i>n</i> = 8)	Strain	Sex	Strain × sex
CI	126.7 ± 1.7‡**	145.3 ± 2.0‡	111.9 ± 2.3	118.7 ± 3.7	0.001	0.001	0.013
WG	3.1 ± 0.4‡¶	1.0 ± 0.1*	7.3 ± 0.7**	1.8 ± 0.2	0.001	0.001	0.006
FE	8.52 ± 1.12‡§	5.43 ± 0.33‡	18.35 ± 1.53¶	8.08 ± 0.61	0.001	0.001	0.009

Values are means ± SE; *p* values are from two-way ANOVA. Significantly different from the other group of the same sex: \* *p* < 0.05, † *p* < 0.01, ‡ *p* < 0.001. Significantly different from the other group of the same strain: § *p* < 0.05, ¶ *p* < 0.01, \*\* *p* < 0.001.

**Experiment 2: Food Intake, Percentages of Macronutrients Ingested, and Body Composition on a Self-Selection Diet**

**Caloric Intake.** Strain (*p* < 0.05) and sex (*p* < 0.001) main effects and the strain × sex interaction (*p* < 0.05) were significant for caloric intake (Table 3). In males, LOU rats ingested more calories than F344, but there was no significant strain difference in females. In the F344 strain, males ingested fewer calories than females, but there was no significant sex difference in LOU rats.

**Weight Gain.** Strain (*p* < 0.001) and sex (*p* < 0.001) main effects and the strain × sex interaction (*p* < 0.001) were significant for weight gain. LOU rats gained less weight than F344 rats. No sex differences were found in the LOU strain, whereas in the F344 strain, males gained more weight than females.

**Feed Efficiency.** Strain (*p* < 0.001) and sex (*p* < 0.01) main effects and the strain × sex interaction (*p* < 0.01) were significant for feed efficiency. The LOU strain dis-

played a lower feed efficiency than the F344 strain in both sexes. In LOU rats, no sex difference was found between sexes, whereas in F344 rats, males displayed a higher feed efficiency than females.

**Macronutrient Intake.** Sex (*p* < 0.01) main effect and the strain × sex interaction (*p* < 0.01) were significant for protein amount (Figure 1). In males, LOU rats displayed a lower protein intake than F344 rats, but the reverse was found in females. The strain × sex interaction (*p* < 0.05) was significant for fat intake. No significant effect for carbohydrate intake was found.

**Body Composition.** In both sexes, LOU rats displayed a lower body weight, a higher relative carcass weight, and a lower relative skin weight than F344 rats (Table 4). Body composition also revealed significant differences in relative organ weights between strains. In both sexes, LOU rats showed a lower relative total white adipose tissue weight, a higher relative heart weight, and a lower relative spleen weight than F344 rats. Significant differences between

**Table 3.** Caloric intake (CI, kilocalories per week per 100 grams of body weight), weight gain (WG, grams per week), and feed efficiency (FE, milligrams per kilocalorie) of LOU and F344 rats fed a self-selection diet (experiment 2)

	LOU		F344		<i>p</i>		
	Male ( <i>n</i> = 6)	Female ( <i>n</i> = 9)	Male ( <i>n</i> = 8)	Female ( <i>n</i> = 9)	Strain	Sex	Strain × sex
CI	171.3 ± 3.8‡	184.2 ± 4.2	154.3 ± 2.1‡	184.9 ± 2.4	0.020	0.001	0.012
WG	1.6 ± 1.1‡	0.8 ± 0.4*	12.8 ± 0.7‡	3.6 ± 1.0	0.001	0.001	0.001
FE	2.95 ± 2.13‡	2.46 ± 1.40*	22.26 ± 1.38‡	9.42 ± 2.60	0.001	0.002	0.003

Values are means ± SE; *p* values are from two-way ANOVA. Significantly different from the other group of the same sex: \* *p* < 0.05, † *p* < 0.001. Significantly different from the other group of the same strain: ‡ *p* < 0.05.

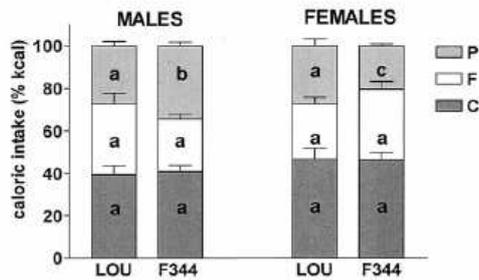


Figure 1: Percentage of macronutrient intake in LOU and F344 rats fed a self-selection diet. The figure shows relative amount of calories provided by proteins (P), fat (F), and carbohydrates (C). <sup>a,b,c</sup> Means within a macronutrient lacking a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).

strains within sexes were also found. In males, relative liver weight was lower in LOU rats than in F344 rats. In females, LOU rats displayed lower relative kidneys and adrenals weights than F344 rats. No weight differences were found for interscapular brown adipose tissue or thymus between F344 and LOU rats.

**Experiment 3: Effect of Hypercaloric Diets on Caloric Intake and Body Composition**

**Caloric Intake.** A diet ( $p < 0.001$ ) main effect and a strain  $\times$  diet interaction ( $p < 0.05$ ) were significant for

caloric intake (Figure 2). In both strains, rats increased their caloric intake from CTL to OCC diets and from OCC to LARD diets. Within diets, a strain difference was found for the OCC diet only, with LOU rats ingesting more calories than F344 rats. However, for CTL and LARD diets, both strains ingested the same amount of calories.

**Weight Gain.** Strain ( $p < 0.001$ ) and diet ( $p < 0.001$ ) main effects were significant for weight gain, but no interaction was found. With all diets, LOU rats gained less weight than F344 rats. In the LOU strain, rats fed the OCC and LARD diets gained more weight than rats fed the CTL diet, but no difference was found between OCC and LARD diets. In the F344 strain, rats fed the LARD diet gained more weight than rats fed the OCC or CTL diets, but no difference was shown between CTL and OCC diets.

**Feed Efficiency.** Strain ( $p < 0.01$ ) and sex ( $p < 0.001$ ) main effects and the strain  $\times$  sex interaction ( $p < 0.05$ ) were significant for feed efficiency. LOU rats showed a lower feed efficiency than F344 for OCC and LARD diets. In the LOU strain, no differences in feed efficiency were found between diets. In the F344 strain, rats fed with OCC or LARD diets had the same feed efficiency but lower than those fed with CTL diet.

**Final Body Weight.** Strain ( $p < 0.001$ ) and diet ( $p < 0.001$ ) main effects were significant for final body weight. The significant differences were the same as described for weight gain.

**Mesenteric Fat.** Strain ( $p < 0.001$ ) and diet ( $p < 0.001$ ) main effects and the strain  $\times$  sex interaction ( $p < 0.001$ )

**Table 4.** Body composition of 20-week-old LOU and F344 rats fed chow diet (experiment 2)

	LOU		F344		p		
	Male (n = 6)	Female (n = 9)	Male (n = 8)	Female (n = 9)	Strain	Sex	Strain $\times$ sex
Body weight (g)	288 $\pm$ 8*†	180 $\pm$ 3*	369 $\pm$ 5†	204 $\pm$ 4	0.001	0.001	0.001
Carcass (% BW)	50.3 $\pm$ 0.7*†	48.0 $\pm$ 0.4*	43.9 $\pm$ 1.0	44.2 $\pm$ 0.4	0.001	0.100	0.046
Skin (% BW)	18.8 $\pm$ 0.4*†	17.9 $\pm$ 0.1*	20.1 $\pm$ 0.3†	19.2 $\pm$ 0.2	0.001	0.001	0.965
WAT (% BW)	4.27 $\pm$ 0.20*	4.72 $\pm$ 0.17*	8.33 $\pm$ 0.35	8.56 $\pm$ 0.38	0.001	0.259	0.707
iBAT (% BW)	0.24 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01	0.963	0.005	0.060
Liver (% BW)	2.93 $\pm$ 0.04*	2.99 $\pm$ 0.07	3.38 $\pm$ 0.10†	2.86 $\pm$ 0.04	0.022	0.001	0.001
Heart (% BW)	0.35 $\pm$ 0.01*†	0.38 $\pm$ 0.00*	0.28 $\pm$ 0.01†	0.33 $\pm$ 0.00	0.001	0.001	0.250
Spleen (% BW)	0.185 $\pm$ 0.004*†	0.219 $\pm$ 0.003*	0.215 $\pm$ 0.005†	0.259 $\pm$ 0.009	0.001	0.001	0.389
Kidneys (% BW)	0.625 $\pm$ 0.009	0.610 $\pm$ 0.007*	0.638 $\pm$ 0.013†	0.693 $\pm$ 0.008	0.001	0.030	0.001
Thymus (% BW)	0.113 $\pm$ 0.014	0.138 $\pm$ 0.030	0.105 $\pm$ 0.016†	0.140 $\pm$ 0.022	0.700	0.001	0.508
Adrenals (% BW)	0.022 $\pm$ 0.002	0.028 $\pm$ 0.001*	0.019 $\pm$ 0.001†	0.036 $\pm$ 0.001	0.137	0.001	0.002

Values are means  $\pm$  SE; p values are from two-way ANOVA.

Significantly different from the other group of the same sex (\*  $p < 0.01$ ).

Significantly different from the other group of the same strain (†  $p < 0.01$ ).

% BW, percentage of body weight; WAT, total white adipose tissue; iBAT, interscapular brown adipose tissue.

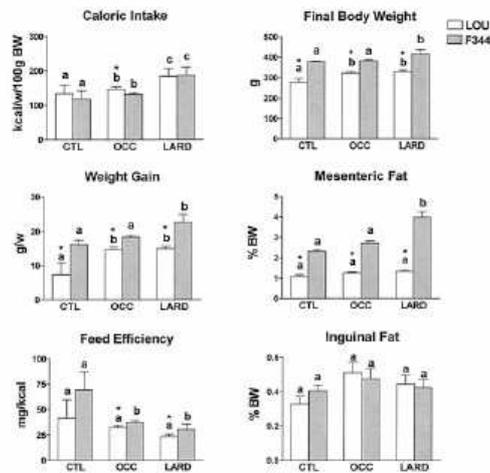


Figure 2: Effect of hypercaloric diets on food intake and body composition of 16-week-old LOU and F344 rats (experiment 3). Rats were fed for 5 weeks either on CTL, OCC, or LARD. BW, body weight; w, week. <sup>a,b,c</sup> Columns within a strain lacking a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ). \* Significantly different from the other group of the same diet ( $p < 0.05$ ).

were significant for the percentage of mesenteric fat. With all diets, LOU rats displayed a lower percentage of mesenteric fat. In the LOU strain, no differences were found among diets. In the F344 strain, the percentage of mesenteric fat was higher in rats fed the LARD diet.

**Inguinal Fat.** The effect of diet was significant ( $p < 0.05$ ), but the post hoc test did not reveal group differences.

**Experiment 4a: Effect of Cold on Caloric Intake**

**Caloric Intake.** Strain ( $p < 0.05$ ) and treatment ( $p < 0.001$ ) main effects were significant for caloric intake, without interaction (Table 5). LOU rats ingested more calories than F344 rats, and caloric intake was higher in animals exposed to cold.

**Weight Gain.** Strain ( $p < 0.001$ ) and treatment ( $p < 0.001$ ) main effects were significant for weight gain, without interaction. LOU rats gained less weight than F344 rats in both CTL and COLD treatments. In both strains, weight gain was higher in the CTL group than in the COLD group.

**Feed Efficiency.** Strain ( $p < 0.001$ ) and treatment ( $p < 0.001$ ) main effects were significant for feed efficiency, without interaction. LOU rats displayed a lower feed efficiency than F344 rats in both CTL and COLD treatments. In both strains, feed efficiency was higher in the CTL group than in the COLD group.

**Experiment 4b: Effect of Cold on Body Composition**

A strain ( $p < 0.001$ ) main effect and the strain  $\times$  treatment interaction ( $p < 0.05$ ) were significant for the relative carcass weight (Table 6). Relative carcass weight was higher in LOU rats than in F344 rats, but no differences were significant between treatments. However, in F344 rats, relative carcass weight was lower for COLD.

Strain ( $p < 0.001$ ) and treatment ( $p < 0.05$ ) main effects were significant for relative skin weight, without interaction. LOU rats displayed a lower relative skin weight, without interaction, and COLD induced a decrease of relative skin weight.

A strain ( $p < 0.01$ ) main effect was significant for percentage of liver, without interaction. Percentages of liver were lower for LOU rats.

Strain ( $p < 0.001$ ) and treatment ( $p < 0.05$ ) main effects were significant for relative mesenteric fat weight, without

**Table 5.** Effect of a 1-week exposure to cold on caloric intake (CI, kilocalories per week per 100 grams of body weight), weight gain (WG, grams per week), and feed efficiency (FE, milligrams per kilocalorie) of 12-week-old LOU and F344 male rats (experiment 4a).

	LOU		F344		<i>p</i>		
	CTL (n = 4)	COLD (n = 4)	CTL (n = 4)	COLD (n = 4)	Strain	Treatment	Strain $\times$ treatment
CI	259 $\pm$ 6	301 $\pm$ 11†	247 $\pm$ 6	277 $\pm$ 4†	0.016	0.001	0.369
WG	2.3 $\pm$ 1.2*	-6.0 $\pm$ 1.0*†	13.2 $\pm$ 3.7	0.3 $\pm$ 1.3†	0.001	0.001	0.092
FE	3.43 $\pm$ 1.84*	-8.02 $\pm$ 1.83*†	16.56 $\pm$ 2.12	0.43 $\pm$ 1.56†	0.001	0.001	0.182

Values are means  $\pm$  SE; *p* values are from two-way ANOVA. Significantly different from the other group of the same treatment (\* $p < 0.01$ ). Significantly different from the CTL group of the same strain († $p < 0.01$ ).

**Table 6.** Effect of a 1-week exposure to cold on body composition of 12-week-old LOU and F344 male rats (experiment 4b)

	LOU		F344		<i>p</i>		Strain × treatment
	CTL ( <i>n</i> = 4)	COLD ( <i>n</i> = 4)	CTL ( <i>n</i> = 4)	COLD ( <i>n</i> = 4)	Strain	Treatment	
Carcass (% BW)	58.6 ± 0.4†	58.6 ± 0.5†	52.7 ± 0.4	51.0 ± 0.4‡	0.001	0.074	0.050
Skin (% BW)	17.7 ± 0.3†	16.6 ± 0.6†	21.3 ± 0.24	20.4 ± 0.4	0.001	0.016	0.843
Liver (% BW)	4.32 ± 0.05	3.88 ± 0.10*‡	4.50 ± 0.07	4.50 ± 0.21	0.007	0.109	0.102
Mesenteric fat (% BW)	1.18 ± 0.08	0.82 ± 0.11†‡	2.02 ± 0.10	1.85 ± 0.08	0.001	0.012	0.291
Inguinal fat (% BW)	0.41 ± 0.04	0.59 ± 0.08*	0.62 ± 0.08	1.02 ± 0.11	0.001	0.003	0.197
iBAT (% BW)	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.02‡	0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.01‡	1.000	0.004	1.000

Values are means ± SE; *p* values are from two-way ANOVA.

Significantly different from the other group of the same treatment: \*  $p < 0.01$ , †  $p < 0.001$ .

Significantly different from the other group of the same strain: ‡  $p < 0.05$ .

BW, body weight; iBAT, interscapular brown adipose tissue.

interaction. LOU rats displayed lower relative mesenteric fat weight, and COLD reduced relative mesenteric fat weight.

Strain ( $p < 0.001$ ) and treatment ( $p < 0.01$ ) main effects were significant for relative inguinal fat weight, without interaction. LOU rats displayed lower relative inguinal fat weight, and COLD increased relative inguinal fat weight.

A treatment ( $p < 0.01$ ) main effect was significant for relative brown adipose tissue weight. COLD increased relative brown adipose tissue weight.

### Discussion

These results showed large differences in nutritional characteristics and fat storage capacity between LOU and F344 rat strains and showed why these two inbred rat strains should be of interest as models for the study of genetic components involved in resistance to obesity.

The main observation was that, when fed the different diets (chow, OCC, LARD, self-selected), LOU rats always showed a lower body weight gain than F344 rats, despite an equivalent or even higher caloric intake. The body weight difference was explained mainly by a percentage of fat two times lower in LOU rats. Feed efficiency was higher in males than in females, the sex difference being larger in the F344 strain. Previous studies with the LOU rat have shown that this strain ingests fewer calories than the Wistar strain (7,15), and these results show the relevance of using LOU and F344 rats as contrasting strains for further genetic studies. A striking result of this study is the larger difference in feed efficiency between the two strains when offered a

self-selection diet compared with a chow diet. In both sexes, self-selection of macronutrients resulted in a lower feed efficiency in LOU rats, and the reverse was true for F344 rats, thereby increasing the difference between the two strains. Moreover, when fed hypercaloric diets, both strains increased caloric intake with the energy value of diets, and, in addition, F344 rats also increased the amount of mesenteric fat with increasing caloric intake. This is a further illustration of resistance to obesity in the LOU strain, which has already been described in aging rats (10).

Understanding the origin of these nutritional differences and their consequences on body composition will require further studies. Both male and female LOU rats exhibited a lower body weight and percentage of skin, together with a higher percentage of carcass weight. This might be a source of differential energy expenditure between the two strains because of increased protein synthesis, muscular activity, and/or glycogen storage. The lower feed efficiency measured in LOU rats together with a lower amount of fat tissue also suggests that there is an increased loss of energy by thermogenesis in this strain. No difference between strains was found in the relative weight of brown adipose tissue, which is known to increase energy expenditure by heat dissipation (16), but further functional studies will be necessary to discard this hypothesis. Finally, the bigger liver of F344 rats could be the result of a higher triglyceride storage linked to their insulin resistance (12). We also observed a differential regulation of white adipose tissues in F344 rats between the intraabdominal (mesenteric) and subcutaneous (inguinal) fat compartments. Indeed, inguinal fat seemed

insensitive to the increase of caloric intake compared with mesenteric fat. Regional differences in the binding of hormone to receptors (such as glucocorticoid receptors) (17) or selective innervation (18) might be involved in the tissue-specific variation of fat storage. Finally, when energy expenditure is increased (COLD), LOU and F344 rats seem to use distinct regulatory pathways. In a cold environment, rats increase nonshivering thermogenesis by the brown adipose tissue (19) and also increase their caloric intake (20). Indeed, in a cold environment, both LOU and F344 rats displayed an increased percentage of brown adipose tissue compared with control groups, together with a higher caloric intake. However, LOU rats did not manage to maintain their body weight because of a lower feed efficiency in both CTL and COLD treatments compared with F344 rats.

#### Conclusion and Perspectives

LOU rats have more carcass and less fat weight than F344 rats, despite a higher amount of food intake. Furthermore, the lower feed efficiency of LOU rats is further decreased by self-selection of macronutrients, contrary to F344 rats, which increase their feed efficiency. This shows that the strain difference is not caused by specific needs of the Lou rat that would not be fulfilled by the chow. LOU rats are also resistant to diet-induced obesity, and feed efficiency cannot be improved in the case of energy mobilization, such as during cold exposure. The results of these experiments show robust nutritional differences between the LOU rat, a lean strain with a low feed efficiency and resistant to diet-induced obesity, and the F344 rat strain. These strains are, therefore, suited for further study of the pathophysiological mechanisms and molecular genetic bases of resistance to obesity.

#### Acknowledgments

The authors thank Claudine Tridon for taking care of the rats and Nathalie Dupuy for practical assistance. We also thank Noline Geverink for comments on a previous version of this paper.

#### References

1. Janz KF, Levy SM, Burns TL, Torner JC, Willing MC, Warren JJ. Fatness, physical activity, and television viewing in children during the adiposity rebound period: the Iowa Bone Development Study. *Prev Med.* 2002;35:563–71.
2. Kaplan MS, Huguet N, Newsom JT, McFarland BH, Lindsay J. Prevalence and correlates of overweight and obesity among older adults: findings from the Canadian National Population Health Survey. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003;58:1018–30.
3. Fernandez JR, Allison DB. Understanding racial differences in obesity and metabolic syndrome traits. *Nutr Rev.* 2003;61:316–9.
4. Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B, Keesey RE. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol.* 1997;273:725–30.
5. Schalling M, Johansen J, Nordfors L, Lonnqvist F. Genes involved in animal models of obesity and anorexia. *J Intern Med.* 1999;245:613–9.
6. Bazin H. The Louvain (Lou) rat. In: *Rat Hybridomas and Rat Monoclonal Antibodies*. Cleveland, OH: CRC Press; 1990. pp. 43–51.
7. Alliot J, Boghossian S, Jourdan D, et al. The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002;57:312–20.
8. Couturier K, Servais S, Koubi H, et al. Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes Res.* 2002;10:188–95.
9. Veyrat-Durebex C, Boghossian S, Alliot J. Age-related changes in adaptive mechanisms of macronutrient self-selection: evidence for a sexual dimorphism. *Mech Ageing Dev.* 1998;103:223–34.
10. Boghossian S, Veyrat-Durebex C, Alliot J. Age-related changes in adaptive macronutrient intake in swimming male and female Lou rats. *Physiol Behav.* 2000;69:231–8.
11. Mormède P, Courvoisier H, Ramos A, et al. Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology.* 2002;27:563–83.
12. Levy JR, Davenport B, Clore JN, Stevens W. Lipid metabolism and resistin gene expression in insulin-resistant Fischer 344 rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:626–33.
13. Larue-Achagiotis C, Gubern M, Laury MC, Louis-Sylvestre J. Energy balance in an inbred strain of rats: comparison with the Wistar strain. *Physiol Behav.* 1994;55:483–7.
14. Jean C, Fromentin G, Tome D, Larue-Achagiotis D. Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high protein, high lipid diet. *Physiol Behav.* 2002;46:65–73.
15. Perrin D, Mamet J, Geloën A, Morel G, Dalmaz Y, Pequignot JM. Sympathetic and brain monoaminergic regulation of energy balance in obesity-resistant rats (Lou/C). *Auton Neurosci.* 2003;109:1–9.
16. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84:277–359.
17. Sjogren J, Weck M, Nilsson A, Ottosson M, Björntorp P. Glucocorticoid hormone binding to rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1224:17–21.
18. Fliers E, Kreier F, Voshol PJ, et al. White adipose tissue: getting nervous. *J Neuroendocrinol.* 2003;15:1005–10.
19. Klingenspor M. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol.* 2003;88:141–8.
20. Schultz LA, Collier G, Johnson DF. Behavioral strategies in the cold: effects of feeding and nesting costs. *Physiol Behav.* 1999;67:107–15.

## ARTICLE 3

Short communication

## Comparison of energy balance in two inbred strains of rats: Fischer F344 prone to obesity and Lou rats resistant to obesity

Diané Abdoulaye<sup>a</sup>, Sandrine Wetzler<sup>a</sup>, Marc Goubern<sup>b</sup>, Jean Marie Helies<sup>c</sup>, Gilles Fromentin<sup>a</sup>,  
Daniel Tomé<sup>a</sup>, Christiane Larue-Achagiotis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR, INRA/INAPG 914, Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National d'Agronomie Paris-Grignon, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Nutrition et Sécurité Alimentaire, Institut National de la Recherche Agronomique, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 78352 Jouy en Josas Cedex, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Neurogénétique et Stress, UMR 1243 INRA, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux Cedex, France

Received 11 July 2005; received in revised form 16 September 2005; accepted 27 September 2005

### Abstract

This study aimed to compare energy balance, metabolic profiles and body composition between two inbred strains of rats (F344 and Lou) submitted to a self-selecting macronutrient. During the 3 weeks of experiment, the two strains did not differ significantly for their total energy intake; males: F344 = 5875.4 ± 171.4 kJ, Lou = 5619.2 ± 349.4 kJ; and females: F344 = 4058.8 ± 118.7 kJ, Lou = 3864.4 ± 166.4 kJ. However, F344 rats showed a higher weight gain, and percentage of total fat tissue, together with a lower percentage of carcass weight than Lou rats regardless of sex. The percentages of each macronutrient revealed a lower preference of protein for F344 males and the opposite in females for CHO. The thermogenic activity measured in interscapular brown adipose tissue was lower in Fischer than in Lou while the reverse was observed for leptinemia and insulinemia.

These results indicate that the mechanism responsible for the regulation of body composition observed in Lou rats takes place very early in life and attest the interest in this strain for studying the features of resistance to obesity.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Food choice; Body composition; WAT; BAT; Thermogenesis

### 1. Introduction

Obesity is characterized by a positive energy balance and is associated with several metabolic disturbances constituting one of the most prevalent risk factors for common chronic diseases in the Western world. No efficacious long-term treatment has yet been identified to permanently decrease excess weight. There are a number of metabolic factors that tend to drive post-obese individuals back to their previous high body weight [1]. However, it is well known that obesity has often a genetic background in humans and rodents. In fact, some strains of rats, for example Fischer F344 (F344) rats, have a high trend to become obese, while other strains are resistant to obesity, for example Lou/C (Lou) rats.

In a previous study [2] it was observed that F344 rats get quickly obese with age, while Lou rats, originating from a Wistar strain, are resistant to obesity. Lou rats gained less weight than F344 for both sexes and had different food choice preferences. Few studies have explored the origin of obesity resistance of Lou rats, and the mechanism underlying this resistance is not yet fully clarified.

It was then of particular interest to examine these two strains when presented a self-selecting macronutrient diet at a young age, in order to examine if obesity resulted from the difference of macronutrient selection and energy expenditure. Several hormones can affect both energy expenditure and fat mass, among which are insulin and leptin. Insulin is considered as an adiposity signal. Its plasma concentration is associated with the amount of fat stores [3,4]; insulin receptors are expressed in the brain, especially in the paraventricular nuclei involved in the control of energy [5,6]. Leptin, secreted by white adipocytes,

\* Corresponding author.

E-mail address: larueach@inapg.fr (C. Larue-Achagiotis).

provides feedback information on the lipid stores towards the hypothalamus. Leptin contributes to the regulation of both food intake and energy expenditure [7,8]. The plasma leptin concentration is directly related to body fat mass [9,10].

Moreover, it has been observed that Lou rats exhibit a particular preference for fat at the expense of carbohydrate during aging [11]. A previous work in our laboratory showed the same trend in Wistar rats as soon as 13 weeks of age [12].

The purpose of the present study, therefore, was to compare food intakes, body composition, energy expenditure and metabolic profiles (insulin and leptin) between two inbred genetically homogenous strains of male and female rats (F344 rats prone to obesity and Lou rats resistant to obesity), 8 to 12 weeks of age, submitted to a self-selecting macronutrient diet.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Experiments were carried out in accordance to the European guidelines for the care of vertebrate laboratory animals. Two inbred strains of rats were used: Lou rats [ $n=16$ ; 8 males and 8 females (Harlan, France)] and F344 rats [ $n=16$ ; 8 males and 8 females (IFFA Credo, France)]. They were 8 weeks of age at arrival in the laboratory. Rats were housed individually in stainless steel cages and maintained in temperature-controlled room ( $22\pm 1$  °C) with a 12:12 h light–dark cycle (light on 10:00 am). Food and water were available ad libitum in their cages. The rats were provided with separate sources of the three macronutrients, protein, fat and carbohydrate (CHO), supplemented with vitamins, minerals and fibers.

### 2.2. Diets

The protein diet (metabolizable energy=16.3 kJ/g) was composed of 90.27% total milk proteins (Nutrinov, Rennes, France). The fat diet (31.8 kJ/g) contained 36% lard and 54.27% soybean oil. The carbohydrate (CHO) diet (15.46 kJ/g) consisted of 80.27% pregelatinized cornstarch and 10% commercial sucrose. Each diet contained 3.5% minerals (AIN 93-Mx, ICN Pharmaceuticals; Orsay, France), 1% vitamins (AIN 93-Vx, ICN Pharmaceuticals; Orsay, France), 5% alpha-cellulose (Alphacel, ICN Pharmaceuticals, Orsay, France) and 0.23% choline bitartrate. The protein and carbohydrate diets were in powdered form while the fat diet was in paste form. All diets were prepared in the laboratory.

### 2.3. Procedure

In the stainless steel cages, the three diets were placed in separated food cups anchored on three of the four sides of the cage. After 1 week of habituation to the self-selection regimen, food intake and body weight were measured daily during 3 weeks at 10:00 am, and fresh diets were provided at this time. The positions of the food cups were randomly modified everyday to avoid diet selection due to position preferences. Although spillage was minimal, when it did occur, the food lost

from stainless steel holders was collected and added to the total not consumed.

At the end of the experiment, after one night of food deprivation, the rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg BW i.p injection) and heparinized (100 U heparin/100 g BW). Blood samples were collected from the inferior vein cava, centrifuged, and then the plasma was frozen at  $-20$  °C for subsequent insulin and leptin assays.

The body composition was determined: four depots of white adipose tissue (WAT) perigonadal retroperitoneal, mesenteric and subcutaneous tissues were removed and weighed; the liver, spleen, heart, thymus, kidneys and surrenal glands, and carcass (muscles+skeleton, without head, legs and tail) were also weighed.

Interscapular brown adipose tissue (IBAT) was rapidly dissected out, weighed and used for experiments. IBAT mitochondria were prepared according to the method of Cannon and Lindberg [13]. Oxygen uptake was measured polarographically with a Clark-type electrode and membrane potential with a laboratory constructed with tetraphenylphosphonium (TPP+) selective electrode. Values of membrane potential were plotted against values of respiration rate that was modulated by  $\alpha$ -glycerophosphate substrate concentration [14]. The IBAT mitochondrial protein yield was determined by spectrophotometric assay of the mitochondrial marker cytochrome *c*-oxidase in the homogenate and in the purified mitochondrial fraction [15], and was expressed in mg mitochondrial protein per IBAT.

Plasma insulin concentrations were determined using rat insulin RIA kit (limit of sensibility=0.4  $\mu$ U/ml) produced by Diasorin Insik (Antony, France). Plasma leptin concentrations were determined using rat leptin RIA kit (limit of sensibility=0.5 ng/ml) produced by Linco Research (St. Charles, MO, USA).

### 2.4. Data analysis

All results were expressed as means $\pm$  S.E.M. Weight gain and food intake during the experiment were recorded and expressed in terms of total week and total 3-week intakes. Intakes were also expressed as a percentage of the total intake; these values represent the rats' relative preferences for each of the three macronutrients. Differences in food choice and body composition between the two strains for each sex were tested using Student's *t*-test. The evolution of food intake during the 3 weeks of experimentation was analyzed using ANOVA repeated measures. (Statistical Analysis System (SAS) version 6.11, Cary, NC, USA). When appropriate, a post-hoc Tukey's HSD was used to compare between-group means when the ANOVA test was significant. Statistical significance was set at  $P<0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Energy intakes

The total energy intake during the 3 weeks of experiment was not significantly different in both sexes; males,

Table 1  
Protein, fat, carbohydrate (CHO), total energy intakes (kJ), and food efficiency (FE, BWG in mg/total kJ ingested) for 3 weeks

Weeks	Males		Females		
	Fischer	Lou	Fischer	Lou	
1	Protein	629.1±38.9 <sup>b</sup>	973.1±63.1 <sup>ba</sup>	350.7±30.5	504.9±67.7*
	Fat	622.0±109.9	469.0±99.9	357.0±41.4	565.6±40.1*
	CHO	619.5±91.1	542.1±110.4	535.5±42.6	472.3±25.9*
	Total	1870.1±64.8 <sup>a</sup>	1985.1±89.5	1243.1±48.1 <sup>a</sup>	1655.7±56.4 <sup>a</sup>
2	Protein	775.8±43.9 <sup>a</sup>	825.6±51.8 <sup>ba</sup>	347.4±30.9	426.8±58.9
	Fat	576.4±74.4	419.7±73.6	397.1±56.0	430.1±38.9
	CHO	585.6±97.0	536.3±87.8	665.9±44.7	435.6±38.0*
	Total	1937.8±78.6 <sup>b</sup>	1781.5±58.5	1410.3±41.0 <sup>b</sup>	1292.5±45.6 <sup>b</sup>
3	Protein	721.1±31.4 <sup>a</sup>	835.2±28.4 <sup>ba</sup>	334.8±30.9	425.1±68.6
	Fat	727.3±98.6	436.0±84.9	401.3±46.0	421.3±56.0
	CHO	619.9±96.1	581.9±84.0	669.2±36.4	431.4±58.1*
	Total	2067.8±68.6 <sup>b</sup>	1853.0±29.7	1405.7±51.8 <sup>b</sup>	1277.8±68.6 <sup>b</sup>
Total	Protein	2125.5±97.8	2634.7±125.0*	1032.5±84.0	1357.2±187.3
	Fat	1925.3±267.1	1324.6±249.5	1155.4±134.6	1417.0±119.5
	CHO	1824.6±269.6	1659.9±262.9	1871.0±110.4	1320.9±107.8*
	Total	5875.4±171.4	5619.2±349.4	4058.8±118.7	3864.4±166.4
	FE	1.54±0.1	0.85±0.1*	0.94±0.1	0.45±0.1*

Means in a same column for each macronutrient without a common letter differ,  $P < 0.05$  between the 3 weeks.

\*  $p < 0.05$ , significant difference between Lou and F344 (Student's  $t$ -test).

F344 = 5875.4 ± 171.4 kJ and Lou = 5619.2 ± 349.4 kJ; and females, F344 = 4058.8 ± 118.7 kJ and Lou = 3864.4 ± 166.4 kJ. When energy was expressed in kJ/100 g of body weight, the values were very identical: males, F344 = 2124.9 ± 56.8 kcal and Lou = 2248.9 ± 34.01 kcal; and females, F344 = 2420.4 ± 60.1 kcal and Lou = 2505.3 ± 19.1 kcal.

ANOVA repeated measures were performed on each macronutrient intake for both strains and sexes during the 3 experimental weeks. As regarding the three macronutrient intakes (Table 1), it revealed that male and female Lou rats exhibited a significant higher protein intake as compared to F344 rats [strain effect,  $p = 0.006$ ; strain × time effect,  $p = 0.0001$ ], whereas no strain difference was found between F344 and Lou for CHO and fat intakes. Female F344 rats ingested more CHO as compared to Lou rats [strain effect,  $p = 0.004$ ; strain × time effect,  $p = 0.003$ ], while fat and protein intakes were significantly lower in F344 than in Lou rats [strain × time,  $p < 0.002$ ; and time effect,  $p = 0.05$ , respectively].

In F344 males, Tukey's test revealed a significant higher protein intake during the 2nd week and 3rd week and a lower intake for Lou rats in the same weeks. On the other hand, no difference for protein, fat and CHO intakes between the 3 experimental weeks was found in female strains. The total energy intake was higher during the 2nd and 3rd weeks for F344 female ( $p < 0.05$ ) and during the 1st week for Lou female rats ( $p < 0.01$ ).

Percentages of each macronutrient intake (Fig. 1) were calculated as the relative amount of calories provided by each macronutrient source against the total calories ingested. The percentage for the 3 weeks show that F344 males and females ingested less proteins than Lou, but these differences were significant only for males. CHO was significantly preferred in F344 females ( $P < 0.001$ ), while fat was identically ingested in both sexes for the two strains.

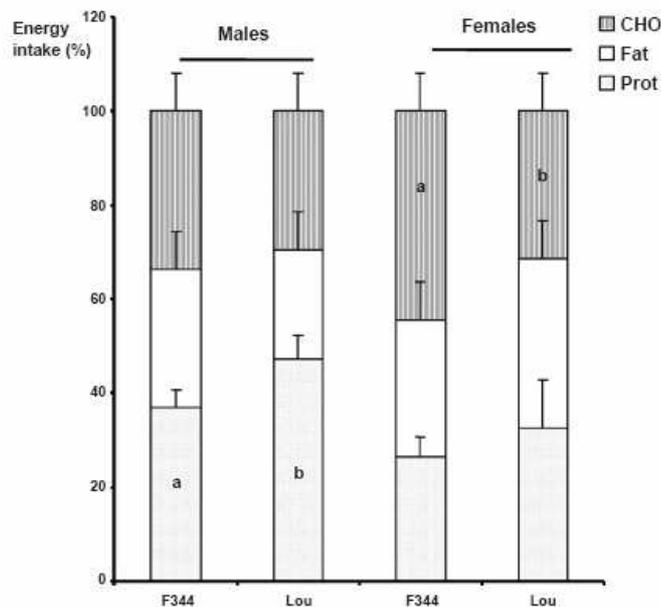


Fig. 1. Percentage of macronutrient intakes in Lou and F344 rats i.e. the relative amount of energy (kJ) provided by protein (Prot), fat (Fat) and carbohydrate (CHO). Within the same sex, bars labeled with different letters are statistically different ( $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test).

Table 2  
Body composition, leptinemia and insulinemia of 12-week-old Lou and F344 rats

	Males		Females	
	Fischer (n=8)	Lou (n=8)	Fischer (n=8)	Lou (n=8)
Initial body weight (g)	192.05±6.53	179.20±4.91	131.83±2.92	127.50±5.06
Final body weight (g)	277.25±8.47*	250.20±6.60	167.69±2.32	165.67±7.02
BWG (final–initial)	85.20±5.40	66.79±4.39*	35.86±2.74	36.91±2.41
Carcass (g)	137.83±3.74	138.11±4.69	84.81±1.34	88.64±3.20
Carcass/BW (%)	49.78±0.69*	55.13±0.69	50.58±0.48*	53.69±1.02
WAT (g)				
Mesenteric	5.64±0.32*	3.30±0.17	2.96±0.16	2.84±0.21
Perigonadoneal	6.72±0.46*	3.01±0.23	5.71±0.34*	3.90±0.62
Retroperitoneal	6.92±0.54*	2.81±0.14	2.83±0.25*	2.15±0.26
Subcutaneous	12.53±0.32*	6.56±0.69	6.71±0.40*	3.42±0.27
Total WAT	31.80±2.29*	15.68±0.80	18.21±0.91*	12.31±1.20
WAT/carcass (%)	23.04±1.61*	11.49±0.79	21.45±0.99*	13.76±1.07
BAT (g)				
Interscapular	0.52±0.06*	0.37±0.03	0.44±0.02	0.37±0.04
Perirenal	0.66±0.12*	0.35±0.04	0.34±0.03	0.37±0.03
Total BAT	1.18±0.17*	0.72±0.04	0.79±0.04	0.74±0.04
BAT/carcass (%)	0.87±0.15*	0.52±0.03	0.93±0.05	0.84±0.05
Heart (g)	0.78±0.02	0.84±0.05	0.55±0.02	0.58±0.02
Spleen (g)	0.64±0.02*	0.43±0.04	0.51±0.02*	0.38±0.02
Liver (g)	9.92±0.41*	7.88±0.34	5.69±0.15	5.25±0.24
Leptinemia (ng/ml)	1.64±0.04*	1.26±0.03	1.56±0.03*	1.27±0.04
Insulinemia (pmol/ml)	435.4±39.6*	246.5±39.8	291.7±39.8*	166.7±23.6

BW=body weight; BWG=body weight gain; WAT=white adipose tissue; BAT=brown adipose tissue; carcass=muscles+skeleton.

\*  $p < 0.05$ , significant difference between Lou and F344 rats within the same sex.

### 3.2. Food efficiency

Food efficiency is represented by the ratio of the body weight gain (BWG) expressed in mg by the total energy (kJ) intake during the same period, thus BWG obtained with 1 kJ. In both sexes, the food efficiency was significantly higher in F344 than in Lou rats (Student's *t*-test,  $p < 0.01$ ) during the whole experiment (Table 2).

### 3.3. Body weight

The first week represented the habituation to the self-selecting diet. At their arrival, the two strains had identical body weight in both sexes. After 3 experimental weeks, F344 male rats presented a significant higher body weight than Lou male rats ( $p < 0.05$ , Table 2): 85.2±5.5 g for F344 and 66.8±4.4 g for Lou rats; while in females, no difference was found between F344 and Lou rats during the 3 weeks: F344 gained 35.8±2.7 g and Lou 36.9±2.4 g (ns).

### 3.4. Body composition and metabolic profiles (Table 2)

At the end of the experiment, F344 male rats had a significantly higher body weight than Lou males, but females had identical body weights. The carcass (muscles+skeleton)

mass did not differ between strains for both sexes. But when expressed as the percentage of total body weight, carcass of F344 rats was significantly lower than that of Lou rats for both sexes. Fat pads exhibited the most striking weight differences. F344 rats had more retroperitoneal, perigonadoneal, and subcutaneous white adipose tissues ( $p < 0.05$ ) regardless of the sex. The mesenteric white adipose tissue was significantly higher in F344 than in Lou males. As for the other tissues, we noted that in males, F344 rats had a higher weight for spleen, liver and BAT; while in females, only spleen was heavier for F344.

Plasma insulin levels in both sexes were significantly ( $p < 0.05$ ) higher in F344 than in Lou rats. As for insulin, plasma leptin levels were significantly ( $p < 0.05$ ) higher in F344 than in Lou rats (Table 2).

### 3.5. Thermogenesis

Fig. 2 shows the relationship between the respiratory rate and membrane potential. For all groups proton conductance appeared to be dependent on membrane potential and high potential membrane values were enhanced. Experiment using GDP, which inhibits the uncoupling protein-1 (UCP-1), allowing the observation of respiratory rate in relation to membrane potential without the UCP-1 activity, showed that, as expected, there was no difference between F344 and Lou rats. Without GDP, comparison of force–flux relationships

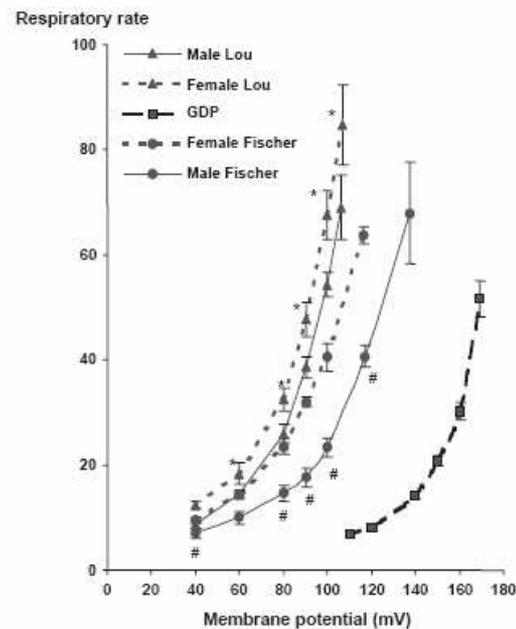


Fig. 2. Representative variations of respiratory rate (expressed in nmol oxygen per minute per mg mitochondrial proteins) with membrane potential (mV) in interscapular BAT mitochondria of Lou and F344 rats. \* $p < 0.05$ , significant difference between Lou and Fischer female; # $p < 0.05$ , significant difference between Lou and Fischer males.

showed that, over the whole range of membrane potential, the respiratory rate and thus proton conductance was higher in Lou rats, both males and females, than in F344 rats, indicating a significant specific stimulation of BAT mitochondria thermogenic activity in Lou rats due to the enhanced UCP-1 activity. Moreover, the IBAT mitochondrial protein yield was slightly increased in Lou rats of both sexes: males, F344=10.0±0.6 mg and Lou=13.2±0.6 mg ( $p<0.01$ ); and females, F344=11.1±0.5 mg and Lou=13.5±0.4 mg ( $p<0.01$ ). Both results indicated enhanced BAT thermogenesis in the Lou strain.

#### 4. Discussion

The present results showed large differences in feeding behavior, metabolic characteristics and body composition between F344 and Lou rat strains and illustrated the relevance of the Lou strain as a model of obesity resistance. It has been reported that Lou rats exhibit a spontaneous 40% reduction of caloric intake resulting in a reduced growth rate and no development of obesity with age [16,17]. Comparisons of the present data on food intake in F344 and Lou rats during a 3-week observation (weeks 10–11–12 of age) revealed no significant difference in total energy intake but their food choice was not the same. However, the F344 rats were fatter than Lou rats, as observed by Héliers et al. [2] 10 weeks later. This suggests that the mechanism responsible for the regulation of the body composition in Lou rats takes place very early in life. Although it is now well established that Lou rats exhibit a spontaneous reduction in growth rate [16,17], direct comparisons of changes in body weight at a younger age between F344 rats and their Lou counterparts have never been reported. Our results showed that the two strains of rats did not answer identically, despite having the same energy intake. In rats prone to obesity (F344), increase in body weight was the result of an increase in fat pads while the opposite results were found in rats resistant to obesity (Lou), i.e. an increase in carcass (muscles+skeleton), which can be explained by the high protein intake in Lou rats as reported by Lacroix et al. [18].

One of the main findings of this study was that several characteristics of body composition were different between F344 and Lou rats, although total energy intake through the 3 weeks of experiment was identical. The most striking feature of these differences in body composition was that the weight of total white adipose tissue was much more higher in F344 than Lou rats. Indeed, the weight of white adipose tissue, especially the weight of retroperitoneal white adipose tissue, whose growth is correlated with the accretion of body lipid [19], are markedly higher in F344 rats compared to Lou. The low fat mass in Lou rats could be partly explained by the higher energy expenditure noticed. This finding suggests an increased mobilization of metabolic substrates, which allow an increased energy expenditure and finally a reduced fat mass.

The intrascapular brown adipose tissue is specialized in heat production and the sympathetic nervous system is the major effector of thermogenesis through the release of noradrenaline from nerve endings present in both vessels and adipocytes

[20,21]. In brown adipose tissue, noradrenaline activates proliferation [22,23] mainly through  $\beta$ -receptors, and induces the UCP-1 expression [24]. UCP-1 uncouples the mitochondrial respiratory chain from oxidative phosphorylation so that energy, instead of being used for ATP production, is dissipated as heat. Genetically, Zucker or glutamate-induced obese rats show a reduced activity of the sympathetic nervous system, which participates in the reduced thermogenic function of interscapular brown adipose tissue and in this way contributes to the development of obesity [25–27]. Thus, the enhanced respiratory rate with membrane potential in mitochondrial IBAT of Lou rats could lead to a change in the thermogenic capacity partly accounting for the higher resting metabolism observed in this strain [28]. The lower food efficiency measured in Lou rats together with a low amount of fat tissue also suggested an increased loss of energy by thermogenesis in this strain. Compared to F344 rats, there was no difference in food intake expressed per 100 g of body weight, this attests a better general metabolic rate of Lou rats than F344. The higher plasma leptin levels in F344 together with the high WAT could be possibly due to a tendency of leptin resistance. In fact, leptin plays a role in the regulation of feeding by inhibiting appetite but also enhances energy expenditure by stimulating lipolysis in white adipose tissue [29]. In rats, insulin stimulates leptin secretion [30–32], whereas leptin suppresses the secretion of insulin from pancreatic islet cells. The high plasma insulin levels associated with the high levels of leptin noticed in F344 rats confirmed the proneness of leptin resistance in this strain.

#### References

- [1] Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med* 1995;332:621–8.
- [2] Héliers JM, Diané A, Langlois A, Larue-Achagiotis C, Fromentin G, Tomé D, et al. Comparison of fat storage between Fischer 344 and obese-resistant Lou/C rats fed different diets. *Obes Res* 2004;13:3–10.
- [3] Schwartz MW, Prigeon RL, Kahn SE, Nicolson M, Moore J, Morawiecki A, et al. Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms. *Diabetes Care* 1997;20:1476–81.
- [4] Woods SC, Seeley RJ. Insulin as an adiposity signal. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:S35–8.
- [5] Marks JL, Porte Jr D, Stahl WL, Baskin DG. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 1990;127:3234–6.
- [6] Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:855–72.
- [7] Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Turner N. Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol* 1997;273:E226–30.
- [8] Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763–70.
- [9] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995;1:1155–61.
- [10] Lonnqvist F, Wennlund A, Amer P. Relationship between circulating leptin and peripheral fat distribution in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:255–60.
- [11] Veyrat-Durebex C, Boghossian S, Alliot J. Age-related changes in adaptive mechanisms of macronutrient self-selection: evidence for a sexual dimorphism. *Mech Ageing Dev* 1998;103:223–34.

- [12] Jean C, Fromentin G, Tome D, Larue-Achagiotis C. Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high-protein, high-lipid diet. *Physiol Behav* 2002;76:65–73.
- [13] Cannon B, Lindberg O. Mitochondria from brown adipose tissue. Isolation and properties. *Meth Enzymol* 1979;60:65–78.
- [14] Goubern M, Yazbeck J, Chapey MF, Diolez P, Moreau F. Variations in energization parameters and proton conductance induced by cold adaptation and essential fatty acid deficiency in mitochondria of brown adipose tissue in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1990;1015:334–40.
- [15] Yonetani T, Ray GS. Studies on cytochrome oxidase. kinetics of the aerobic oxidase of ferrocytochrome *c* by cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 1965;240:3392–8.
- [16] Boghossian S, Veyrat-Durebex C, Alliot J. Age-related changes in adaptive macronutrient intake in swimming male and female Lou rats. *Physiol Behav* 2000;69:231–8.
- [17] Veyrat-Durebex C, Alliot J. Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol Behav* 1997;62:1273–8.
- [18] Lacroix M, Gaudichon C, Martin A, Morens C, Mathe V, Tomé D, et al. A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R934–42.
- [19] Newby FD, DiGirolamo M, Cotsonis GA, Kutner MH. Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. *Am J Physiol* 1990;259:R1117–25.
- [20] Lever JD, Mukherjee S, Norman D, Symons D, Jung RT. Neuropeptide and noradrenaline distributions in rat interscapular brown fat and in its intact and obstructed nerves of supply. *J Auton Nerv Syst* 1988;25:15–25.
- [21] Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 1993;34:1057–91.
- [22] Geloën A, Collet AJ, Guay G, Bukowiecki LJ. Beta-adrenergic stimulation of brown adipocyte proliferation. *Am J Physiol* 1988;254:C175–82.
- [23] Geloën A, Collet AJ, Bukowiecki LJ. Role of sympathetic innervation in brown adipocyte proliferation. *Am J Physiol* 1992;263:R1176–81.
- [24] Rohlfis EM, Daniel KW, Premont RT, Kozak LP, Collins S. Regulation of the uncoupling protein gene (*Ucp*) by beta 1, beta 2, and beta 3-adrenergic receptor subtypes in immortalized brown adipose cell lines. *J Biol Chem* 1995;270:10723–32.
- [25] York DA, Marchington D, Holt SJ, Allans J. Regulation of sympathetic activity in lean and obese Zucker (*fa/fa*) rats. *Am J Physiol* 1985;249: E299–305.
- [26] Rehorek A, Kerecsen L, Muller F. Measurement of tissue catecholamines of obese rats by liquid chromatography and electrochemical detection. *Biomed Biochim Acta* 1987;46:823–7.
- [27] Blouquit MF, Geloën A, Koubi H, Edwards D, Grippo D. Decreased norepinephrine turnover rate in the brown adipose tissue of pre-obese *fa/fa* Zucker rats. *J Dev Physiol* 1993;19:247–51.
- [28] Perrin D, Soulage C, Pequignot JM, Geloën A. Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* 2003;46:1489–96.
- [29] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269:543–6.
- [30] Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang MY, Trieu F, et al. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6386–90.
- [31] Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 1995;377:527–9.
- [32] Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, et al. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 1996;45:1435–8.

**Etude 3 : Processus de régulation et d'adaptation au stress : Mise en application à l'étude de l'effet d'un aliment fonctionnel sur le stress**

## Introduction

De nombreux facteurs nutritionnels sont impliqués dans le processus de régulation et d'adaptation au stress par l'organisme.

Les protéines plus particulièrement les acides aminés jouent un rôle privilégié dans ce processus en intervenant directement sur la régulation des neuromédiateurs centraux impliqués dans le stress. Plusieurs mécanismes d'action sont évoqués :

- certains acides aminés sont à l'origine de la biosynthèse des neuromédiateurs : la tyrosine et la phénylalanine précurseurs des catécholamines (Dopamine et Noradrénaline), et le tryptophane pour les indolamines (Sérotonine). Il existe un lien direct entre les apports nutritionnels et la biosynthèse de ces neuromédiateurs.

- certains peptides, issus du catabolisme digestif des protéines ou directement présents dans les protéines natives peuvent aussi avoir une action directe sur les centres régulateurs du système nerveux central impliqués dans le stress. Parmi ces peptides, il existe des peptides à activité opioïde comme la lactomorphine et la casomorphine et des peptides à activité GABAergique ou modulateurs de l'activité sérotonergique.

En application clinique, pour corriger le déséquilibre des neuromédiateurs induits par le stress, un apport de tyrosine est préconisé afin de maintenir un taux optimal de dopamine, souvent altéré par les réactions adrénérergiques du stress, via la tyrosine-amino-transférase dont l'activité est accrue.

Il existe aussi des effets anxiolytiques, adaptogènes et antistressogènes des peptides tels que l' $\alpha$ -lactorphine et le décapeptide SR1 $\alpha$  ou F200 du petit lait.

Certains acides gras polyinsaturés particulièrement la série n-3 jouent eux aussi un rôle important dans le processus d'adaptation et de régulation du stress. C'est ainsi que Delarue J et coll. [247], ont montré que dans le cas d'un stress mental, une supplémentation en acides gras de la série n-3 entraînait une diminution significative des taux d'adrénaline, de cortisol. Ils concluaient que la supplémentation en acides gras de la série n-3 réduisait la stimulation surrénalienne au cours du stress mental.

Des extraits de levure semblent aussi avoir un effet anti-stress observé sur différents animaux d'élevage (porc, volaille). Cet effet n'est cependant pas objectivé par des études précises de stress. Les mécanismes d'action et le(s) principe(s) actif(s) impliqué(s) ne sont pas connus.

L'objectif de ce projet se propose de confirmer un éventuel effet anti-stress d'extraits de levure sur le modèle du rat soumis à un stress.

L'effet anti-stress a été évalué (1) par l'étude de paramètres comportementaux, comme la prise alimentaire et le niveau d'anxiété (test open field) ; (2) par la mesure de paramètres

physiologiques comme les concentrations de corticostérone et d'ACTH. Si cet effet est confirmé, ce modèle pourra être utilisé pour approfondir les mécanismes de cette activité et identifier le(s) principe(s) actif(s).

## 1 Matériel et méthodes

### 1.1 Animaux, alimentation et complémentation

L'étude est réalisée sur des rats mâles Wistar (n=48) divisé en 6 groupes de 8 rats.

A leur arrivée les rats sont hébergés en cage individuelle et acclimatés aux conditions de température (22±1°C) et de cycle inversé jour/nuit 12 :12h avec début de nuit à 10h. Les rats reçoivent l'eau et une alimentation standard P14 (tableau) à volonté. Ils sont pesés tous les jours et leur prise alimentaire est mesurée toutes les 3 heures. La ligne de base est établie, elle est représentée par les 2 derniers jours avant le stress.

Après deux semaines d'habituation au cycle inversé et au régime P14, les rats reçoivent, pendant 5 jours, avant le stress, puis pendant les 3 jours de stress, à 9h30 une dose quotidienne orale (par gavage) de 0,2 ml contenant l'extrait de levure (L) à la dose **de 0 mg/kg** (témoin), **50 mg/kg**, **100 mg/kg**, et **150 mg/kg**, selon le groupe. Un 2<sup>e</sup> groupe de rats témoins, positif reçoit par injection intrapéritonéale (10 mg/kg) une molécule active de référence (**valium, diazepam**). Les résultats seront comparés à un 3<sup>e</sup> groupe témoin sans stress.

Groupe	Témoin		Stress 3 jours		
	T	L0	L50	L100	L150
Dose extrait		0 mg/kg**	50 mg/kg**	100 mg/kg**	150 mg/kg**
Effectif	8	8	8	8	8
Temps (sem)	3	3	3	3	3

**Tableau :** Répartition des groupes selon la dose d'extrait, \*\*administration par voie orale.

## 1.2 Procédure expérimentale

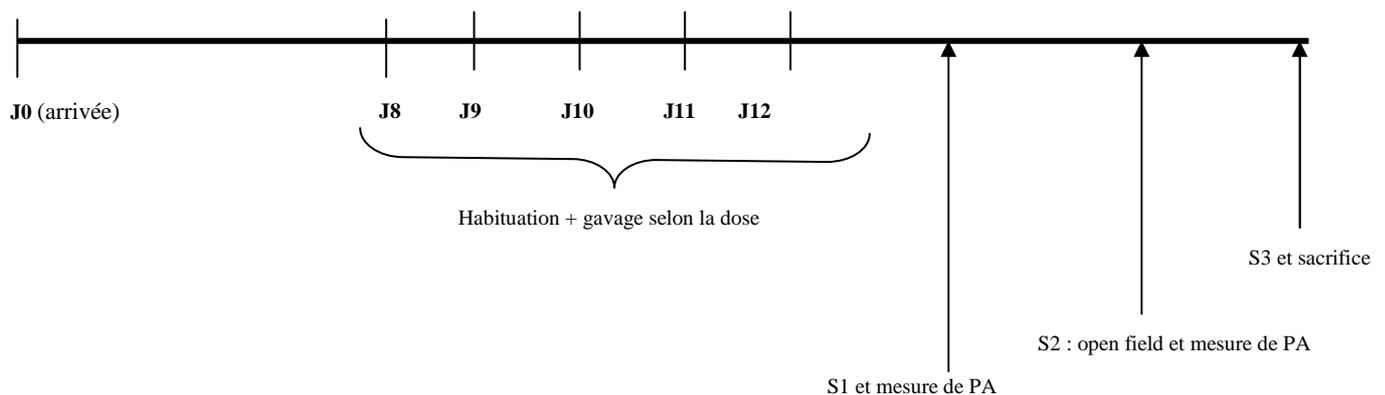
### 1.2.1 Procédure d'application des conditions de stress

Nous avons choisi de soumettre les rats à un stress aigu (15mn de nage dans un bac rempli au  $\frac{3}{4}$  avec de l'eau tiède, 37° environ, pendant trois jours consécutifs). Ce protocole a été validé dans l'étude 1 et montre que la diminution de la prise alimentaire est significative durant les 3 premières heures après le stress appliqué en début de nuit. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études utilisant des stress différents [166, 184, 200].

### 1.2.2 Protocole suivi

Excepté le groupe témoin, tous les groupes ont suivi la procédure suivante, en raison d'un groupe toutes les 2 semaines. Nous avons évalué d'abord l'effet du stress sur la prise alimentaire.

- Au cours du **1<sup>er</sup> jour** de stress, la prise alimentaire est mesurée toutes les 3 heures,
- Au **2<sup>e</sup> jour** de stress, les rats subissent d'abord un test **d'openfield**, dispositif permettant d'évaluer le niveau d'anxiété pendant 5 minutes, puis ils sont replacés dans les cages pour mesurer à nouveau la prise alimentaire.
- Au **3<sup>e</sup> jour** les rats sont sacrifiés à la guillotine juste après le stress, du sang est recueilli puis centrifugé et le plasma est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  afin de mesurer les marqueurs biologiques du stress (corticotérostérone et ACTH)

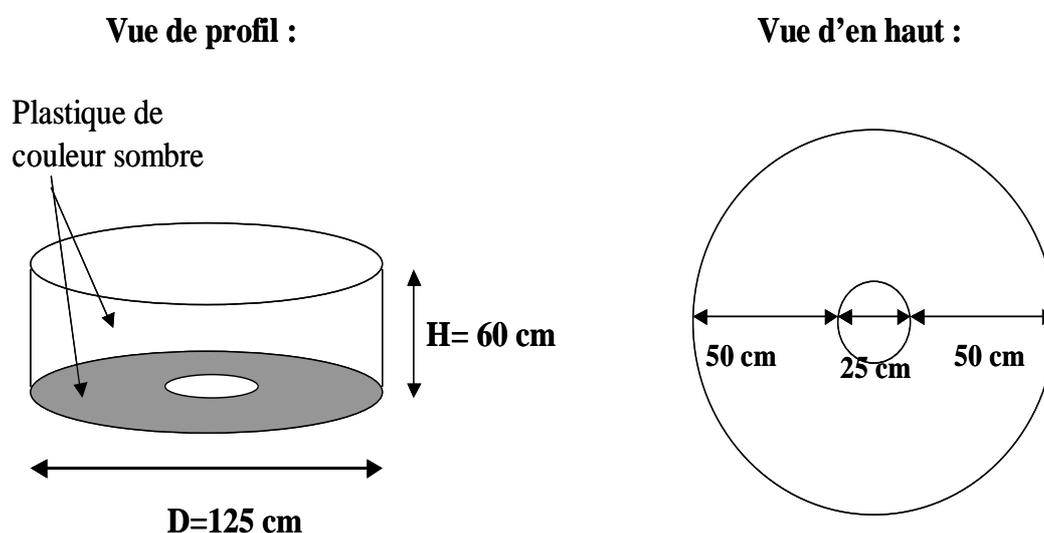


### 1.2.3 Test du niveau d'anxiété des animaux

Pour tester le niveau d'anxiété, un dispositif de test du stress en open field a été utilisé. Il s'agit d'une enceinte cylindrique en matière plastique sombre ouverte en haut, à fond

également sombre avec une pastille blanche en plastique collée au centre. Tous les rats sont testés entre 10h et 11h. Un par un, les rats sont déposés au centre de l'enceinte cylindrique, au niveau de la zone claire et considérée comme aversive, puis ils sont ainsi laissés dans cette enceinte, au calme, pendant 5 minutes ; ils sont filmés pendant toute cette période. Différents paramètres sont mesurés lors du dépouillement des vidéos, ce qui permet d'évaluer le niveau d'anxiété des animaux : nombre de zones périphériques traversées, nombre de redressements, nombre de traversées de la case centrale, durée de séjour dans la case centrale, miction/défécation, nombres de toilettages du museau [248].

#### 1.2.4 Dispositif du test de stress en openfield



**Figure 17 :** Schémas du dispositif de l'open field

## 2 Analyses statistiques :

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. La prise alimentaire, le gain de poids de chaque rat sont comparés aux valeurs de leur propre ligne de base. Ces facteurs ont été analysés à partir de l'analyse de variance ANOVA one-way avec stress et dose comme facteurs. Après une différence statistique, la comparaison post-hoc sur les moyennes est effectuée en utilisant le test de Tuckey. Le niveau d'anxiété est aussi analysé par ANOVA. La différence significative est retenue avec  $p < 0.05$ .

### 3 Résultats

Nous avons décidé de ne pas présenter le groupe diazépam dans les résultats car, d'une part, il a été traité différemment (injection intrapéritonéale alors que les autres groupes ont reçu le produit par voie orale ce qui constitue un biais dans le protocole) et d'autre part, la dose utilisée, probablement trop élevée, a entraîné une torpeur des rats de ce groupe dans l'openfield.

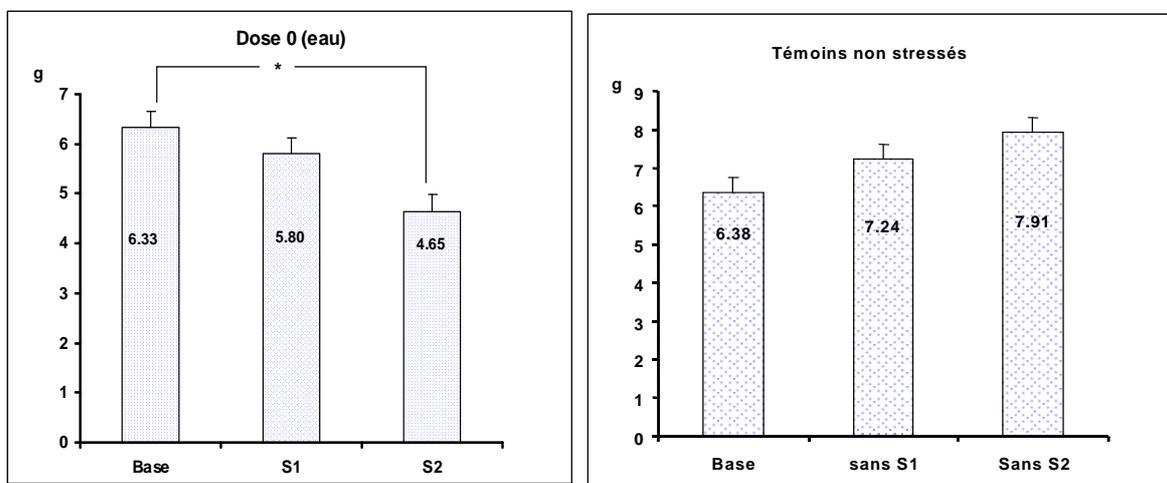
#### 3.1 Evolution relative du poids des animaux (%)

Groupes	Base	Stress	p
0mg/kg (stressés)	100	78.0 ± 8.2	0.04
50mg/kg	100	104.5 ± 13.3	0.78
100mg/kg	100	93.4 ± 10.3	0.60
150mg/kg	100	84.0 ± 5.3	0.07
Témoins	100	101.6 ± 9.2	0.89

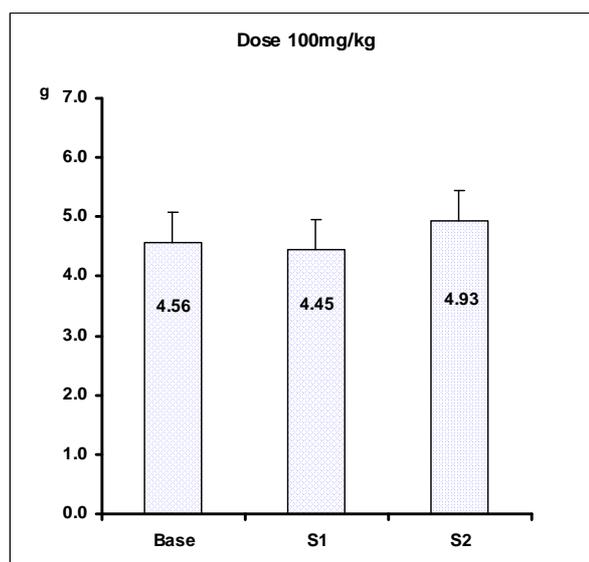
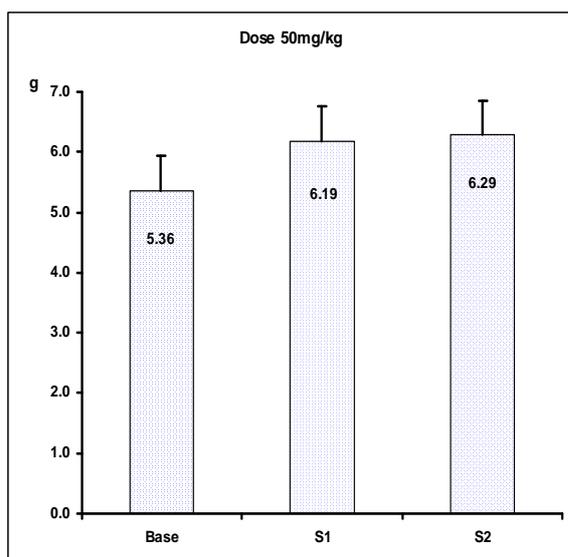
Dans ce tableau, nous constatons que les groupes ayant reçu le produit ainsi que le groupe témoin, ne présentent aucune variation significative du gain de poids après le stress comparé à la base. Par contre le groupe recevant la **dose zéro** manifeste une diminution significative du gain de poids (-22%) après le stress.

Ces résultats montrent que le produit a un effet protecteur sur la diminution du gain de poids induite par le stress.

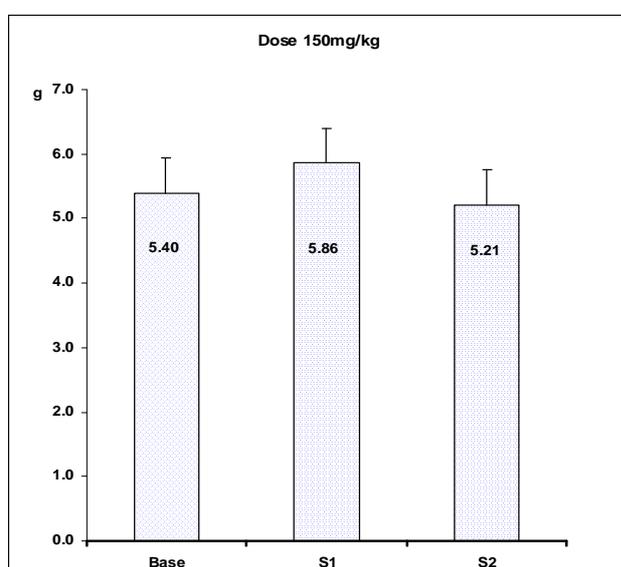
#### 3.2 La prise alimentaire



**a-**Dose 0: effet significatif du stress sur la PA ( $p < 0.05$ ) **b-** pas de diminution de la PA



c- Dose 50 : pas d'effet du stress sur la PA d- Dose 100 : pas d'effet du stress sur la PA



e- Dose 150 : aucun effet stress sur la PA

S1 : 1<sup>er</sup> jour de stress; S2: 2<sup>e</sup> jour de stress

**Figure 18** : figures (a-e) représentatifs de la consommation alimentaire des 3 premières heures.

Le stress ne modifie pas la prise alimentaire des 24h quel que soit le groupe considéré.

En observant la prise alimentaire mesurée toutes les 3 heures, on constate que seul le groupe qui n'a pas reçu le produit (groupe 0mg/kg) a réduit sa PA comparée à la base, en conséquence du stress subi. Les autres groupes ne modifient pas leur prise alimentaire.

Aucune différence n'a été observée entre les différentes doses de produit comparées entre elles.

Etant donné que c'est au 2<sup>e</sup> jour du stress qu'on a une diminution significative, la comparaison entre les groupes à l'aide d'une ANOVA (analyse multiple range) montre une

différence significative de tous les groupes par rapport au groupe ne recevant pas le produit (0 mg/kg).

### 3.3 Paramètres d'anxiété

La réponse au stress suivant les groupes a également été évaluée par l'étude de certains paramètres comportementaux dans le dispositif de stress openfield. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant.

Groupes	Témoin	0mg/kg	50mg/kg	100mg/kg	150mg/kg
Temps de séjour au centre (secondes)	12.6 ± 3.3 <sup>b</sup>	6.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	9.7 ± 1.3 <sup>b</sup>	10.2 ± 3.5 <sup>b</sup>	<b>19.5 ± 3.5<sup>c</sup></b>
Nombre de traversée de la case centrale	3.2 ± 0.6	3.2 ± 0.8	3.6 ± 0.5	2.5 ± 0.5	4.8 ± 0.52
Nombre total de cases traversées	47.7 ± 4.5	55.0 ± 4.8	51.8 ± 3.7	42.7 ± 4.2	58.2 ± 3.20

Sur une même ligne, les moyennes avec des lettres distinctes sont significativement différentes.

Tout d'abord, on ne note aucune variation significative du nombre de cases traversées, ce qui montre que ni le stress appliqué, ni la complémentation n'ont eu d'effet sur le comportement locomoteur.

Le paramètre le plus intéressant est le **temps de séjour dans la case centrale** considérée comme aversive. Nos résultats montrent que seul le groupe 0mg est resté significativement moins longtemps dans la case centrale que le groupe non stressé. On peut y voir le signe de l'effet du stress sur les animaux témoins stressés ne recevant pas le produit (groupe 0 mg/kg) : ils sont donc, plus anxieux. Le plus grand effet a été observé avec la dose 150mg.

Par contre, on ne constate pas de différence entre les groupes complémentés stressés et le groupe témoin non stressé. D'après ce critère, on peut conclure que ce produit a un effet anti-stress.

### 3.4 Paramètres biologiques :

Groupes	Témoin	0mg/kg (stressés)	50mg/kg	100mg/kg	150mg/kg
ACTH (ng/dl)	14.6 ± 4.8 <sup>a</sup>	35.6 ± 7.1 <sup>b</sup>	34.2 ± 3.4 <sup>b</sup>	47.4 ± 9.3 <sup>c</sup>	23.5 ± 2.6 <sup>b</sup>
Corticostérone (µg/dl)	1.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.3 <sup>c</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>b</sup>

Taux de corticostérone et d'ACTH plasmatiques : Sur une même ligne, les moyennes avec des lettres distinctes sont significativement différentes.

Les taux de corticostérone et d'ACTH plasmatiques sont significativement plus élevés chez le groupe 0 mg/kg stressé comparés à ceux du groupe témoin ce qui atteste la validité du protocole utilisé (effet du stress).

Par contre pour les groupes ayant reçu le traitement, on n'observe pas d'effet protecteur du produit sur ces deux marqueurs biologiques du stress et ce, quelle que soit la dose.

### 4 Conclusion de l'étude:

A partir de cette étude, nous pouvons conclure qu'en ce qui concerne les paramètres comportement alimentaire et anxiété, le produit a un effet anti-stress qui s'est traduit par la non diminution de la prise alimentaire. Nous constatons, dans l'open field, une augmentation du temps de séjour, dans la case centrale aversive, des animaux stressés et complémentés ce qui indique l'effet du produit sur ces paramètres d'anxiété.

Par contre on ne note aucun effet du produit sur les marqueurs biologiques du stress mesurés de manière ponctuelle après le stress (ACTH et corticostérone).

Il serait donc intéressant :

- de mener une étude beaucoup plus approfondie afin de pouvoir mesurer la cinétique de ces deux marqueurs pendant 24h en utilisant des rats porteurs d'un cathéter cardiaque permettant des prises de sang répétées, et de tenir compte de l'influence du rythme circadien.
- de mesurer le CRF et le NPY au niveau central. Ces hormones contrôlent à la fois la prise alimentaire, la production d'ACTH, et celle de corticostérone et elles sont les premières à être dérégulées à la suite d'un stress.

- de rechercher un effet du produit sur l'autre grande voie de la réponse physiologique et neurophysiologique au stress que constituent la suractivation du système noradrénergique central et celle du système nerveux sympathique. Il faudrait pour cela envisager des dosages de l'adrénaline et de la noradrénaline plasmatique après le stress.

Pour la suite de cette étude qui est en cours, un fractionnement du produit en plusieurs extraits et peptides a été effectué afin de voir s'ils ont une action identique au produit standard ou bien s'il y a une peptide ou extrait plus efficace.

Des études ultérieures sont aussi nécessaires afin de comprendre les mécanismes d'action de cette levure au niveau central sans doute.

## DISCUSSION GENERALE

### **Influence du stress sur le choix alimentaire**

Les résultats présentés dans cette partie montrent clairement une différence concernant les choix alimentaires entre les rats mâles et femelles. A âge égal, les mâles ingèrent plus de protéines et de glucides que les femelles alors que l'inverse est observé pour les lipides. Ceci est en accord avec les résultats de Jean et coll.[96]. Cette étude montre, que le stress a non seulement des effets quantitatifs mais aussi des effets qualitatifs sur le choix alimentaire.

Notre modèle de stress cause une inhibition brève mais significative de la prise alimentaire et du gain de poids. Les réductions du gain de poids constatées dans nos deux protocoles expérimentaux sont comparables à celles obtenues par d'autres auteurs avec comme type de stress, l'immobilisation [249]. Dans les deux expériences, la prise énergétique journalière n'est pas modifiée malgré la réduction du gain de poids. Ceci suggère que les mécanismes responsables de la réduction du gain de poids chez les rats stressés ne dépendent pas seulement de l'apport énergétique.

La déplétion de la prise alimentaire après le stress n'a lieu qu'au cours des 3 premières heures qui suivent, ceci a été montré par d'autres auteurs [184], [166].

En ce qui concerne le choix en macronutriment, dans notre modèle expérimental, on constate que les mâles et les femelles ne répondent pas identiquement après le stress. Les deux groupes de rats (mâles et femelles) réduisent leur prise énergétique durant les 3 premières heures suivant le stress, par contre un rebond hyperphagique est observé plus tard chez les femelles afin de compenser l'hypophagie induite immédiatement après le stress. Ceci pourrait expliquer la faible inhibition du gain de poids chez les femelles comparée à celle des mâles.

Chez les mâles la réduction concerne les 3 macronutriments tandis que chez les femelles seule la prise lipidique est inhibée par le stress. Ces résultats sont semblables à ceux de Wang [250] qui n'a observé aucun effet du stress, chez les rats femelles, sur les prises protéique et glucidique. L'ingestion des glucides est moins sensible au stress, ceci est dû vraisemblablement à une ingestion faible de ce macronutriment chez les femelles en période basale. Ainsi cette faible ingestion de glucides est parallèle à une légère augmentation de consommation protéique. Il a été démontré qu'un repas riche en protéines, améliore l'utilisation périphérique des acides aminés neutres aux dépens du tryptophane ce qui favorise le passage de cet acide aminé à travers la barrière hémato-méningée et facilite ainsi la synthèse de la sérotonine [188],[178]. La sérotonine est considérée comme étant un puissant inhibiteur de la prise alimentaire. Plusieurs auteurs ont montré des changements de taux de

neuromédiateurs durant le stress. L'injection centrale de CRF et 5-HT inhibe la prise alimentaire et celle-ci pourrait être empêchée par les antagonistes des récepteurs de CRF [249]. Ce qui atteste l'implication des récepteurs CRF dans l'induction de la diminution de la prise alimentaire. L'activation du système CRF par le stress entraîne aussi une augmentation de la corticostéronémie périphérique. Les différentes mesures effectuées dans notre étude afin de déterminer la cinétique de corticostérone nous renseignent sur l'effet du stress concernant cette hormone. L'augmentation de la corticostéronémie avec un pic juste après le stress et un retour aux valeurs basales 3 heures après est en accord avec les résultats d'Armario et coll. [200].

Dans nos deux expériences, le stress est appliqué en début de nuit et le fort taux de corticostérone mesuré à ce moment là après le stress est en accord avec les résultats de Rybkin et coll. [166]. La différence de pic de corticostérone entre les mâles et femelles après le stress est probablement due à la plus grande vulnérabilité des femelles au stress telle que rapportée par plusieurs études [251] [238] [239] ce qui pourrait s'expliquer par la différence d'hormones sexuelles particulièrement l'estradiol qui influence l'activité de l'axe corticotrope [204] [102].

Il existe une corrélation inverse entre la corticostéronémie et l'insulinémie. L'équilibre entre ces deux hormones est un facteur déterminant dans la prise alimentaire et dans l'utilisation des nutriments. Ces deux hormones ont des effets opposés sur la prise alimentaire quand elles sont injectées dans le cerveau, et sur le choix des nutriments en injection périphérique [44]. L'effet anabolique de l'insuline est altéré par de fortes concentrations de corticostérone induites par le stress. En plus du corticostérone, l'activation de l'axe corticotrope par le stress induit la sécrétion des cytokines inflammatoires [252], de la prolactine [200] et inhibe la sécrétion des hormones de croissance. Toutes ces hormones influencent la prise alimentaire et le gain de poids. Ainsi les effets du stress sur la balance énergétique et du gain de poids impliqueraient l'interaction entre plusieurs systèmes hormonaux et neuronaux.

## **Variabilité génétique de l'axe corticotrope**

Dans la première étape de cette partie nous avons comparé l'activité et la réactivité de l'axe corticotrope entre les rats Lou et F344 mâles et femelles. Comparé au rat F344, le rat Lou est caractérisé par une faible sécrétion de corticostérone durant le rythme circadien et pendant la phase de récupération après un stress. Le stress métabolique a été aussi mis en exergue entre les deux souches de rats par injection d'insuline. Les résultats montrent une augmentation de la corticostéronémie chez les deux souches mais, qui est plus marquée chez les F344. L'injection d'insuline entraîne une diminution de la glycémie chez les deux souches mais cette diminution est plus accentuée chez les rats Lou comparés aux rats F344. Ceci atteste une tendance à l'insulino-résistance décrite chez le rat F344 [253].

Il a été montré que les perturbations du fonctionnement de l'axe corticotrope joueraient un rôle « permissif » dans les troubles métaboliques liés à l'obésité [254]. Dans la deuxième étape de cette partie nous avons essayé de mesurer les différences nutritionnelles et métaboliques entre les deux souches de rats Lou et F344 afin de déterminer si celles-ci pourraient être associées à la différence de fonctionnement de leur axe corticotrope.

Nos résultats montrent que le rat Lou présentait, à tous les âges, un poids inférieur au rat F344 notamment à cause d'une adiposité faible. Les deux souches de rats ne répondent pas identiquement, même à prise énergétique comparable. Chez les F344, l'augmentation du poids se traduit par une augmentation de la masse adipeuse alors chez les rats Lou elle se traduit par une augmentation de la masse maigre ; ceci pourrait s'expliquer par une forte ingestion protéique observée chez le rat Lou puisqu'il a été rapporté qu'un régime hyperprotéique entraînait une augmentation de la masse maigre au dépend de la masse adipeuse [255]. L'activité thermogénique mesurée par respiration mitochondriale au niveau du tissu adipeux brun interscapulaire, supérieure chez le rat Lou, ainsi qu'une faible prise alimentaire à l'âge de 21 semaines par rapport au rat F344 pourraient aussi être à l'origine de l'absence d'accumulation énergétique chez les rats Lou. Le tissu adipeux brun, spécialisé dans la production de chaleur, est responsable de 35 à 65 % de l'augmentation de la thermogénèse. Les adipocytes du tissu adipeux brun sont directement innervés par le système nerveux sympathique entraînant ainsi la libération de la noradrénaline [256]. La noradrénaline active la lipolyse et la thermogénèse via les récepteurs- $\beta$  et stimule ainsi l'expression d'UCP1 qui est une protéine découplante dans la chaîne respiratoire mitochondriale par phosphorylation oxydative, ainsi, l'énergie, au lieu d'être utilisée sous forme d'ATP, est dissipée sous forme de chaleur [257, 258] expliquant ainsi l'origine de l'activité thermogénique du tissu adipeux brun.

La faible efficacité alimentaire mesurée à l'âge de 12 semaines chez le rat Lou consécutive à une adiposité faible suggère une augmentation de la perte de chaleur par thermogénèse chez cette souche. Comparé au rat F344, aucune différence sur la prise énergétique exprimée par 100g de PC n'a été observée, ceci atteste un meilleur taux de métabolisme général observé chez le Lou.

En ce qui concerne l'influence des signaux d'adiposité (exemple de la leptine et de l'insuline) sur la gestion des réserves en énergie à long terme, nos résultats montrent une leptinémie plus élevée chez le rat F344 comparé au rat Lou. Or la leptine joue un rôle dans la régulation de la prise énergétique en inhibant l'appétit mais aussi améliore la dépense énergétique par stimulation de la lipolyse dans le tissu adipeux blanc [135]. En effet la forte adiposité notée chez le rat F344 accompagnée d'une leptinémie élevée pourrait être liée à une tendance à la leptino-résistance. Chez le rat, l'insuline stimule la sécrétion de leptine [259, 260], tandis que la leptine inhibe la sécrétion d'insuline au niveau des cellules du pancréas. Le taux élevé d'insuline plasmatique associé à une leptinémie élevée observée chez le rat F344 confirme une tendance à la leptino-résistance chez cette souche comme l'ont rapporté Perrin et coll. [261]. Pour valider cette hypothèse de non développement d'une résistance à l'insuline chez le rat Lou, des études utilisant la technique du clamp euglycémique-hyperinsulinique seront nécessaires.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif premier de ce travail était d'étudier l'influence du stress sur le gain de poids et sur la prise alimentaire particulièrement sur le choix en macronutriments. Nous avons postulé que le comportement alimentaire en réponse au stress pouvait varier selon l'état nutritionnel de l'animal. Autrement dit, nous avons voulu préciser dans quelle circonstance et dans quel sens le stress pouvait influencer le comportement alimentaire. Pour répondre à cette question, nous avons mené une étude sur modèle rat soumis à deux protocoles expérimentaux différents : d'une part les rats reçoivent l'aliment ad-libitum et d'autre part ils sont soumis à une restriction alimentaire (2 repas par jour). Les résultats montrent qu'un stress aigu (15min de nage par jour pendant 3 jours consécutifs) appliqué en début de la phase active entraîne une diminution du gain de poids journalier chez les rats Wistar mâles et femelles dans les deux protocoles expérimentaux. Le stress modifie temporairement le comportement alimentaire qui se traduit par une diminution de la prise alimentaire dès les premières heures après le stress. En ce qui concerne l'effet du stress sur le choix alimentaire on note un effet sexe : chez les mâles la réduction de la prise alimentaire entraînée par le stress concerne les trois macronutriments alors que chez les femelles c'est principalement la prise lipidique qui est affectée attestant ainsi l'effet qualitatif du stress sur la prise alimentaire. Au niveau hormonal nos résultats montrent une augmentation de la corticostéronémie après le stress et l'inverse pour l'insulinémie.

Etant donné l'implication des peptides centraux tels que CRF, NPY dans la régulation de la prise alimentaire chez le rat stressé, il serait intéressant d'envisager comme perspective une étude permettant de mesurer ces peptides afin d'élucider les mécanismes spécifiques d'actions et d'interaction mis en jeu lors du stress.

L'existence d'une variabilité génétique dans la réponse au stress nous a conduit, dans la deuxième partie de cette thèse, à comparer l'activité et la réactivité de l'axe corticotrope entre deux souches consanguines de rats. Un dysfonctionnement de l'axe corticotrope jouerait un rôle « permissif » dans les troubles métaboliques liés à l'obésité ce qui explique notre choix des deux souches de rats : les rats Lou résistants à l'obésité et les rats F344 qui sont obèses. Comparée à la souche F344, la souche Lou est caractérisée par une faible activité et réactivité de son axe corticotrope se traduisant d'une part par une faible sécrétion de corticostérone pendant le rythme circadien et durant la phase de récupération après un stress de contention et d'autre part par une plus grande efficacité des récepteurs GR et MR.

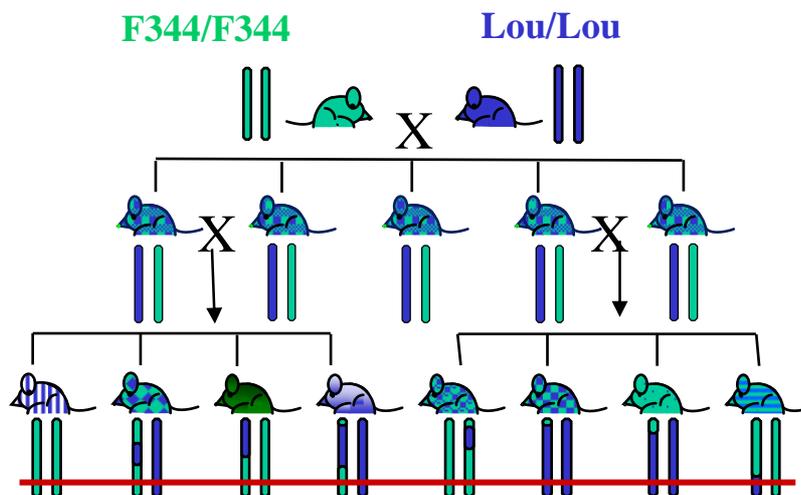
Les comparaisons nutritionnelles et métaboliques montrent des différences nettes entre les deux souches. Le rat F344 présente à tout âge un poids supérieur au rat Lou notamment à

cause d'une adiposité forte liée à l'augmentation de la prise énergétique accompagnée d'une diminution du métabolisme de base. La leptinémie et l'insulinémie élevées mesurées chez le rat F344 associées à une forte adiposité atteste une tendance à la leptino et à l'insulino-résistance chez cette souche.

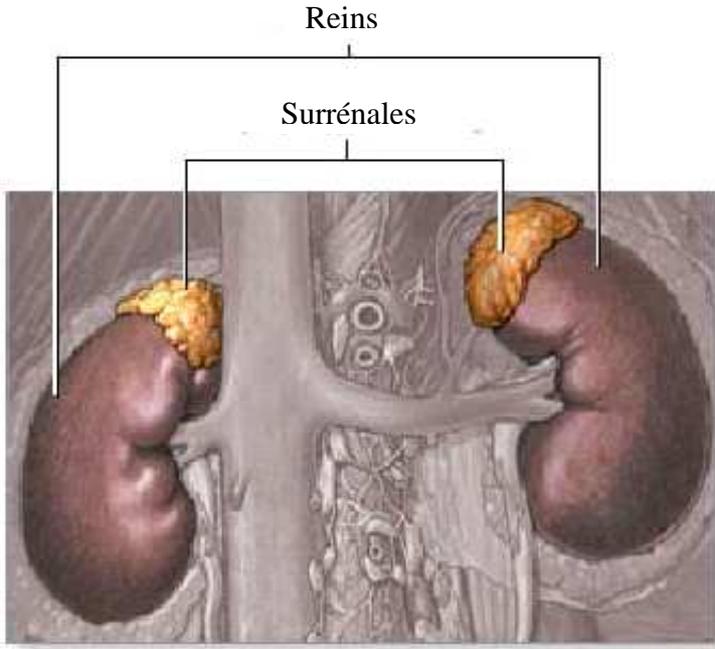
Cependant il est difficile d'affirmer que l'altération du fonctionnement de l'axe corticotrope chez le rat F344 est à l'origine de l'obésité ou bien en est une conséquence.

L'étude des bases moléculaires de l'obésité permettra probablement de comprendre les mécanismes de cette physiopathologie.

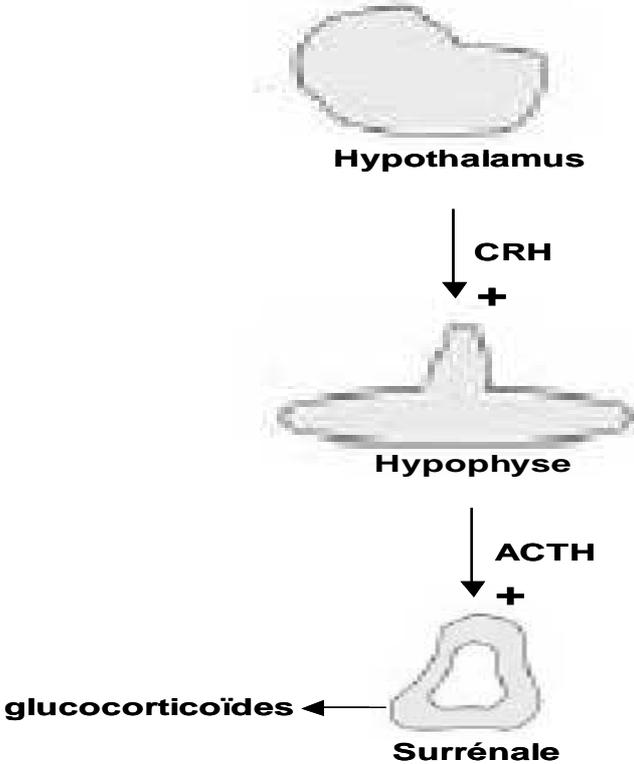
Ces travaux sont préliminaires à une recherche de QTLs influençant la résistance à l'obésité constatée chez le rat Lou en relation avec l'axe corticotrope, impliqué dans la régulation de l'équilibre énergétique à différents niveaux. Pour cela, après la détermination des traits discriminants entre les rats Lou et F344, un croisement entre ses deux souches sera effectué et ces phénotypes retenus seront étudiés sur la population F2 issue de ce croisement. L'étude de QTL associant par cartographie génétique une ou plusieurs régions génomiques à la variation d'un trait phénotypique permettra d'apporter une réponse.



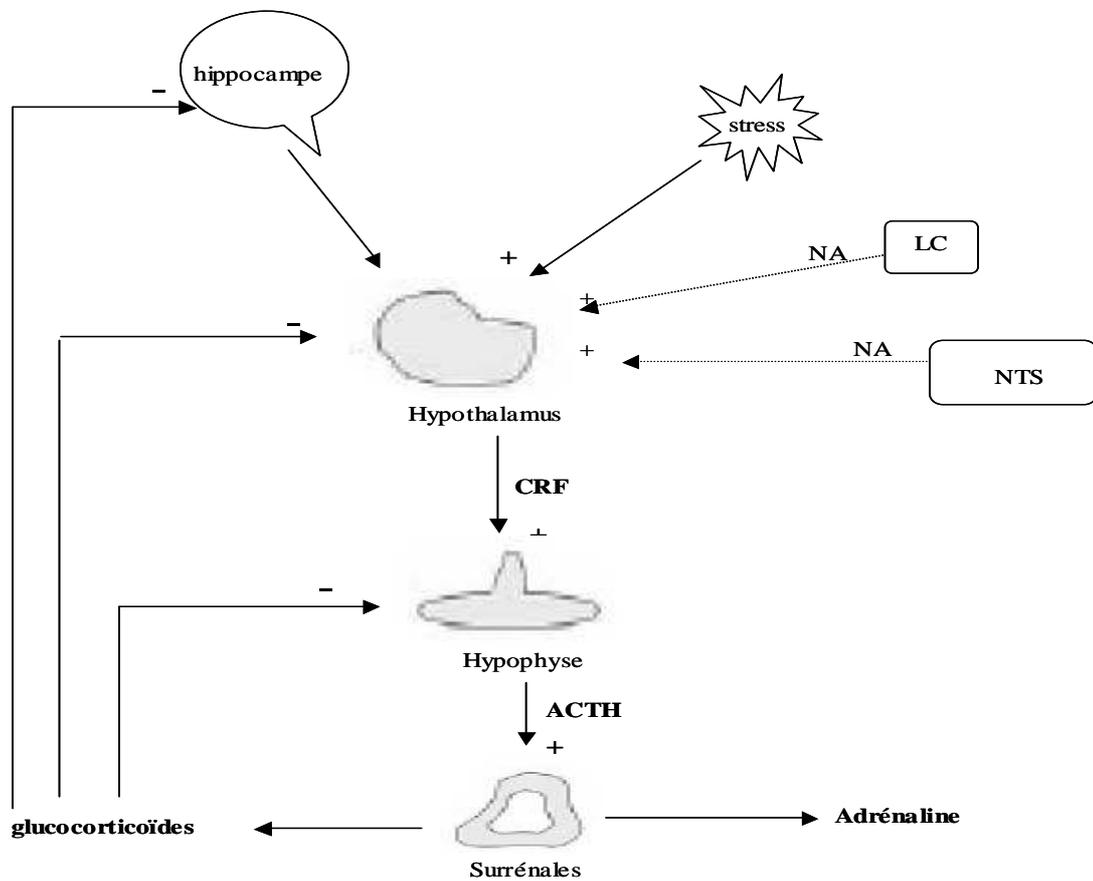
**Tableaux et figures**



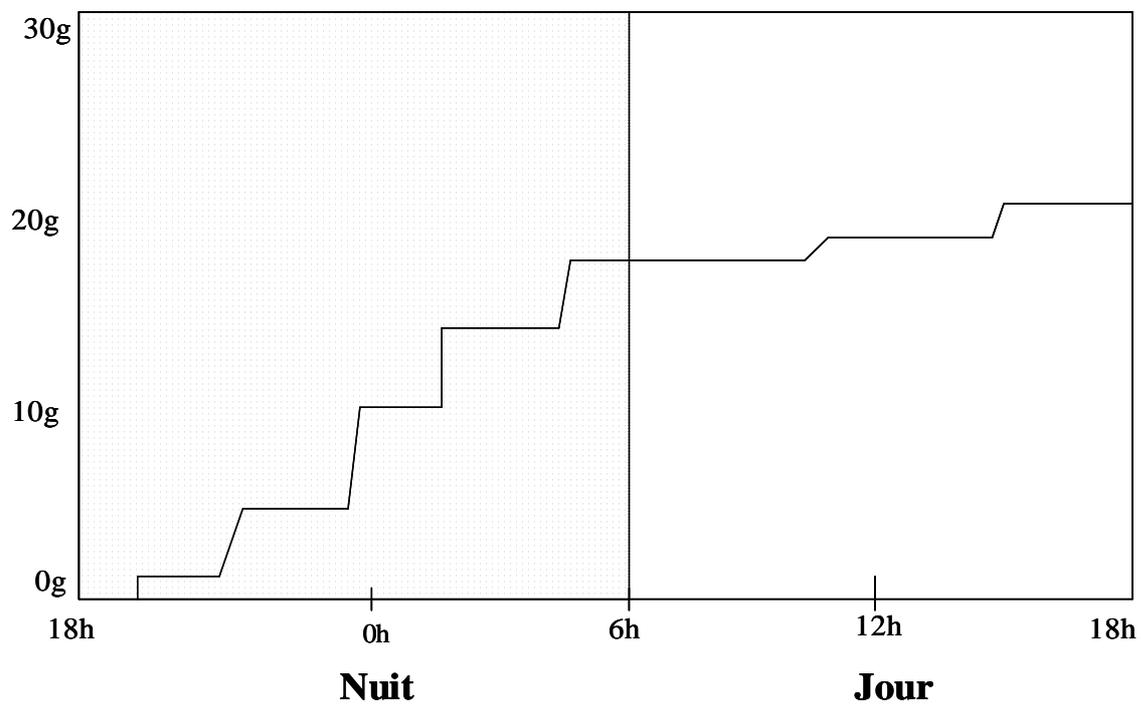
*Fig. 1 : Localisation des glandes surrénales*



**Fig.2 : Représentation schématique de l’Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (= axe corticotrope)**



*Fig. 4: Activation de l'axe corticotrope au cours du stress*



**Fig. 5 : Séquence alimentaire chez le rat normal ad lib (d'après Le Magnen, 1984)**

### Influences cognitives :

Contrainte, émotivité et associations conditionnées

### Facteurs neuroendocriniens susceptibles de répondre à l'absorption des nutriments et qui peuvent affecter le comportement alimentaire :

équilibre glucidique : GABA, NA, NPY, cortisol, insuline.

Equilibre lipidique : galanine, opiacés cortisol, enterostatine, cck, dopamine

### Systèmes influencés par des nutriments :

Système leptine

Système sérotonine

Hormones sexuelles

Cytokines

### Facteurs comportementaux et physiques qui peuvent influencer la quantité, la diversité et la composition des aliments ingérés :

Activité physique, organisation des repas, âge, sexe, activité diurne, allaitement, croissance et

**Influences socioculturelles :** économiques, religieuses, éducatives vont influencer les choix et

**Influences gustatives :** préférences innées et acquises, variété sensorielles, palatabilité des aliments

**Aliments :** Phase physique, digestibilité, composition, densité énergétique, humidité.

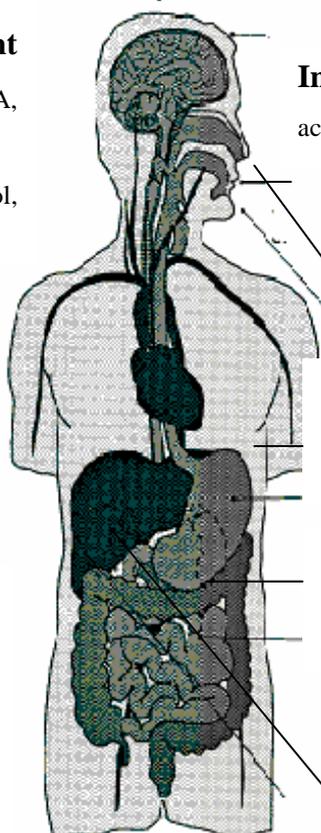
**Estomac :** la composition du régime peut influencer le goût et l'odorat, la distension et le taux de remplissage gastrique

**Intestins :** l'ingestion d'aliments peut affecter les récepteurs aux nutriments, la motilité et les taux d'absorption. l'osmolarité et la libération des

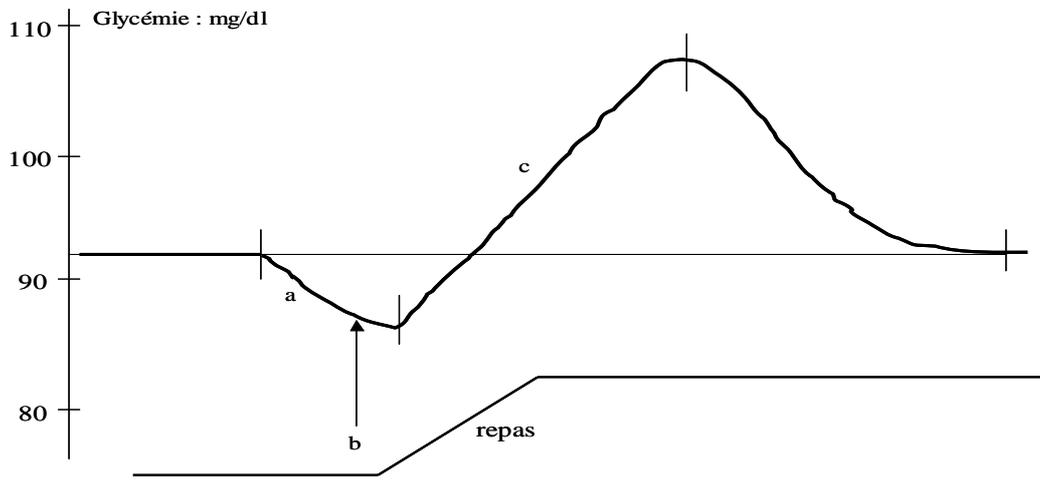
### Métabolisme des nutriments absorbés :

La composition de l'aliment peut affecter la libération et le stockage des nutriments.

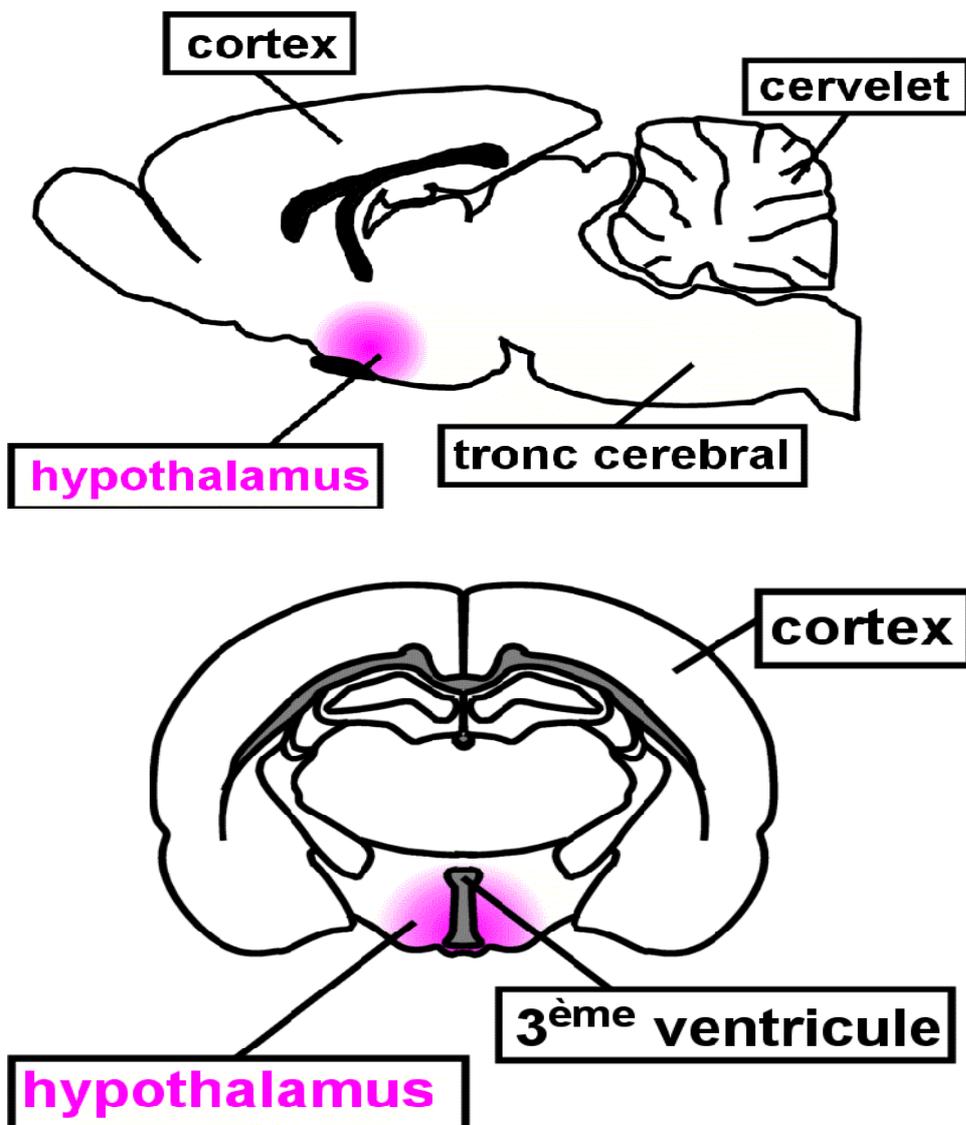
L'absorption des nutriments peut affecter le



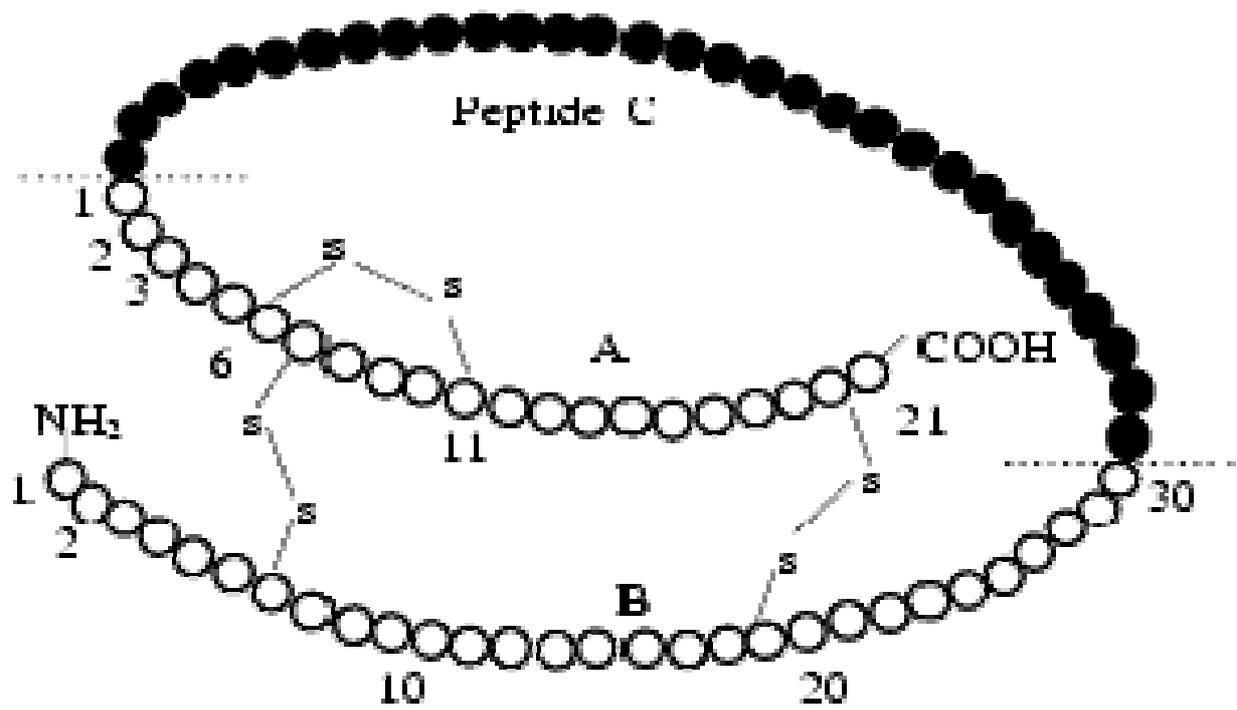
**Fig.6 : Influence des systèmes périphériques et du système nerveux central sur l'appétit chez l'homme. D'après Stubbs [106]**



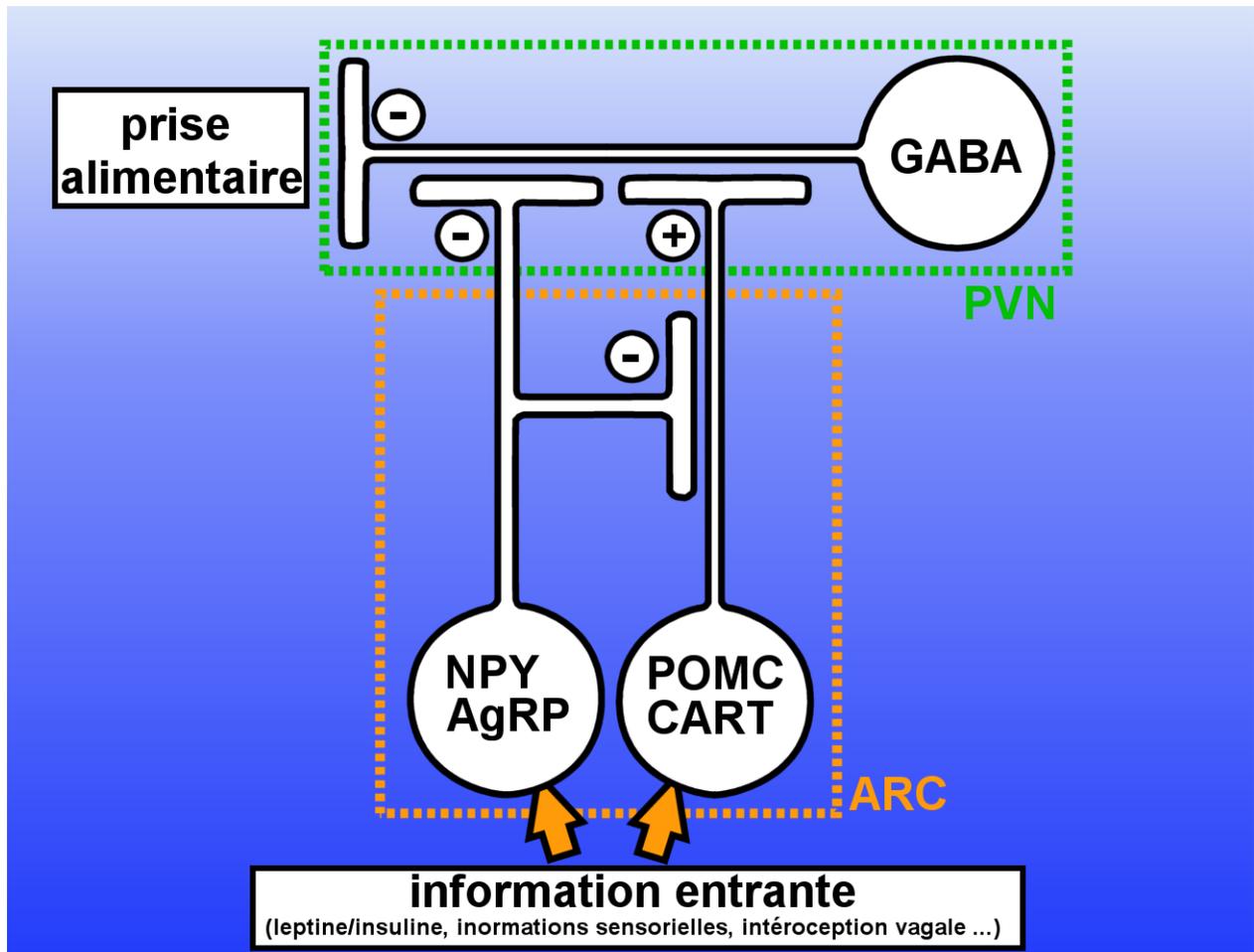
**Fig.7 Evolution de la glycémie du rat avant, pendant et après un repas. a :** le phénomène hypoglycémique préprandial ; **b :** début du repas ; **c :** l'hyperglycémie post-prandiale



**Fig. 8. Localisation de l'hypothalamus dans un cerveau de rat (Coupe latérale et transversale)**

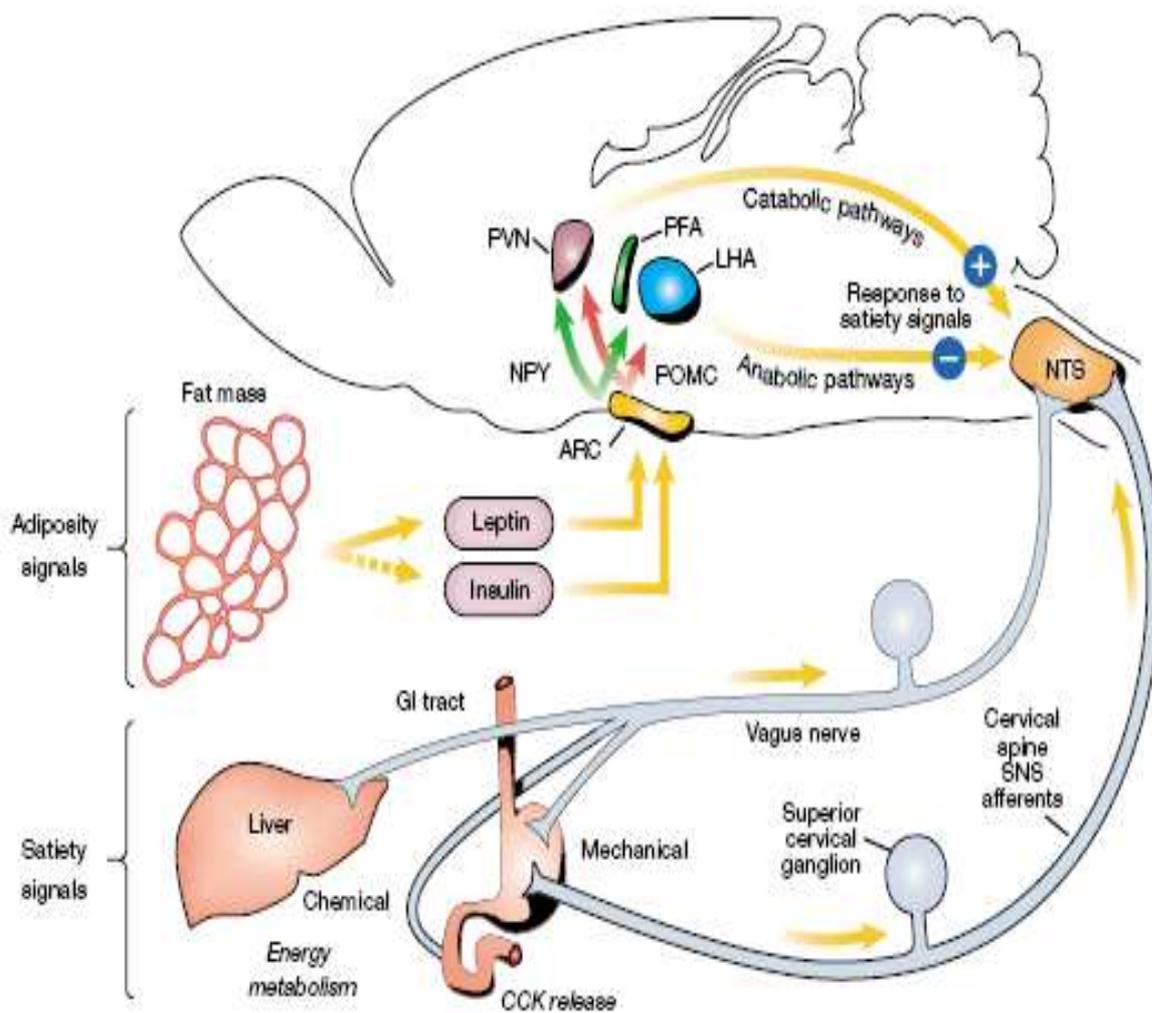


**Fig.9 : Insuline, chaînes A et B réunies par deux ponts disulfures et le peptide C**

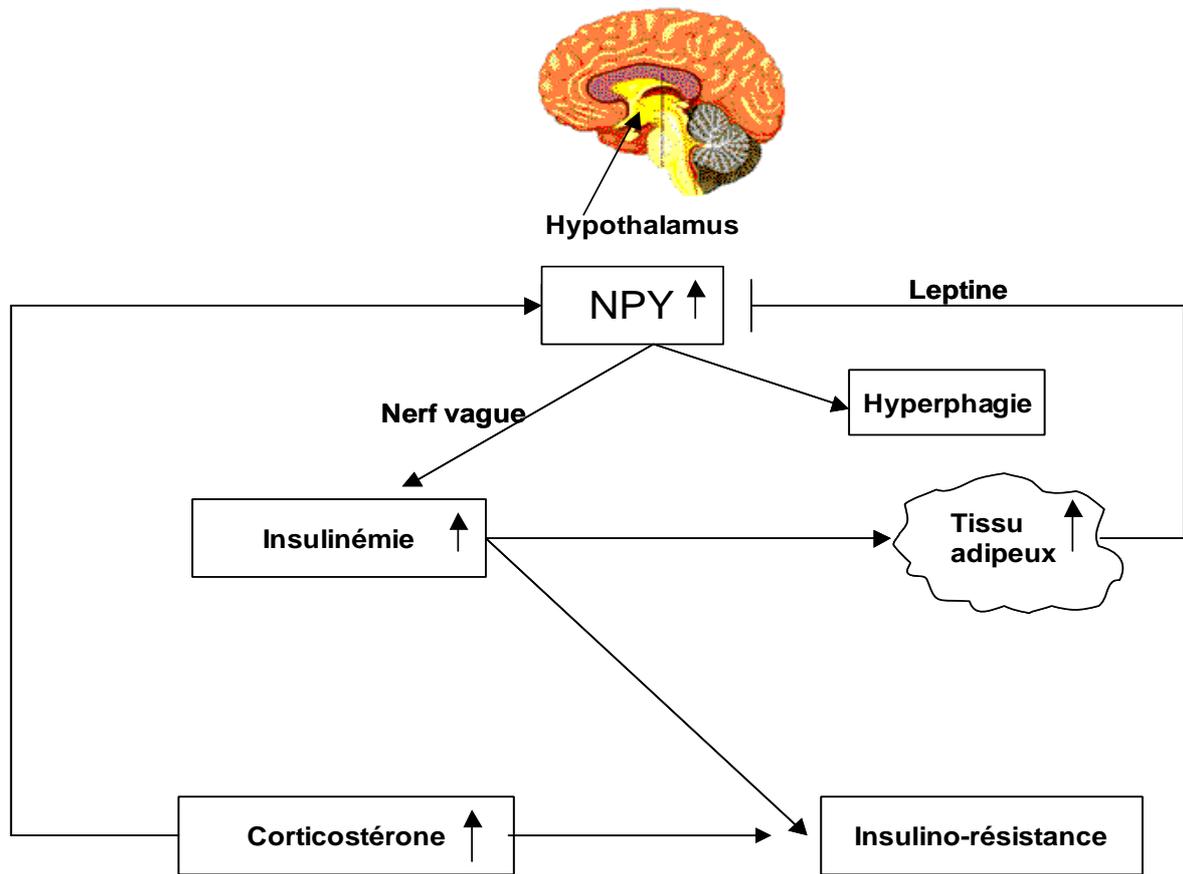


**Fig 10: Fonctionnement du système mélanocortine hypothalamique.**

Les deux types de neurones du noyau arqué, aux effets antagonistes sur le comportement alimentaire, sont en compétition constante pour déterminer l'intensité des neurones situés dans le PVN. Les nombreuses informations disponibles pour le noyau arqué déséquilibrent la compétition entre ces deux types de neurones dans un sens ou dans l'autre, aboutissant ainsi à un effet sur la prise alimentaire via une modulation de l'activité des neurones du PVN.



**Figure 11** : Rétrocontrôle périphérique par les fibres sensorielles, la leptine et l'insuline sur les centres régulateurs de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (D'après Schwartz et al.)



**Fig.12 : Dysrégulations métaboliques au cours du stress : l'augmentation chronique de ces voies hormono-métaboliques conduit à l'obésité**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Dantzer R.** Is it important to know about emotions in order to study emotions? *Behav Processes* 60:V-VII, 2002.
- [2]. **Boudarene M, Timsit-Berthier M and Legros J.** Qu'est ce que le stress? *Rev. Med. Liège* 52:541-549, 1997.
- [3]. **Agarwal MK.** Perspectives in receptor-mediated mineralocorticoid hormone action. *Pharmacol Rev* 46:67-87, 1994.
- [4]. **Laborit H.** *Encyclopaedia Universalis Corpus* 17:271-272, 1988.
- [5]. **Routier A.** Le stress, Rappel du concept. *Archives de Maladies Professionnelles* 52:254, 1991.
- [6]. **Selye H.** A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 32:138-139, 1936.
- [7]. **Selye H.** The physiology and pathology of exposure to stress: a treatise on the concepts of the general-adaptation-syndrome and the diseases of adaptation. *Acta. Inc. Medical*, 1950.
- [8]. **Conte-Devolx B, Guillaume V, Grino M, Boudouresque F, Magnan E, Cataldi M and Oliver C.** [Stress. Neuroendocrine aspects]. *Encephale* 19 Spec No 1:143-6, 1993.
- [9]. **Tachibana T, Sato M, Oikawa D and Furuse M.** Involvement of CRF on the anorexic effect of GLP-1 in layer chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 143:112-7, 2006.
- [10]. **Stocco DM and Clark BJ.** Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17:221-44, 1996.
- [11]. **Galman C, Angelin B and Rudling M.** Prolonged stimulation of the adrenals by corticotropin suppresses hepatic low-density lipoprotein and high-density lipoprotein receptors and increases plasma cholesterol. *Endocrinology* 143:1809-16, 2002.
- [12]. **Tsigos C and Chrousos G.** Stress, endocrine manifestations and diseases. *Handbook of Stress Medicine*:61-65, 1995.
- [13]. **Breuner CW and Orchinik M.** Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175:99-112, 2002.
- [14]. **De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS and Joels M.** Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269-301, 1998.

- [15]. **Bamberger CM, Schulte HM and Chrousos GP.** Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17:245-61, 1996.
- [16]. **Nishi M and Kawata M.** [Corticosteroid receptor and stress]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 20:181-8, 2000.
- [17]. **Funder JW.** Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Fail Rev* 10:15-22, 2005.
- [18]. **Wetzler S, Jean-Joseph G, Even P, Tome D and Larue-Achagiotis C.** Acute third ventricular administration of leptin decreases protein and fat in self-selecting rats. *Behav Brain Res* 159:119-25, 2005.
- [19]. **Dallman MF, Akana SF, Levin N, Walker CD, Bradbury MJ, Suemaru S and Scribner KS.** Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Ann N Y Acad Sci* 746:22-31; discussion 31-2, 64-7, 1994.
- [20]. **Schmidt TJ and Meyer AS.** Autoregulation of corticosteroid receptors. How, when, where, and why? *Receptor* 4:229-57, 1994.
- [21]. **Herrero AI, Sandi C and Venero C.** Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiol Learn Mem*, 2006.
- [22]. **Tempel DL and Leibowitz SF.** Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J Neuroendocrinol* 6:479-501, 1994.
- [23]. **McEwen BS, Lambdin LT, Rainbow TC and De Nicola AF.** Aldosterone effects on salt appetite in adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* 43:38-43, 1986.
- [24]. **Rogerson FM, Brennan FE and Fuller PJ.** Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol* 217:203-12, 2004.
- [25]. **Karin M.** New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 93:487-90, 1998.
- [26]. **Han F, Ozawa H, Matsuda K, Nishi M and Kawata M.** Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neurosci Res* 51:371-81, 2005.
- [27]. **Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR and Sigler PB.** Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352:497-505, 1991.

- [28]. **Miyata Y and Yahara I.** Cytoplasmic 8 S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90-kDa heat shock protein moiety. *J Biol Chem* 266:8779-83, 1991.
- [29]. **Jalaguier S, Mornet D, Mesnier D, Leger JJ and Auzou G.** Human mineralocorticoid receptor interacts with actin under mineralocorticoid ligand modulation. *FEBS Lett* 384:112-6, 1996.
- [30]. **Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA and Okret S.** Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol Endocrinol* 2:1256-64, 1988.
- [31]. **Sathiyaa R and Vijayan MM.** Autoregulation of glucocorticoid receptor by cortisol in rainbow trout hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1508-15, 2003.
- [32]. **Blundell JE and Macdiarmid JI.** Passive overconsumption. Fat intake and short-term energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 827:392-407, 1997.
- [33]. **Song LN.** Stress-induced changes in glucocorticoid receptors: molecular mechanisms and clinical implications. *Mol Cell Endocrinol* 80:C171-4, 1991.
- [34]. **Spencer RL, Miller AH, Moday H, Stein M and McEwen BS.** Diurnal differences in basal and acute stress levels of type I and type II adrenal steroid receptor activation in neural and immune tissues. *Endocrinology* 133:1941-50, 1993.
- [35]. **Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA and Vinson GP.** Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 19:101-43, 1998.
- [36]. **Follenius M, Brandenberger G and Hietter B.** Diurnal cortisol peaks and their relationships to meals. *J Clin Endocrinol Metab* 55:757-61, 1982.
- [37]. **Chrousos GP.** The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332:1351-62, 1995.
- [38]. **Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK and Figueiredo H.** Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:1201-13, 2005.
- [39]. **Jezova D, Ochedalski T, Kiss A and Aguilera G.** Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol* 10:67-72, 1998.
- [40]. **Keller-Wood ME and Dallman MF.** Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5:1-24, 1984.

- [41]. **Boyle MP, Kolber BJ, Vogt SK, Wozniak DF and Muglia LJ.** Forebrain glucocorticoid receptors modulate anxiety-associated locomotor activation and adrenal responsiveness. *J Neurosci* 26:1971-8, 2006.
- [42]. **Deuschle M, Weber B, Colla M, Muller M, Kniest A and Heuser I.** Mineralocorticoid receptor also modulates basal activity of hypothalamus-pituitary-adrenocortical system in humans. *Neuroendocrinology* 68:355-60, 1998.
- [43]. **Young EA, Lopez JF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ and Akil H.** The role of mineralocorticoid receptors in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3339-45, 1998.
- [44]. **Suemaru S, Darlington DN, Akana SF, Cascio CS and Dallman MF.** Ventromedial hypothalamic lesions inhibit corticosteroid feedback regulation of basal ACTH during the trough of the circadian rhythm. *Neuroendocrinology* 61:453-63, 1995.
- [45]. **Herman JP, Watson SJ and Spencer RL.** Defense of adrenocorticosteroid receptor expression in rat hippocampus: effects of stress and strain. *Endocrinology* 140:3981-91, 1999.
- [46]. **Sapolsky RM and Eichenbaum H.** Thalamocortical mechanisms in odor-guided behavior. II. Effects of lesions of the mediodorsal thalamic nucleus and frontal cortex on odor preferences and sexual behavior in the hamster. *Brain Behav Evol* 17:276-90, 1980.
- [47]. **Cooney JM and Dinan TG.** Hypothalamic-pituitary-adrenal axis early-feedback responses are preserved in melancholic depression: a study of sertraline treatment. *Hum Psychopharmacol* 15:351-356, 2000.
- [48]. **Carsia RV and Malamed S.** Glucocorticoid control of steroidogenesis in isolated rat adrenocortical cells. *Biochim Biophys Acta* 763:83-9, 1983.
- [49]. **Altemus M and Gold P.** Neuroendocrinology and psychiatric illness. *Front Neuroendocrinol.* 11:238-265, 1990.
- [50]. **Kenyon CJ, Panarelli M, Holloway CD, Dunlop D, Morton JJ, Connell JM and Fraser R.** The role of glucocorticoid activity in the inheritance of hypertension: studies in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45:7-11, 1993.
- [51]. **Desautels C, Sarrieau A, Caritez JC and Mormede P.** Behavior and pituitary-adrenal function in large white and Meishan pigs. *Domest Anim Endocrinol* 16:193-205, 1999.
- [52]. **Yehuda R, Levengood RA, Schmeidler J, Wilson S, Guo LS and Gerber D.** Increased pituitary activation following metyrapone administration in post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 21:1-16, 1996.

- [53]. **Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Krieglstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K and Schutz G.** Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9:1608-21, 1995.
- [54]. **Rzazewska-Makosa B.** [The mechanism of glucocorticoid resistance in multiple sclerosis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 59:457-63, 2005.
- [55]. **Karl M, Lamberts SW, Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, Accili D and Chrousos GP.** Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 76:683-9, 1993.
- [56]. **Linder MJ and Thompson EB.** Abnormal glucocorticoid receptor gene and mRNA in primary cortisol resistance. *J Steroid Biochem* 32:243-9, 1989.
- [57]. **Petrovsky N and Harrison LC.** Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance? *J Immunol* 158:5163-8, 1997.
- [58]. **Reynolds RM, Walker BR, Syddall HE, Andrew R, Wood PJ, Whorwood CB and Phillips DI.** Altered control of cortisol secretion in adult men with low birth weight and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:245-50, 2001.
- [59]. **de Kloet ER, Sutanto W, van den Berg DT, Carey MP, van Haarst AD, Hornsby CD, Meijer OC, Rots NY and Oitzl MS.** Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47:183-90, 1993.
- [60]. **Funder JW.** Aldosterone action. *Annu Rev Physiol* 55:115-30, 1993.
- [61]. **Ohara M, Cadnapaphornchai MA, Summer SN, Falk S, Yang J, Togawa T and Schrier RW.** Effect of mineralocorticoid deficiency on ion and urea transporters and aquaporin water channels in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 299:285-90, 2002.
- [62]. **De Kloet ER.** Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front Neuroendocrinol.* 12:95-164, 1991.
- [63]. **Bitran D, Shiekh M, Dowd JA, Dugan MM and Renda P.** Corticosterone is permissive to the anxiolytic effect that results from the blockade of hippocampal mineralocorticoid receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 60:879-87, 1998.
- [64]. **Andreatini R and Leite JR.** Evidence against the involvement of ACTH/CRF release or corticosteroid receptors in the anxiolytic effect of corticosterone. *Braz J Med Biol Res* 27:1237-41, 1994.
- [65]. **Ferreira VM, Takahashi RN and Morato GS.** Dexamethasone reverses the ethanol-induced anxiolytic effect in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 66:585-90, 2000.

- [66]. **Marissal-Arvy N, Ribot E, Sarrieau A and Mormede P.** Is the mineralocorticoid receptor in Brown Norway rats constitutively active? *J Neuroendocrinol* 12:576-88, 2000.
- [67]. **Kumar BA and Leibowitz SF.** Impact of acute corticosterone administration on feeding and macronutrient self-selection patterns. *Am J Physiol* 254:R222-8, 1988.
- [68]. **Marissal-Arvy N and Mormede P.** Excretion of electrolytes in Brown Norway and Fischer 344 rats: effects of adrenalectomy and of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Exp Physiol* 89:753-65, 2004.
- [69]. **Fregly MJ and Waters IW.** Effect of spironolactone on spontaneous NaCl intake of adrenalectomized rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 123:971-5, 1966.
- [70]. **Askari H, Liu J and Dagogo-Jack S.** Energy adaptation to glucocorticoid-induced hyperleptinemia in human beings. *Metabolism* 55:696-7, 2006.
- [71]. **Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL and Koob GF.** Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res* 611:18-24, 1993.
- [72]. **Tataranni PA, Larson DE, Snitker S, Young JB, Flatt JP and Ravussin E.** Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am J Physiol* 271:E317-25, 1996.
- [73]. **Sajdyk TJ, Shekhar A and Gehlert DR.** Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality. *Neuropeptides* 38:225-34, 2004.
- [74]. **Lofberg E, Gutierrez A, Wernerman J, Anderstam B, Mitch WE, Price SR, Bergstrom J and Alvestrand A.** Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *Eur J Clin Invest* 32:345-53, 2002.
- [75]. **Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman MF, McArthur MD and Meaney MJ.** High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am J Physiol* 273:E1168-77, 1997.
- [76]. **Jequier E A, K, Schutz, Y.** Assessment of energy expenditure and fuel utilization in man. *Annu Rev Nutr* 7. :187-208, 1987.
- [77]. **Rising R.** Total daily energy expenditure. *J Am Coll Nutr* 13:309-10, 1994.
- [78]. **Le Magnen J DM.** Parameters of the meal pattern in rats: their assessment and physiological significance. *Neurosci. Biobehav Rev* 4:1-11, 1980.
- [79]. **Mayer J.** Glucostatic mechanism of regulation of food intake. 1953. *Obes Res* 4:493-6, 1996.

- [80]. **Le Magnen J TS.** La périodicité spontanée de la prise alimentaire ad libitum du rat blanc. *Journal de physiologie de Paris* 58:323-349, 1966.
- [81]. **Berthoud HR.** Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26:393-428, 2002.
- [82]. **Chapelot D, Aubert R, Marmonier C, Chabert M and Louis-Sylvestre J.** An endocrine and metabolic definition of the intermeal interval in humans: evidence for a role of leptin on the prandial pattern through fatty acid disposal. *Am J Clin Nutr* 72:421-31, 2000.
- [83]. **Moran TH, Ladenheim EE and Schwartz GJ.** Within-meal gut feedback signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5:S39-41, 2001.
- [84]. **Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ and Baskin DG.** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-71, 2000.
- [85]. **Booth DA.** Food intake compensation for increase or decrease in the protein content of the diet. *Behav Biol* 12:31-40, 1974.
- [86]. **Rothwell NJ and Stock MJ.** Combined effects of cafeteria and tube-feeding on energy balance in the rat. *Proc Nutr Soc* 38:5A, 1979.
- [87]. **Rothwell NJ and Stock MJ.** Acute effects of fat and carbohydrate on metabolic rate in normal, cold-acclimated and lean and obese (fa/fa) Zucker rats. *Metabolism* 32:371-6, 1983.
- [88]. **Klaassen M, Oltrogge M and Trost L.** Basal metabolic rate, food intake, and body mass in cold- and warm-acclimated Garden Warblers. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 137:639-47, 2004.
- [89]. **Bensaid A, Tome D, Gietzen D, Even P, Morens C, Gausseres N and Fromentin G.** Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol Behav* 75:577-82, 2002.
- [90]. **Flatt JP.** Carbohydrate balance and body-weight regulation. *Proc Nutr Soc* 55:449-65, 1996.
- [91]. **Russek M.** Demonstration of the influence of an hepatic glucosensitive mechanism on food-intake. *Physiol Behav* 5:1207-9, 1970.
- [92]. **Sclafani A, Lucas F and Ackroff K.** The importance of taste and palatability in carbohydrate-induced overeating in rats. *Am J Physiol* 270:R1197-202, 1996.
- [93]. **Richter C, Holt L and B B.** Nutritional requirements for normal growth and reproduction in rats studied by self-selection method. *Am J Physiol* 122:169-172, 1938.

- [94]. **Larue-Achagiotis C, Martin C, Verger P and Louis-Sylvestre J.** Dietary self-selection vs. complete diet: body weight gain and meal pattern in rats. *Physiol Behav* 51:995-9, 1992.
- [95]. **Shor-Posner G, Ian C, Brennan G, Cohn T, Moy H, Ning A and Leibowitz SF.** Self-selecting albino rats exhibit differential preferences for pure macronutrient diets: characterization of three subpopulations. *Physiol Behav* 50:1187-95, 1991.
- [96]. **Jean C, Fromentin G, Tome D and Larue-Achagiotis C.** Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high-protein, high-lipid diet. *Physiol Behav* 76:65-73, 2002.
- [97]. **Nguema GN, Grizard J and Alliot J.** The reduction of protein intake observed in old rats depends on the type of protein. *Exp Gerontol* 39:1491-8, 2004.
- [98]. **Semon BA, Leung PM, Rogers QR and Gietzen DW.** Effect of type of protein on food intake of rats fed high protein diets. *Physiol Behav* 41:451-8, 1987.
- [99]. **Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J and Bollheimer LC.** Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36:485-501, 2006.
- [100]. **Wetzler S, Jean C, Tome D and Larue-Achagiotis C.** A carbohydrate diet rich in sucrose increased insulin and WAT in macronutrient self-selecting rats. *Physiol Behav* 79:695-700, 2003.
- [101]. **Mela DJ and Nolan LJ.** From the lab to the living room: consumer studies of ingestive behavior. *Appetite* 26:303, 1996.
- [102]. **Norman RL, Smith CJ, Pappas JD and Hall J.** Exposure to ovarian steroids elicits a female pattern of plasma cortisol levels in castrated male macaques. *Steroids* 57:37-43, 1992.
- [103]. **Webster AJ.** Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proc Nutr Soc* 52:69-76, 1993.
- [104]. **Louis-Sylvestre J, Le Magnen.** A fall in blood glucose level precedes meal onset in free-feeding rats. *Neurosci. Biobehav Rev* 4:13-15, 1980.
- [105]. **Stricker EM, Rowland N, Saller CF and Friedman MI.** Homeostasis during hypoglycemia: central control of adrenal secretion and peripheral control of feeding. *Science* 196:79-81, 1977.
- [106]. **Stricker EM, Curtis KS, Peacock KA and Smith JC.** Rats with area postrema lesions have lengthy eating and drinking bouts when fed ad libitum: implications for feedback inhibition of ingestive behavior. *Behav Neurosci* 111:623-32, 1997.

- [107]. **Shimomura Y, Takahashi M, Shimizu H, Sato N, Uehara Y, Negishi M, Inukai T, Kobayashi I and Kobayashi S.** Abnormal feeding behavior and insulin replacement in STZ-induced diabetic rats. *Physiol Behav* 47:731-4, 1990.
- [108]. **Kennedy GC.** The regulation of food intake. Discussion. *Adv Psychosom Med* 7:91-9, 1972.
- [109]. **Mellinkoff SM, Frankland M, Boyle D and Greipel M.** Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite. *J Appl Physiol* 8:535-8, 1956.
- [110]. **Nicolaïdis S.** Short term and long term regulation of energy balance. . *Proceedings of the XXVI International Union of Physiology Sciences*:122-123, 1974.
- [111]. **Kissileff HR and Van Itallie TB.** Physiology of the control of food intake. *Annu Rev Nutr* 2:371-418, 1982.
- [112]. **Fantino M.** Role of sensory input in the control of food intake. *J Auton Nerv Syst* 10:347-58, 1984.
- [113]. **Wetzler S, Dumaz V, Gubern M, Tome D and Larue-Achagiotis C.** Intraperitoneal leptin modifies macronutrient choice in self-selecting rats. *Physiol Behav* 83:65-72, 2004.
- [114]. **Stasiunienė N and Praskevičius A.** [Peptides regulating food intake and body weight]. *Medicina (Kaunas)* 41:989-1001, 2005.
- [115]. **Elmqvist JK, Elias CF and Saper CB.** From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22:221-32, 1999.
- [116]. **Leibowitz SF.** Paraventricular nucleus: a primary site mediating adrenergic stimulation of feeding and drinking. *Pharmacol Biochem Behav* 8:163-75, 1978.
- [117]. **Leibowitz SF, Hammer NJ and Chang K.** Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav* 27:1031-40, 1981.
- [118]. **Ganaraja B and Jeganathan PS.** Effect of basolateral amygdala & ventromedial hypothalamic lesions on ingestion & taste preference in rat. *Indian J Med Res* 112:65-70, 2000.
- [119]. **Morley JE.** Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocr Rev* 8:256-87, 1987.
- [120]. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32, 1994.
- [121]. **Kalra SP.** Appetite and body weight regulation: is it all in the brain? *Neuron* 19:227-30, 1997.

- [122]. **Akimoto-Takano S, Sakurai C, Kanai S, Hosoya H, Ohta M and Miyasaka K.** Differences in the Appetite-Stimulating Effect of Orexin, Neuropeptide Y and Ghrelin among Young, Adult and Old Rats. *Neuroendocrinology* 82:256-63, 2005.
- [123]. **Szentirmai E and Krueger JM.** Central Administration of Neuropeptide Y Induces Wakefulness in Rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006.
- [124]. **Stricker-Krongrad A, Beck B and Bulet C.** Enhanced feeding response to neuropeptide Y in hypothalamic neuropeptide Y-depleted rats. *Eur J Pharmacol* 295:27-34, 1996.
- [125]. **Stanley BG, Anderson KC, Grayson MH and Leibowitz SF.** Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. *Physiol Behav* 46:173-7, 1989.
- [126]. **Sparta DR, Fee JR, Hayes DM, Knapp DJ, MacNeil DJ and Thiele TE.** Peripheral and central administration of a selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist suppresses ethanol intake by C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res* 28:1324-30, 2004.
- [127]. **Morley JE, Levine AS, Gosnell BA, Mitchell JE, Krahn DD and Nizielski SE.** Peptides and feeding. *Peptides* 6 Suppl 2:181-92, 1985.
- [128]. **Goumain M, Voisin T, Lorinet AM and Laburthe M.** Identification and distribution of mRNA encoding the Y1, Y2, Y4, and Y5 receptors for peptides of the PP-fold family in the rat intestine and colon. *Biochem Biophys Res Commun* 247:52-6, 1998.
- [129]. **Blomqvist AG and Herzog H.** Y-receptor subtypes--how many more? *Trends Neurosci* 20:294-8, 1997.
- [130]. **Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA and Bloom SR.** A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139:4428-31, 1998.
- [131]. **Stutz AM, Morrison CD and Argyropoulos G.** The Agouti-related protein and its role in energy homeostasis. *Peptides* 26:1771-81, 2005.
- [132]. **Debons AF, Krimsky I, From A and Cloutier RJ.** Rapid effects of insulin on the hypothalamic satiety center. *Am J Physiol* 217:1114-8, 1969.
- [133]. **Debons AF, Krimsky I and From A.** A direct action of insulin on the hypothalamic satiety center. *Am J Physiol* 219:938-43, 1970.
- [134]. **Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R and Burn P.** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-9, 1995.

- [135]. **Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK and Friedman JM.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-6, 1995.
- [136]. **de Pedro N, Martinez-Alvarez R and Delgado MJ.** Acute and chronic leptin reduces food intake and body weight in goldfish (*Carassius auratus*). *J Endocrinol* 188:513-20, 2006.
- [137]. **Flier JS.** Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337-50, 2004.
- [138]. **Schwartz MW.** Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:978-81, 2001.
- [139]. **Auwerx J and Staels B.** Leptin. *Lancet* 351:737-42, 1998.
- [140]. **Wannamethee SG, Tchernova J, Whincup P, Lowe GD, Kelly A, Rumley A, Wallace AM and Sattar N.** Plasma leptin: Associations with metabolic, inflammatory and haemostatic risk factors for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2006.
- [141]. **Campfield LA.** Central mechanisms responsible for the actions of OB protein (leptin) on food intake, metabolism and body energy storage. *Front Horm Res* 26:12-20, 2000.
- [142]. **Baskin DG, Blevins JE and Schwartz MW.** How the brain regulates food intake and body weight: the role of leptin. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14 Suppl 6:1417-29, 2001.
- [143]. **Paintal AS.** A study of gastric stretch receptors; their role in the peripheral mechanism of satiation of hunger and thirst. *J Physiol* 126:255-70, 1954.
- [144]. **Oesch S, Ruegg C, Fischer B, Degen L and Beglinger C.** Effect of gastric distension prior to eating on food intake and feelings of satiety in humans. *Physiol Behav* 87:903-10, 2006.
- [145]. **Mei N.** Vagal glucoreceptors in the small intestine of the cat. *J Physiol* 282:485-506, 1978.
- [146]. **Russek M.** Hepatic receptors and the neurophysiological mechanisms controlling feeding behavior. *Neurosci Res (N Y)* 4:213-82, 1971.
- [147]. **Koopmans HS and Sclafani A.** Control of body weight by lower gut signals. *Int J Obes* 5:491-5, 1981.
- [148]. **Smith GP and Gibbs J.** Brain-gut peptides and the control of food intake. *Adv Biochem Psychopharmacol* 28:389-95, 1981.
- [149]. **Haupt KA.** Gastrointestinal factors in hunger and satiety. *Neurosci Biobehav Rev* 6:145-64, 1982.

- [150]. **Eastwood C, Maubach K, Kirkup AJ and Grundy D.** The role of endogenous cholecystokinin in the sensory transduction of luminal nutrient signals in the rat jejunum. *Neurosci Lett* 254:145-8, 1998.
- [151]. **Raybould HE, Holzer P, Thieffn G, Holzer HH, Yoneda M and Tache YF.** Vagal afferent innervation and regulation of gastric function. *Adv Exp Med Biol* 298:109-27, 1991.
- [152]. **Raybould HE.** Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. *Am J Physiol* 277:G751-5, 1999.
- [153]. **Gibbs J, Young RC and Smith GP.** Cholecystokinin decreases food intake in rats. 1973. *Obes Res* 5:284-90, 1997.
- [154]. **Mueller K and Hsiao S.** Specificity of cholecystokinin satiety effect: reduction of food but not water intake. *Pharmacol Biochem Behav* 6:643-6, 1977.
- [155]. **Gallmann E, Arsenijevic D, Williams G, Langhans W and Spengler M.** Effect of intraperitoneal CCK-8 on food intake and brain orexin-A after 48 h of fasting in the rat. *Regul Pept* 133:139-46, 2006.
- [156]. **Crawley JN and Corwin RL.** Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15:731-55, 1994.
- [157]. **Ebenezer IS.** Effects of intracerebroventricular administration of the CCK(1) receptor antagonist devazepide on food intake in rats. *Eur J Pharmacol* 441:79-82, 2002.
- [158]. **Yoshimatsu H, Egawa M and Bray GA.** Effects of cholecystokinin on sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue. *Brain Res* 597:298-303, 1992.
- [159]. **de Castro JM and Stroebele N.** Food intake in the real world: implications for nutrition and aging. *Clin Geriatr Med* 18:685-97, 2002.
- [160]. **Souquet AM and Fantino M.** Stress and dexfenfluramine: effects on the immune response and energy balance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 45:495-500, 1993.
- [161]. **Fantino M.** Stress et prise alimentaire. *La Lettre Scientifique de l'Institut Française pour la Nutrition*, Septembre 1995.
- [162]. **Wardle J, Steptoe A, Oliver G and Lipsey Z.** Stress, dietary restraint and food intake. *J Psychosom Res* 48:195-202, 2000.
- [163]. **Antelman SM, Szechtman H, Chin P and Fisher AE.** Tail pinch-induced eating, gnawing and licking behavior in rats: dependence on the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 99:319-37, 1975.
- [164]. **Shimizu N, Oomura Y and Kai Y.** Stress-induced anorexia in rats mediated by serotonergic mechanisms in the hypothalamus. *Physiol Behav* 46:835-41, 1989.

- [165]. **Marti O, Marti J and Armario A.** Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 55:747-53, 1994.
- [166]. **Rybkin, II, Zhou Y, Volaufova J, Smagin GN, Ryan DH and Harris RB.** Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *Am J Physiol* 273:R1612-22, 1997.
- [167]. **Hope PJ, Turnbull H, Farr S, Morley JE, Rice KC, Chrousos GP, Torpy DJ and Wittert GA.** Peripheral administration of CRF and urocortin: effects on food intake and the HPA axis in the marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. *Peptides* 21:669-77, 2000.
- [168]. **Lin L, York D and Bray G.** Acute effects of intracerebroventricular corticotropin releasing hormone (CRH) on macronutrient selection. *Int J Obes* 52:207-217, 1992.
- [169]. **Devenport L, Knehans A, Thomas T and Sundstrom A.** Macronutrient intake and utilization by rats: interactions with type I adrenocorticoid receptor stimulation. *Am J Physiol* 260:R73-81, 1991.
- [170]. **Castonguay TW.** Glucocorticoids as modulators in the control of feeding. *Brain Res Bull* 27:423-8, 1991.
- [171]. **Prasad C, delaHoussaye AJ, Prasad A and Mizuma H.** Augmentation of dietary fat preference by chronic, but not acute, hypercorticosteronemia. *Life Sci* 56:1361-71, 1995.
- [172]. **Donohoe TP.** Stress-induced anorexia: implications for anorexia nervosa. *Life Sci* 34:203-18, 1984.
- [173]. **Grignaschi G, Sironi F and Samanin R.** The 5-HT<sub>1B</sub> receptor mediates the effect of d-fenfluramine on eating caused by intra-hypothalamic injection of neuropeptide Y. *Eur J Pharmacol* 274:221-4, 1995.
- [174]. **Fdez Espejo E and Gil E.** Single restraint stress sensitizes acute chewing movements induced by haloperidol, but not if the 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT is given prior to stress. *Brain Res* 755:351-5, 1997.
- [175]. **Islam AK, Dougherty T, Koch JE and Bodnar RJ.** Naltrexone, serotonin receptor subtype antagonists, and carbohydrate intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 48:193-201, 1994.
- [176]. **Mullen BJ and Martin RJ.** The effect of dietary fat on diet selection may involve central serotonin. *Am J Physiol* 263:R559-63, 1992.
- [177]. **Wurtman RJ and Fernstrom JD.** Control of brain neurotransmitter synthesis by precursor availability and nutritional state. *Biochem Pharmacol* 25:1691-6, 1976.

- [178]. **Turner MS, Foggo M, Bennie J, Carroll S, Dick H and Goodwin GM.** Psychological, hormonal and biochemical changes following carbohydrate bingeing: a placebo controlled study in bulimia nervosa and matched controls. *Psychol Med* 21:123-33, 1991.
- [179]. **Brewerton TD.** Toward a unified theory of serotonin dysregulation in eating and related disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20:561-90, 1995.
- [180]. **Fernstrom JD and Fernstrom MH.** Diet, monoamine neurotransmitters and appetite control. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme*:117-31; discussion 131-3, 2001.
- [181]. **Samanin R and Garattini S.** Serotonin and the pharmacology of eating disorders. *Ann N Y Acad Sci* 575:194-207; discussion 207-8, 1989.
- [182]. **Ericsson M, Poston WS, 2nd and Foreyt JP.** Common biological pathways in eating disorders and obesity. *Addict Behav* 21:733-43, 1996.
- [183]. **Perrin D, Mamet J, Geloën A, Morel G, Dalmaz Y and Pequignot JM.** Sympathetic and brain monoaminergic regulation of energy balance in obesity-resistant rats (Lou/C). *Auton Neurosci* 109:1-9, 2003.
- [184]. **Krahn DD, Gosnell BA and Majchrzak MJ.** The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures. *Biol Psychiatry* 27:1094-102, 1990.
- [185]. **Costentin J.** [Physiological and neurobiological elements of food intake]. *Ann Pharm Fr* 62:92-102, 2004.
- [186]. **Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS and Morley JE.** Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res* 443:63-9, 1988.
- [187]. **de Groote L, Penalva RG, Flachskamm C, Reul JM and Linthorst AC.** Differential monoaminergic, neuroendocrine and behavioural responses after central administration of corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 agonists. *J Neurochem* 94:45-56, 2005.
- [188]. **Krahn DD, Gosnell BA, Grace M and Levine AS.** CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding. *Brain Res Bull* 17:285-9, 1986.
- [189]. **Stanley BG and Leibowitz SF.** Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:3940-3, 1985.
- [190]. **Bredy TW, Lee AW, Meaney MJ and Brown RE.** Effect of neonatal handling and paternal care on offspring cognitive development in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). *Horm Behav* 46:30-8, 2004.

- [191]. **Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ and Gratton A.** Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* 19:1863-74, 2004.
- [192]. **Priebe K, Romeo RD, Francis DD, Sisti HM, Mueller A, McEwen BS and Brake WG.** Maternal influences on adult stress and anxiety-like behavior in C57BL/6J and BALB/cJ mice: a cross-fostering study. *Dev Psychobiol* 47:398-407, 2005.
- [193]. **McEwen BS.** Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 338:171-9, 1998.
- [194]. **Tanaka K, Shimizu N, Imura H, Fukata J, Hibi I, Tanaka T, Nakagawa S, Fujieda K, Takebe K, Yoshinaga K and et al.** Human corticotropin-releasing hormone (hCRH) test: sex and age differences in plasma ACTH and cortisol responses and their reproducibility in healthy adults. *Endocr J* 40:571-9, 1993.
- [195]. **Wust S, Federenko I, Hellhammer DH and Kirschbaum C.** Genetic factors, perceived chronic stress, and the free cortisol response to awakening. *Psychoneuroendocrinology* 25:707-20, 2000.
- [196]. **Kirschbaum C, Wust S, Faig HG and Hellhammer DH.** Heritability of cortisol responses to human corticotropin-releasing hormone, ergometry, and psychological stress in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1526-30, 1992.
- [197]. **Smyth JM, Ockenfels MC, Gorin AA, Catley D, Porter LS, Kirschbaum C, Hellhammer DH and Stone AA.** Individual differences in the diurnal cycle of cortisol. *Psychoneuroendocrinology* 22:89-105, 1997.
- [198]. **Pottinger T and Brierley II.** A putative cortisol receptor in the rainbow trout erythrocyte: stress prevents starvation-induced increases in specific binding of cortisol. *J Exp Biol* 200:2035-43, 1997.
- [199]. **Peinado JR, Laurent V, Lee SN, Peng BW, Pintar JE, Steiner DF and Lindberg I.** Strain-dependent influences on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis profoundly affect the 7B2 and PC2 null phenotypes. *Endocrinology* 146:3438-44, 2005.
- [200]. **Armario A, Gavaldà A and Martí J.** Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology* 20:879-90, 1995.
- [201]. **Priebe K, Brake WG, Romeo RD, Sisti HM, Mueller A, McEwen BS and Francis DD.** Maternal influences on adult stress and anxiety-like behavior in C57BL/6J and BALB/CJ mice: A cross-fostering study. *Dev Psychobiol* 48:95-6, 2006.

- [202]. **Castanon N and Mormede P.** Psychobiogenetics: adapted tools for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 19:257-82, 1994.
- [203]. **Sarrieau A and Mormede P.** Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the inbred Brown Norway and Fischer 344 rat strains. *Life Sci* 62:1417-25, 1998.
- [204]. **Uhart M, Chong RY, Oswald L, Lin PI and Wand GS.** Gender differences in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 31:642-52, 2006.
- [205]. **Flink G, Summer B, Riosie R, Grace O and Quinn J.** Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cell. Mol. Neurobiol.* 16:325-344, 1996.
- [206]. **Sobal J and Stunkard AJ.** Socioeconomic status and obesity: a review of the literature. *Psychol Bull* 105:260-75, 1989.
- [207]. **Kopelman PG.** Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635-43, 2000.
- [208]. **Rosmond R, Chagnon YC, Chagnon M, Perusse L, Bouchard C and Bjorntorp P.** A polymorphism of the 5'-flanking region of the glucocorticoid receptor gene locus is associated with basal cortisol secretion in men. *Metabolism* 49:1197-9, 2000.
- [209]. **Wajchenberg BL.** Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21:697-738, 2000.
- [210]. **Rosmond R and Bjorntorp P.** Psychosocial and socio-economic factors in women and their relationship to obesity and regional body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:138-45, 1999.
- [211]. **Duclos M, Timofeeva E, Michel C and Richard D.** Corticosterone-dependent metabolic and neuroendocrine abnormalities in obese Zucker rats in relation to feeding. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E254-66, 2005.
- [212]. **Naeser P.** Effects of adrenalectomy on the obese-hyperglycemic syndrome in mice (gene symbol ob). *Diabetologia* 9:376-9, 1973.
- [213]. **Tokuyama K and Himms-Hagen J.** Increased sensitivity of the genetically obese mouse to corticosterone. *Am J Physiol* 252:E202-8, 1987.
- [214]. **Michel C, Levin BE and Dunn-Meynell AA.** Stress facilitates body weight gain in genetically predisposed rats on medium-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R791-9, 2003.
- [215]. **Timofeeva E and Richard D.** Activation of the central nervous system in obese Zucker rats during food deprivation. *J Comp Neurol* 441:71-89, 2001.

- [216]. **Guillaume-Gentil C, Rohner-Jeanrenaud F, Abramo F, Bestetti GE, Rossi GL and Jeanrenaud B.** Abnormal regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the genetically obese fa/fa rat. *Endocrinology* 126:1873-9, 1990.
- [217]. **Richard D, Rivest R, Naimi N, Timofeeva E and Rivest S.** Expression of corticotropin-releasing factor and its receptors in the brain of lean and obese Zucker rats. *Endocrinology* 137:4786-95, 1996.
- [218]. **Walker CD, Scribner KA, Stern JS and Dallman MF.** Obese Zucker (fa/fa) rats exhibit normal target sensitivity to corticosterone and increased drive to adrenocorticotropin during the diurnal trough. *Endocrinology* 131:2629-37, 1992.
- [219]. **Perello M, Moreno G, Gaillard RC and Spinedi E.** Glucocorticoid-dependency of increased adiposity in a model of hypothalamic obesity. *Neuro Endocrinol Lett* 25:119-26, 2004.
- [220]. **Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR and Flier JS.** A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294:2166-70, 2001.
- [221]. **Sainsbury A, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F and Jeanrenaud B.** Adrenalectomy prevents the obesity syndrome produced by chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats. *Diabetes* 46:209-14, 1997.
- [222]. **Zakrzewska KE, Sainsbury A, Cusin I, Rouru J, Jeanrenaud B and Rohner-Jeanrenaud F.** Selective dependence of intracerebroventricular neuropeptide Y-elicited effects on central glucocorticoids. *Endocrinology* 140:3183-7, 1999.
- [223]. **Jayo JM, Shively CA, Kaplan JR and Manuck SB.** Effects of exercise and stress on body fat distribution in male cynomolgus monkeys. *Int J Obes Relat Metab Disord* 17:597-604, 1993.
- [224]. **Cunningham JJ, Calles-Escandon J, Garrido F, Carr DB and Bode HH.** Hypercorticoosteronuria and diminished pituitary responsiveness to corticotropin-releasing factor in obese Zucker rats. *Endocrinology* 118:98-101, 1986.
- [225]. **Harris R, Howell L, Mitchell T, Youngblood B, York D and Ryan D.** Stress and macronutrient selection. *Psychology. CRC Press LLC*:473-483, 2000.
- [226]. **Lennie TA, McCarthy DO and Keesey RE.** Body energy status and the metabolic response to acute inflammation. *Am J Physiol* 269:R1024-31, 1995.
- [227]. **Thakore JH, Mann JN, Vlahos I, Martin A and Reznick R.** Increased visceral fat distribution in drug-naive and drug-free patients with schizophrenia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:137-41, 2002.

- [228]. **Chrousos GP**. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S50-5, 2000.
- [229]. **Pasquali R, Gagliardi L, Vicennati V, Gambineri A, Colitta D, Ceroni L and Casimirri F**. ACTH and cortisol response to combined corticotropin releasing hormone-arginine vasopressin stimulation in obese males and its relationship to body weight, fat distribution and parameters of the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:419-24, 1999.
- [230]. **Bjorntorp P and Rosmond R**. Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S80-5, 2000.
- [231]. **Wolf G**. Glucocorticoids in adipocytes stimulate visceral obesity. *Nutr Rev* 60:148-51, 2002.
- [232]. **Stephoe A, Cropley M, Griffith J and Joeke K**. The influence of abdominal obesity and chronic work stress on ambulatory blood pressure in men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:1184-91, 1999.
- [233]. **Couturier K, Servais S, Koubi H, Sornay-Mayet M, Cottet-Emard J, Lavoie J and Favier R**. Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats. *Obes Res* 10:188-195, 2001.
- [234]. **Veyrat-Durebex C and Alliot J**. Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol Behav* 62:1273-8, 1997.
- [235]. **Campen TJ, Vaughn DA and Fanestil DD**. Mineralo- and glucocorticoid effects on renal excretion of electrolytes. *Pflugers Arch* 399:93-101, 1983.
- [236]. **Burton G, Galigniana M, De Lavallaz S, Brachet-Cota AL, Sproviero EM, Ghini AA, Lantos CP and Damasco MC**. Sodium-retaining activity of some natural and synthetic 21-deoxysteroids. *Mol Pharmacol* 47:535-43, 1995.
- [237]. **Windle RJ, Wood SA, Lightman SL and Ingram CD**. The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology* 139:4044-52, 1998.
- [238]. **Haleem DJ, Kennett G and Curzon G**. Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis. *Brain Res* 458:339-47, 1988.
- [239]. **Kant GJ, Lenox RH, Bunnell BN, Mougey EH, Pennington LL and Meyerhoff JL**. Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology* 8:421-8, 1983.

- [240]. **Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A and Okamoto R.** Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids* 68:439-45, 2003.
- [241]. **Xiao E, Xia L, Shanen D, Khabele D and Ferin M.** Stimulatory effects of interleukin-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis on gonadotropin secretion in ovariectomized monkeys replaced with estradiol. *Endocrinology* 135:2093-8, 1994.
- [242]. **Marissal-Arvy N, Mormede P and Sarrieau A.** Strain differences in corticosteroid receptor efficiencies and regulation in Brown Norway and Fischer 344 rats. *J Neuroendocrinol* 11:267-73, 1999.
- [243]. **Dhabhar FS, McEwen BS and Spencer RL.** Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin levels--a comparison between Sprague-Dawley, Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res* 616:89-98, 1993.
- [244]. **Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS and Spencer RL.** Differential activation of adrenal steroid receptors in neural and immune tissues of Sprague Dawley, Fischer 344, and Lewis rats. *J Neuroimmunol* 56:77-90, 1995.
- [245]. **Langois A, Mormede P, Tridon C and Marissal-Arvy N.** Different nutritional responses to corticosterone chronic treatments between Fischer 344, obesity-resistant Lou/C and Lewis rats. *submitted*,
- [246]. **Cannon B and Lindberg O.** Mitochondria from brown adipose tissue: isolation and properties. *Methods Enzymol* 55:65-78, 1979.
- [247]. **Delarue J, Matzinger O, Binnert C, Schneiter P, Chiolero R and Tappy L.** Fish oil prevents the adrenal activation elicited by mental stress in healthy men. *Diabetes Metab* 29:289-95, 2003.
- [248]. **Meyer L and Caston J.** Stress alters caffeine action on investigatory behaviour and behavioural inhibition in the mouse. *Behav Brain Res* 149:87-93, 2004.
- [249]. **Harris RB, Zhou J, Youngblood BD, Rybkin, II, Smagin GN and Ryan DH.** Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *Am J Physiol* 275:R1928-38, 1998.
- [250]. **Wang SW.** Effects of restraint stress and serotonin on macronutrient selection: a rat model of stress-induced anorexia. *Eat Weight Disord* 7:23-31, 2002.
- [251]. **Natelson BH, Creighton D, McCarty R, Tapp WN, Pitman D and Ottenweller JE.** Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiol Behav* 39:117-25, 1987.
- [252]. **Zhou D, Shanks N, Riechman SE, Liang R, Kusnecov AW and Rabin BS.** Interleukin 6 modulates interleukin-1-and stress-induced activation of the

- hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats. *Neuroendocrinology* 63:227-36, 1996.
- [253]. **Levy JR, Davenport B, Clore JN and Stevens W.** Lipid metabolism and resistin gene expression in insulin-resistant Fischer 344 rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E626-33, 2002.
- [254]. **Ljung T, Ottosson M, Ahlberg AC, Eden S, Oden B, Okret S, Bronnegard M, Stierna P and Bjorntorp P.** Central and peripheral glucocorticoid receptor function in abdominal obesity. *J Endocrinol Invest* 25:229-35, 2002.
- [255]. **Lacroix M, Gaudichon C, Martin A, Morens C, Mathe V, Tome D and Huneau JF.** A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R934-42, 2004.
- [256]. **Lever JD, Mukherjee S, Norman D, Symons D and Jung RT.** Neuropeptide and noradrenaline distributions in rat interscapular brown fat and in its intact and obstructed nerves of supply. *J Auton Nerv Syst* 25:15-25, 1988.
- [257]. **Rohlf s EM, Daniel KW, Premont RT, Kozak LP and Collins S.** Regulation of the uncoupling protein gene (Ucp) by beta 1, beta 2, and beta 3-adrenergic receptor subtypes in immortalized brown adipose cell lines. *J Biol Chem* 270:10723-32, 1995.
- [258]. **Kozak UC and Kozak LP.** Norepinephrine-dependent selection of brown adipocyte cell lines. *Endocrinology* 134:906-13, 1994.
- [259]. **Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B and Auwerx J.** Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-9, 1995.
- [260]. **Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H and Hauner H.** Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 45:1435-8, 1996.
- [261]. **Perrin D, Soulage C, Pequignot JM and Geloën A.** Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* 46:1489-96, 2003.

## ANNEXES

### **Annexe 1 : Procédure chirurgicale de cathérisation de la veine cave via la veine jugulaire**

#### **Matériel et réactifs**

Chlorure de sodium à 0.9%

Plyvinylpyrrolidone (PVP) 26616297 (Prolabo)

Tube silastic, 0.508 (D.I. mm)x 0.1938 (D.E.mm) 602135 (LPI distribution)

Tube silastic, 0.635 (D.I.mm)x 1.1938 (D.E.mm) 602155 (LPI distribution)

Tube PVC, 1.6 (D.I.mm)x 3.2 (D.E.mm)x 0.8mm B72424 (Fisher Bioblock Scientific)

Tube tygon, 0.76 (D.I.mm)x 2.29 (D.E.mm)x 0.76mm B72425 (Fischer Bioblock Scientific)

Vis BN402 DIN84A (Weber métaux)

Dentalon Plus, poudre 64702604 (Laboratoire Kulzer, groupe heraeus)

Dentalon, solvant 64702588 (laboratoire Kulzer, groupe heraeus)

Héparine sodique 5000UI/mL (Laboratoire Léo)

#### **Préparation des cathéters et des pièces de têtes**

**« Pièce de tête »** : cette étape consiste à insérer une pince fine de taille moyenne dans le manchon de silastic 155 ; écarter la pince et faire glisser le cathéter silastic 135 de 130 mm de long dans le manchon. Placer le manchon à 50 mm.

**Tube courbé de la « pièce de tête »** : il s'agit de sectionner délicatement l'extrémité pointue de l'aiguille bleue (23Gx1<sup>1/2</sup>) après avoir donné un coup de lime sec. Limer le tour de l'ouverture et l'intérieur du trou à l'aide d'une lime anguleuse. Donner une courbure régulière au tube à l'aide d'une pince à clamer, puis sectionner comme précédemment l'extrémité coté support plastique et limer (former un angle d'environ 60°).

**Tube plastique de la « pièce de tête »** : cette pièce est utilisée pour éviter le reflux de sang lors des prélèvements en la pinçant avant de retirer le bouchon. Enfiler le tube fin Technicon 1.5 cm, sur une aiguille bleue coupée. Mouiller l'extérieur du tube fin à l'aide du compte goutte d'acétone et très rapidement l'enfiler dans le tube Technicon 1 cm de diamètre supérieur (ou bien déposer quelques gouttes d'acétone à l'intérieur du gros tube et enfiler le tube fin)

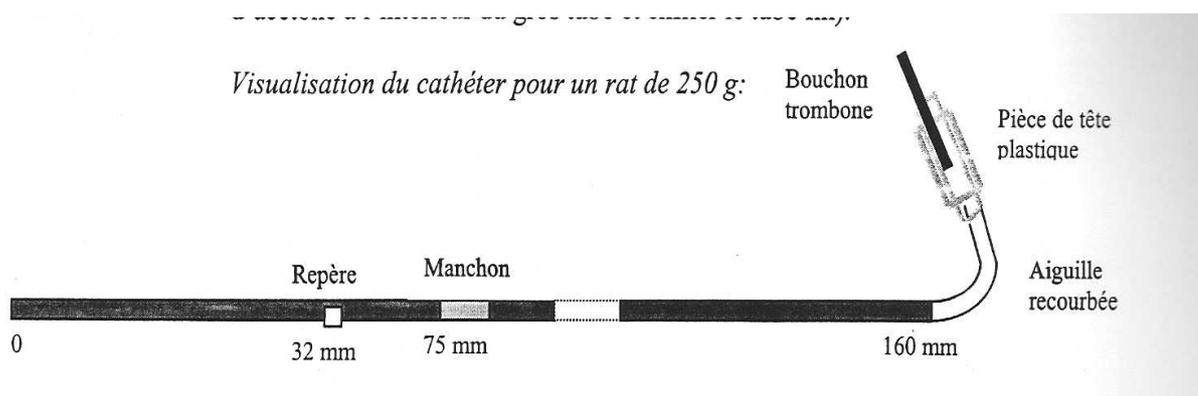
#### **Protocole opératoire**

Les rats sont anesthésiés avec un mélange kétamine (Imagene 1000 ; 75mg/kg) et Xylazine (Rompun 1% ; 1mg/kg). La région crânienne et la région scapulaire droite sont épilées. Une

incision longitudinale de 2 cm est réalisée au niveau de la région scapulaire puis la veine jugulaire est dégagée. Deux fils de ligature sont posés : l'un vers la tête et l'autre vers la partie abdominale. Le cathéter préalablement biseauté et rempli par une solution de chlorure de sodium hépariné à 1% est introduit au niveau de la veine jugulaire et poussé délicatement jusqu'à la veine cave inférieure en franchissant l'atrium. La bonne mise en place du cathéter est vérifiée en aspirant le sang, puis en repoussant de la solution de chlorure de sodium hépariné dans le cathéter à l'aide d'une seringue. La deuxième extrémité du cathéter est ensuite passée en sous-cutané le long de l'épaule et du cou puis ressortie au niveau de la tête jusqu'à atteindre le crâne. L'extrémité du cathéter est réajustée à la morphologie de la tête du rat pour un meilleur confort et la pièce de tête est mise en place. L'ensemble du dispositif est fixé au niveau du crâne où il est fixé grâce à des vis et du ciment dentaire. A la fin de l'opération, une deuxième vérification du bon fonctionnement du cathéter a lieu comme précédemment puis 0.03 ml de solution de PVP est injectée dans le cathéter. Un traitement antibiotique est effectué de manière à prévenir les risques d'infection. Le rat est ensuite laissé sur un tapis chaud jusqu'à son réveil.

Tous les 2 jours suivant l'opération, la perméabilité du cathéter est vérifiée à l'aide de sérum physiologique hépariné (50 U.I./ml), et de solution de PVP (1g dans 2 ml d'une solution de sérum physiologique héparinée à 500 U/ml) de manière à éviter la formation de caillots de sang.

**Figure 19.** Schéma représentant les éléments associés du cathéter veineux.



## **Annexe 2 : Thermogénèse par mesure de l'activité des mitochondries du TAB**

### **Description de la méthodologie :**

Il s'agit d'évaluer l'activité des protéines découplantes (UCP 1) dans le tissu adipeux brun. Cette méthode a été mise au point par Gubern et coll. en 1990 à partir de la méthode de Cannon. La consommation d'O<sub>2</sub> est mesurée par un système d'électrodes : une cathode de platine et une anode en argent sont reliées par un pont salin (détection électrochimique). Le gradient de protons est mesuré par un potentiel de membrane grâce à un système d'électrodes (une électrode de référence et une électrode à téraphényl phosphonium (TPP<sup>+</sup>) qui répond aux variations de concentration de TPP<sup>+</sup> restant dans la milieu.

Après avoir été disséqué, le TAB est placé dans un milieu d'homogénat isotonique (pH 7.2) constitué de : saccharose 0.25M, TES (tampon) 5 mM et EGTA 0.2 mM puis broyé à l'aide d'un potter pour isoler les mitochondries. Après une première centrifugation (750g, 2500 tr.mn<sup>-1</sup>) afin de séparer les lipides, les débris cellulaires et noyaux des organites qui se trouvent dans le surnageant contenant les mitochondries. Ce surnageant est ensuite récupéré et centrifugé à 8500g, 8500 tr.mn<sup>-1</sup> ce qui permet de séparer les mitochondries des microsomes.

Le culot de mitochondries est récupéré dans un homogénat afin de les ressolubiliser.

Ensuite ces mitochondries sont placées dans un milieu de respiration saturé en O<sub>2</sub> composé de saccharose (20 mM), TES 10 mM (tampon), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Mg Cl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 1 mM (fixe le Ca<sup>2+</sup>), serum-albumine bovine 0.1% (fixe les acides gras présents), roténone 5μM (inhibe la NADH déshydrogénase). La consommation d'O<sub>2</sub> est mesurée par détection électrochimique tandis que le potentiel de membrane est mesuré à partir des variations de concentration de TPP<sup>+</sup> restant dans le milieu. **NB** : Le TPP<sup>+</sup> (Tétraphényl Phosphonium) est une sonde (cation lipophile) qui a la capacité de pénétrer dans les mitochondries.

La consommation d'O<sub>2</sub> est mesurée en même temps que le potentiel de membrane et ces deux système de mesures sont reliés à un ordinateur qui permet de visualiser en temps réel l'évolution de ces deux paramètres.

Le milieu de respiration saturé en O<sub>2</sub> est placé dans une cuve (V=1.5ml) contenant de la solution de mitochondries puis étalonnée avec le TPP<sup>+</sup>. Le substrat α-glycérophosphate est ajouté de manière croissante.

Sur l'écran de l'ordinateur, apparaissent : -une courbe représentant la quantité d'O<sub>2</sub> présente dans le milieu en fonction du temps et - une courbe retraçant le potentiel de membrane.

Les résultats sont présentés sous forme de courbe de force proton-motrice (potentiel de membrane en fonction du flux de protons (vitesse de respiration))

### **Annexe 3 : Dosage d'Insuline par RIA**

Cette procédure décrit la méthode de dosage de l'insuline par « radioimmunoassay » avec le kit de dosage Diasorin

#### **Principe du dosage :**

Ce dosage repose sur la compétition entre l'insuline marquée et l'insuline contenue dans les échantillons vis-à-vis des sites d'anticorps présents en nombre limité et fixe.

La quantité d'insuline marquée fixée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'insuline non marquée présente dans l'échantillon.

Le moyen de séparation lié/libre est basé sur l'emploi d'un réactif immunoprécipitant, dans lequel un second anticorps en excès est pré-précipité, suivi d'une centrifugation de la suspension et décantation du surnageant. La mesure de la radioactivité dans le culot permet de calculer la quantité d'insuline marquée présente dans la fraction libre liée.

La quantité d'insuline non marquée présente dans l'échantillon est déterminée par extrapolation à partir d'une courbe standard.

#### **Réactifs fournis dans la trousse.**

Ces réactifs doivent être reconstitués avec de l'eau distillée.

Réactifs	Volume après reconstitution
Insuline marquée	10 ml
Etalon 0 : 0 µU/ml	2 ml
Etalon 1 : 10 µU/ml	1 ml
Etalon 2 : 25 µU/ml	1 ml
Etalon 3 : 50 µU/ml	1 ml
Etalon 4 : 100 µU/ml	1 ml
Etalon 5 : 200 µU/ml	1 ml
Sérum anti-insuline	10 ml
Réactif immunoprécipant	53 ml
Sérum de contrôle	1 ml

#### **Matériel nécessaire**

- eau distillée, -pipettes de (50 µl, 100 µl, 1000 µl, 10 ml), - tubes de 5ml en polystyrène et portoirs pour tubes de 5 ml, - vortex, - centrifugeuse, -Trompe à vide, - compteur Gamma, - papier spécial pour absorption

### Mode opératoire :

La distribution des réactifs doit être effectuée à température ambiante (20- 25°C)

Préparer un tube d'étalon à 5 µU/ml, soit 200 µl d'étalon 1 + 200 µl d'étalon 0.

Les différentes procédures sont décrites dans le tableau ci-dessous.

#### Etape 1 :

Réactifs	Activité totale	NSB	Etalons 0 à 200 µU/ml	Echantillons
Etalon 0	-	100 µl	100 µl	-
Etalon 1 à 5		-	100 µl	-
Echantillons	-	-	-	100 µl
<b>Traceur</b>	<b>100 µl</b>	<b>100 µl</b>	<b>100 µl</b>	<b>100 µl</b>
Anti-sérum	-	-	100 µl	100 µl

Agiter les tubes au vortex et laisser incuber 1h30 à température ambiante en couvrant les tubes avec du parafilm.

#### Etape 2

Après 1h30 d'incubation, ajouter 1 ml de réactif précipitant à l'aide d'une multipipette sauf dans le tube activité totale.

Agiter les tubes au vortex et les mettre dans les portoirs à centrifuger. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante, puis centrifuger à 3000 tr/min, pendant 20 minutes à température ambiante.

#### Etape 3

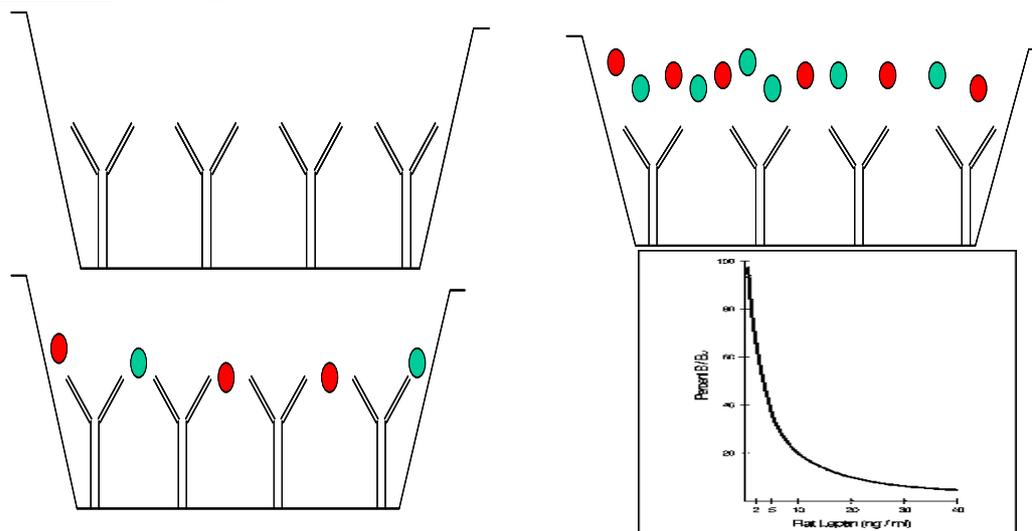
Eliminer le surnageant par aspiration à l'aide d'une trompe à vide, et faire attention à ne pas toucher le précipité.

#### Etape 4

Placer les tubes dans la cassette portant le numéro du protocole prédéfini convenable en respectant l'ordre décrit dans le « tube display »

Mesurer la radioactivité du culot pendant 4 minutes. Inclure l'étalon 0 de la gamme.

## Annexe 4 : Dosage de Leptine en RIA



Cette procédure décrit la méthode de dosage de leptine par « radioimmunoassay » avec le kit de dosage Linco

### **Principe du dosage :**

Ce dosage repose sur la compétition entre la leptine marquée et celle contenue dans les échantillons vis-à-vis des sites d'anticorps présents en nombre limité et fixe.

La quantité de leptine marquée fixée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité de leptine non marquée présente dans l'échantillon.

**Réactifs fournis dans la trousse :** Ces réactifs sont reconstitués avec de l'eau distillée.

Réactifs	Volume
Tampon	40 ml
Etalon 1 : 1 ng/ml	1 ml
Etalon 2 : 2 ng /ml	1 ml
Etalon 5 : 5 ng /ml	1 ml
Etalon 10 : 10 ng /ml	1 ml
Etalon 20 : 20 ng /ml	1 ml
Etalon 50 : 50 ng /ml	1 ml
Sérum anti-leptine	26 ml
Leptine marquée	27 ml
Réactif immunoprécipant	260 ml
Tampon	27ml
Contrôle 1	1 ml
Contrôle 2	1 ml

### Matériel nécessaire

- pipettes de (50 µl, 100 µl, 1 ml), - tubes de 5ml en polystyrène et portoirs pour tubes de 5 ml,
- vortex, - centrifugeuse, -Trompe à vide, - compteur Gamma, -papier spécial pour absorption

### Mode opératoire :

Le dosage se déroule en trois jours répartis dans le tableau qui suit :

<u>JOUR 1</u>					<u>JOUR 2</u>		<u>JOUR 3</u>	
Etape1	Etape 2	Etape 2	Etape 2	Etape 2				
N° de tubes	Ajout de tampon	Standard, contrôles et échantillons	Ajout de l'anticorps	Vortexer et incuber	Ajout de la radioactivité	Vortexer et incuber	Ajout du précipitant	Incuber 20min à 4°C, centrifuger, décanter et compter
1-2	-	-	-		100µl		1 ml	
3-4	300	-	-		100µl		1 ml	
5-6	200	-	100µl		100µl		1 ml	
7-8	100	100µl de 0.5 ηg/ml	100µl		100µl		1 ml	
9-10	100	100µl de 1 ηg/ml	100µl		100µl		1 ml	
11-12	100	100µl de 2ηg/ml	100µl		100µl		1 ml	
13-14	100	100µl de 5 ηg/ml	100µl		100µl		1 ml	
15-16	100	100µl de 10 ηg/ml	100µl		100µl		1 ml	
17-18	100	100µl de 20 ηg/ml	100µl		100µl		1 ml	
19-20	100	100µl de 50 ηg/ml	100µl		100µl		1 ml	
21-22	100	100µl de C1	100µl		100µl		1 ml	
23-24	100	100µl de C2	100µl		100µl		1 ml	
25-n	100	100µl de l'échant	100µl		100µl		1 ml	

### **Annexe 5 : Dosage de corticostérone par RIA**

Cette procédure décrit la méthode de dosage de l'insuline par « radioimmunoassay » avec le kit de dosage Diasorin CA-1529

#### **Principe du dosage :**

La trousse Gamma Coat ( $I^{125}$ ) Cortisol permet le dosage du cortisol par une méthode radioimmunologique par compétition. Les étalons et échantillons sont incubés avec le marqueur cortisol dans des tubes revêtus d'anticorps. Les anticorps sont immobilisés sur la paroi interne du fond du tube. Après incubation, le contenu du tube est aspiré ou décanté et le tube est compté.

Une courbe d'étalonnage est réalisée avec 6 étalons sériques dont les concentrations connues varie entre 0 et 60  $\mu\text{g/dl}$ . Les valeurs des échantillons à déterminer sont calculés à partir de la courbe d'étalon.

Réactifs fournis dans la trousse :

Réactifs	Quantité
Marqueur ( $I^{125}$ )	500 ml
Etalon A	1 ml
Etalon B	1 ml
Etalon C	1 ml
Etalon D	1 ml
Etalon E	1 ml
Etalon F	1 ml
Tubes revêtus de sérum anti-cortisol de lapin	500
Tampon PBS	500 ml

#### **Matériel nécessaire**

Micropipette de 10  $\mu\text{l}$ , multipipette, - bain-marie thermostaté,  $37 \pm 2$  °C et portoirs pour tubes de 5 ml, - vortex, - centrifugeuse, - Trompe à vide, - compteur Gamma, -

## Mode opératoire :

### Etape 1

Amener tous les réactifs à température ambiante et les mélanger doucement afin d'éviter la formation de mousse. Numéroter et compléter les tubes comme ci-dessous :

Tubes	Réactif 1 (10 $\mu$ l)	Réactif 2 (1 ml)
T, totaux	<b>Tampon marqueur</b>	<b>Tampon marqueur</b>
A, B <sub>0</sub>	Blanc sérique cortisol	-
B	Etalon sérique cortisol 1 $\mu$ g/dl	-
C	Etalon sérique cortisol, 3 $\mu$ g/dl	-
D	Etalon sérique cortisol, 10 $\mu$ g/dl	-
E	Etalon sérique cortisol, 25 $\mu$ g/dl	-
F	Etalon sérique cortisol, 60 $\mu$ g/dl	-
Echantillons	Echantillons	-

Agiter les tubes doucement au vortex et incuber 45 minutes au bain marie à 37°C.

### Etape 2

Eliminer le surnageant par aspiration à l'aide d'une trompe à vide.

### Etape 3 :

Rincer le culot avec 1 ml de PBS 1X, agiter doucement au vortex, centrifuger pendant 15 min à 2500-3000 tr/min, à température ambiante. Eliminer le surnageant par aspiration avec une trompe à vide

### Etape 4

Placer les tubes dans la cassette portant le numéro du protocole prédéfini convenable en respectant l'ordre décrit dans le « tube display »

Mesurer la radioactivité du culot pendant 2 minutes.

## **Annexe 6: Tableaux de composition des différents régimes**

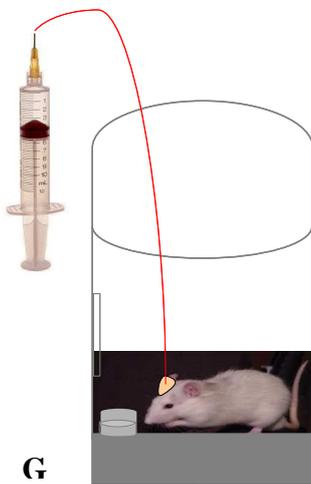
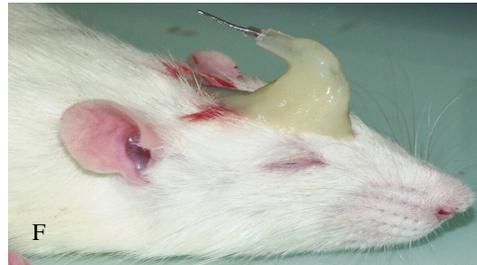
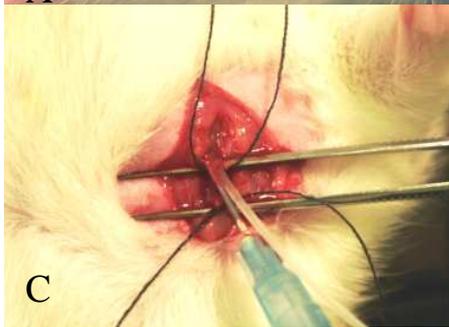
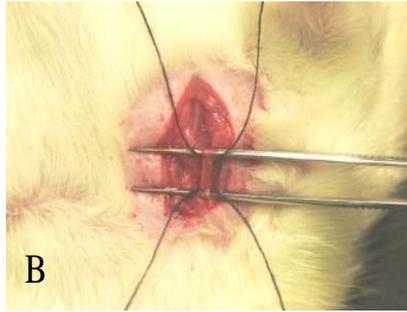
**Tableau : Composition du régime P14**

<b>Ingrédients</b>	<b>g/100g</b>
Protéine de lait	14
Amidon	62.24
Saccharose	10.03
Huile de soja	4
Sels minéraux	3.5
Vitamines	1
Cellulose	5
Choline	0.23
Total	100
<b>Valeur en énergie (kcal/100g)</b>	<b>362.33</b>

**Tableau : Composition des régimes en choix.**

	<b>Ingrédients</b>	<b>Pour 100g</b>
<b>Glucides</b> <b>3.3 kcal/g</b>	Amidon de maïs	80.27
	Saccharose	10
	Cellulose	5
	Sels minéraux	3.5
	Vitamines	1
	choline	0.23
-----		
<b>Protéines</b> <b>3.9 kcal/g</b>	Protéine de lait totale	90.27
	Cellulose	5
	Sels minéraux	3.5
	Vitamines	1
	choline	0.23
-----		
<b>Lipides</b> <b>7.6 kcal/g</b>	Saïndoux	36
	Huile de soja	54.27
	Cellulose	5
	Sels minéraux	3.5
	Vitamines	1
choline	0.23	

**Annexe 7 : implantation de cathéter dans la veine jugulaire droite chez le rat**



- A** : dégageant du crâne
- B** : dégageant de la veine jugulaire
- C** : introduction du cathéter dans la veine
- D** : Mise en place des clous fixateurs
- E** : passage sous-cutané du cathéter
- F** : fixation du cathéter par le ciment dentaire
- G** : dispositif de prélèvement de sang