



HAL
open science

Contributions à l'étude de l'influence de l'alimentation sur la régulation du sommeil

Benjamin Guesdon

► **To cite this version:**

Benjamin Guesdon. Contributions à l'étude de l'influence de l'alimentation sur la régulation du sommeil. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2006. English. NNT : 2006INAP0003 . pastel-00001931

HAL Id: pastel-00001931

<https://pastel.hal.science/pastel-00001931>

Submitted on 28 Sep 2006

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 de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Nutrition Humaine

Contributions à l'étude de l'influence de l'alimentation sur la régulation du sommeil

présentée et soutenue publiquement par

Benjamin Guesdon

le 17 février 2006

Directeur de thèse

Patrick Even (INRA UMR 914)

Rapporteurs

Zara de Saint-Hilaire (Université-Hôpital de Genève)

Jean-Luc Gaillard (Université Henry Poincaré-Nancy 1)

Examineurs

Joëlle Leonil (INRA Rennes) Philippe Schmidely (INAP-G) Daniel Tomé (INAP-G)

Catherine Lefranc (ROQUETTE) Jérôme Tausin (INGREDIA)

*Il doit bien y avoir un moyen de s'échapper de cet enfer...
il y en a sûrement un, en dehors du sommeil et des rêves...*

Hugo Pratt

Bénédiction

Je remercie tout d'abord les institutions qui ont assuré mon financement au cours de ces trois années de thèse : l'Association Nationale de la Recherche Technique et l'entreprise INGREDIA qui ont permis à la Convention Industrielle de Formation par la Recherche, sous laquelle ce travail de thèse a été réalisé, de voir le jour. C'est donc ici qu'il me faut mentionner celui dont la légende dit que par tout temps et toute latitude, rien ne saurait l'empêcher d'accomplir son footing matinal : merci à Daniel Tomé, mi-homme, mi-institution, de m'avoir autorisé à effectuer cette thèse au sein l'unité INRA 914 dont il assume avec panache la promotion aux quatre coins de la France, de la Navarre et du reste du monde.

Je souhaite ensuite chaleureusement remercier Zara de Saint-Hilaire et Jean-Luc Gaillard d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Joëlle Leonil et Philippe Schmidely d'avoir bien voulu prendre part au jury de thèse en tant qu'examineurs.

Côté entreprise, je tiens à remercier plus particulièrement Catherine Lefranc, qui a pendant longtemps encadré ce travail en tant que responsable de la Recherche et du Développement Nutrition et Santé chez INGREDIA. Il fut très bon, lors de mes visites à Arras comme lors des réunions à Paris, mais bien plus souvent encore par téléphone ou ordinateur interposé, de trouver une responsable chez qui les qualités professionnelles s'accompagnent de grandes qualités humaines. Un grand merci aussi à Jérôme Tauzin pour avoir dignement repris le flambeau et suivi l'accouchement final de cette thèse. Tous les deux se sont toujours montrés idéalement disponibles et attentifs en cas de besoin, malgré leurs propres (et prodigieuses) charges de travail. Merci enfin à Dorothée Decherf, de la direction des Ressources Humaines, pour avoir réussi à s'occuper aussi bien d'un salarié insupportable qui, bien que distant, fut conscient de ne pas avoir toujours été assez attentif aux contraintes administratives et salariales.

Côté laboratoire, mon cadre de vie et de travail de ces dernières années, j'adresse un clin d'œil amical et sincère à Patrick Even, directeur de thèse à la fois unique et préféré, force vive et metteur en boîte de talent. A ce grand partisan de l'idéal-pessimisme et non moins excellent scientifique que les rigueurs hyper boréales de la recherche publique française poussent vers

les terres inconnues de l'entrepreneuriat, j'envoie tous mes vœux de bonheur pour ses projets professionnels et personnels. Un simple remerciement n'aurait pas de sens : une grande partie de cette thèse repose sur les connaissances qu'il m'a transmises, et le reste n'aurait pas vu le jour sans son aide. Ce travail est donc aussi le sien (en moins réussi bien entendu !).

Sophie Daré pour l'analyse des données de calorimétrie (entre autre !), Nadine Jeanguyot (UNCEIA), Anne Regourd (ENSAIA) et Michel Dubarry pour leur aide sur les dosages, Sylvette Gougis qui m'a accompagné dans mes débuts hésitants en immunohistochimie sur coupes de cerveau, Angélique Simonin le feu follet de l'animalerie, Fabienne Decuq et Marie-Dominique Lucenay, toujours disponibles au secrétariat : merci à toutes et à tous ! Une thèse, c'est aussi beaucoup, beaucoup, mais beaucoup d'importants conseils et coups de main reçus. Pour n'oublier personne, je devrais remercier l'ensemble du personnel technique et des titulaires de l'UMR INRA 914, avec une pensée toute particulière pour Christianne Larue-Achagiotis, chercheuse émérite et personnalité entière du laboratoire, dont j'ai partagé l'espace vital, les conversations et à l'occasion, les bons petits plats pendant ces années de thèse. Merci enfin à Michaël Messaoudi (Etap-Nancy) qui m'a si aimablement accueilli et conseillé au sujet des protocoles et tests de stress.

Je profite également de ces remerciements pour saluer et encourager très spécifiquement le sous-prolétariat de la recherche publique que constituent les innombrables étudiants français et étrangers, stagiaires et thésards, petites mains pour gros cerveaux, que j'ai eu la chance de rencontrer et parfois même d'un peu mieux connaître au cours de ces quelques années. Que la Recherche soit un sacerdoce, tout le monde s'accorde à le reconnaître et à le saluer... mais encore faut il obtenir l'ordination ! Mes pensées et mon respect vont vers ceux qui luttent, la plupart du temps sans visibilité ni certitudes, et dans des situations parfois précaires, pour se frayer un chemin entre foi aveugle et conviction éclairée dans cette jungle. Beaucoup sont devenus plus que des collègues et se reconnaîtront, je leur souhaite bon vent et leur dis à bientôt.

Enfin, un immense merci à Gilles Fromentin pour m'avoir poussé à rencontrer la femme de ma vie à Saint-Nectaire, puit de dôme et des espoirs non déçus. Que son nom soit à jamais béni des dieux et que ses pieds soient baignés dans le miel matin et soir pendant cent ans pour adoucir son chemin.

Merci par dessus tout à Emilie d'exister si pleinement.

Résumé

Les rapports entre sommeil et alimentation sont l'objet d'interactions complexes et multiples. Dans ce cadre, le champ d'étude de l'influence de l'alimentation sur le sommeil constitue non seulement une porte d'entrée vers une meilleure compréhension de la régulation du sommeil, mais aussi une importante voie thérapeutique pour en prévenir et soigner les dysfonctionnements. Nous avons choisi d'aborder ce thème par deux approches différentes : une « approche métabolique », celle de l'influence sur le sommeil de l'alimentation globale en terme d'apports protéino-énergétiques, c'est-à-dire, de substrats métaboliques; une « approche nutraceutique », celle de l'influence sur le sommeil de molécules spécifiques apportées par l'alimentation. Ces angles d'étude complémentaires, représentatifs de la diversité et de la complexité des possibilités d'influence de l'alimentation sur le sommeil, ont servi de base à nos travaux de recherche, réalisés sur le modèle du rat. Dans la première approche, nous avons pu vérifier l'existence d'un modèle dans lequel des perturbations de la quantité et de la qualité du sommeil sont induites de manière spécifique par des modifications de l'apport alimentaire protéino-énergétique. Dans la deuxième approche, nous nous sommes intéressés au cas particulier d'un hydrolysât peptidique qui, présentant des propriétés anxiolytiques originales, est considéré comme une source potentielle de principe actif agissant sur la régulation du sommeil. Nous avons pu créer un modèle expérimental montrant les propriétés protectrices de l'apport alimentaire de cet hydrolysât sur les perturbations de sommeil induites par le stress. Outre les perspectives que ces résultats ouvrent pour une modulation de la régulation du sommeil et de ses troubles par l'alimentation, comme, par exemple, la possibilité de rétablir un sommeil physiologique, respectant les cycles normaux d'alternance des phases de Sommeil Lent et de Sommeil Paradoxal (que les traitements pharmacologiques ont souvent du mal à rétablir), nos travaux permettent aussi d'éclairer certains aspects de la régulation du sommeil, comme ses liens avec la régulation du métabolisme périphérique et celle de la réponse au stress.

Mots clés : apport protéino-énergétique, métabolisme énergétique et protéique, hydrolysât peptidique de la caséine α_{s1} bovine, stress, sommeil, SOL, SP.

Abstract

Interactions between sleep and food intake are well recognized as being complex and multiple. In this context, we decided to study the influence of food intake on sleep regulation through two complementary approaches: in the so-called metabolic approach, we considered the influence of the whole proteino-energetic intake; in the so-called nutraceutical approach, we considered food intake as a natural source of active molecules. In this last approach, we focused on the case of a particular food compound, that is a tryptic peptidic hydrolysate with anxiolytic properties. First, we produced an original model where not only quantitative but also qualitative modulations of sleep stages appear to be induced by specific modulations of the proteino-energetic composition of the diet, in link with specific modulations of whole body metabolism. Secondly, we showed that the peptidic hydrolysate appears to be able to improve sleep in a physiological way in an animal model of stress-induced sleep impairments. These results bring promising clues for a better understanding of sleep regulation and its links with metabolism and stress. Finally, they also encourage further work on the ability of restaurating a functional and physiological sleep by developing alternative dietary treatments of sleep troubles.

Keywords: proteic and energetic intake, energy and protein metabolism, α_{s1} -casein hydrolysate, stress, sleep, SWS, PS.

Publications et Communications

Articles scientifiques

- **Guesdon, B.**, Minet-Ringet, J., Tome, D.G. and Even, P.C., Restriction-refeeding of calories and protein induces changes to slow wave and paradoxical sleep that parallel changes in body lipid and protein levels in rats, *Behav Brain Res*, 164 (2005) 156-64.

- **Guesdon, B.**, Messaoudi, M., Lefranc-Millot, C., Fromentin, G., Tome, D. and Even, P.C., A tryptic hydrolysate from bovine milk alpha(S1)-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress, *Peptides* (2005).

- Minet-Ringuet, J., Even, P.C., **Guesdon, B.**, Tome, D. and de Beaurepaire, R., Effects of chronic neuroleptic treatments on nutrient selection, body weight, and body composition in the male rat under dietary self-selection, *Behav Brain Res*, 163 (2005) 204-11.

Chapitre d'ouvrages

- **Guesdon, B.**, Pichon, L. and Tome, D., Opioid peptides. In Y. Mine and F. Shahidi (Eds.), *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, Taylor & Francis, 2005, pp. 365-376.

Article en cours de préparation

- **Guesdon, B.**, Tome, D. and Even, P.C., Precise correlation between metabolism and sleep underlies body lipid and protein depositing after calories or protein refeeding in rats. (en cours de rédaction).

Posters

- **Guesdon, B.**, Rampin, O., Tome, D. et Even, P.C., Existe-t-il un lien entre le sommeil et les processus de synthèse-dégradation au niveau périphérique ? 2^{ème} congrès de la Société Française de Nutrition, 2002, Dijon, France.

- **Guesdon, B.**, Tome, D. et Even, P.C., Existe-t-il un lien entre le sommeil et les processus de synthèse-dégradation au niveau périphérique ?, Association Française d'Etudes et de Recherche sur l'Obésité, 2002, Nice, France.

- **Guesdon, B.**, Tome, D. et Even, P.C., Relationship between Sleep and peripheral energy metabolism ?, SSIB, 2003, Groningen, Pays-Bas.

Table des matières

BENEDICTIONS	3
RESUME	5
ABSTRACT	6
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	7
TABLE DES MATIERES	9
AVANT-PROPOS, QUAND LA SCIENCE RENCONTRE LA CROYANCE POPULAIRE : QUI DINE DORT OU QUI DORT DINE ?	16
<u>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION GENERALE</u>	<u>18</u>
LE SOMMEIL, UN ETAT DE LA VIGILANCE A PART, UNE GRANDE FONCTION PHYSIOLOGIQUE ENCORE INCONNUE	19
1.1 QU'EST-CE QUE LE SOMMEIL ?	19
<i>1.1.1 Généralités : le sommeil, un état particulier de la vigilance</i>	<i>19</i>
1.1.1.1 Définition comportementale du sommeil	20
1.1.1.2 L'étude du sommeil par les enregistrements EEG	21
1.1.1.3 Le sommeil dans le monde animal	22
<i>1.1.2 Le sommeil, un phénomène hétérogène fait de l'alternance de deux stades : sommeil lent et sommeil paradoxal</i>	<i>23</i>
1.1.2.1 Le sommeil lent	23
1.1.2.2 La découverte du sommeil paradoxal	24
1.1.2.3 Le sommeil paradoxal, une forme active de sommeil	24
1.1.2.4 Discrimination des différents stades de sommeil par EEG	25
1.1.2.5 Une organisation complexe en cycles	25
<i>1.1.3 Le sommeil, un processus actif...</i>	<i>26</i>
<i>1.1.4 ...Résultant de mécanismes centraux complexes, en relation avec l'éveil</i>	<i>27</i>
1.1.4.1 Le sommeil suit un rythme circadien	27
1.1.4.2 Le système de l'éveil	28
1.1.4.3 Un système anti-éveil responsable de l'endormissement et du sommeil	30

1.1.4.4 Mécanismes à l'origine du sommeil lent	31
1.1.4.4.1 Système exécutif	31
1.1.4.4.2 Système permissif	31
1.1.4.5 Mécanismes à l'origine du sommeil paradoxal	32
1.1.4.5.1 Le réseau exécutif	32
1.1.4.5.2 Le contrôle permissif	32
1.1.4.6 Esquisse d'un modèle de régulation du cycle veille-sommeil	32
<i>1.1.5 Le sommeil est une variable extrêmement régulée mais difficile à contrôler</i>	<i>34</i>
1.1.5.1 Alors que de nombreux facteurs semblent pouvoir ponctuellement augmenter l'éveil...	34
1.1.5.2 ...Il est beaucoup plus difficile de contrôler artificiellement le sommeil et de le restaurer en cas de besoin	35
1.1.5.2.1 Des substances endogènes pouvant influencer le sommeil	35
1.1.5.2.2 Des drogues hypnogènes peu satisfaisantes	36
1.2 POURQUOI DORMONS NOUS ?	37
<i>1.2.1 Le paradoxe du sommeil : une fonction primordiale pour l'organisme...dont la fonction est une énigme</i>	<i>37</i>
<i>1.2.2 Les premières explications</i>	<i>38</i>
<i>1.2.3 De nombreuses hypothèses au niveau central</i>	<i>39</i>
1.2.3.1 Sommeil et cognition	39
1.2.3.2 Sommeil lent et réparations cellulaires	39
1.2.3.3 Sommeil paradoxal, neurotransmission et maintien de la fonction synaptique	40
1.2.3.4 Sommeil paradoxal, santé mentale et maturation neurale	40
1.2.3.5 Sommeil paradoxal et maintien de l'hérédité psychologique	40
<i>1.2.4 Implication du sommeil dans la régulation du métabolisme périphérique, piste potentielle pour un rôle majeur du sommeil complexe dans l'organisme</i>	<i>41</i>
1.2.4.1 Influence du sommeil sur les rythmes hormonaux et circadien	42
1.2.4.2 Données pathologiques et épidémiologiques: conséquences des perturbations du sommeil sur le métabolisme périphérique	42
1.2.4.2.1 Le travail en horaires décalés	42
1.2.4.2.2 Les troubles du sommeil	43
1.2.4.2.3 La dette de sommeil et le syndrome plurimétabolique	43

1.2.4.3 Données expérimentales : les expériences de privation de sommeil et leur conséquences pour l'organisme	44
1.2.4.3.1 Conséquences d'une réduction de sommeil chez l'homme	44
1.2.4.3.2 Privation totale de sommeil chez les animaux	45
1.2.4.4 Dualité sommeil lent sommeil paradoxal : possibilité d'une action différentielle sur le métabolisme énergétique et protéique	46
1.3 BILAN : POURQUOI S'INTERESSER A L'INFLUENCE DE L'ALIMENTATION DANS LA REGULATION DU SOMMEIL ?	47
1.3.1 <i>Les troubles du sommeil, un problème de santé public majeur</i>	47
1.3.2 <i>Comment l'alimentation est-elle susceptible d'affecter le sommeil ?</i>	49
1.3.2.1 Première approche	49
1.3.2.2 Deuxième approche	50
AVIS AU LECTEUR	51
<u>DEUXIEME PARTIE : APPROCHE METABOLIQUE, INFLUENCE DES APPORTS PROTEINO-ENERGETIQUES EN LIEN AVEC UNE MODULATION DU METABOLISME ENERGETIQUE ET PROTEIQUE SUR LA REGULATION DU SOMMEIL ET DE SES DIFFERENTS STADES</u>	<u>52</u>
2.1 INFLUENCE DE L'APPORT DE SUBSTRATS METABOLIQUES SUR LA REGULATION DU SOMMEIL : ETAT DE L'ART	53
2.1.1 INTRODUCTION	53
2.1.2 ARGUMENTS EN FAVEUR D'UNE INFLUENCE DES APPORTS ENERGETIQUES ET PROTEIQUES DE L'ALIMENTATION SUR LE SOMMEIL	54
2.1.2.1 <i>Le sommeil postprandial</i>	54
2.1.2.2 <i>Apports énergétiques ou protéiques en excès ou déséquilibrés et sommeil</i>	54
2.1.2.3 <i>Expériences de privation de nourriture et de réalimentation</i>	55
2.1.2.4 <i>Nutrition parentérale et sommeil</i>	56
2.1.2.5 <i>Influence de l'état nutritionnel et métabolique à long terme sur le sommeil : troubles du comportement alimentaire et métaboliques et régulation du sommeil.</i>	57
2.1.3 HYPOTHESES SUR LES VOIES D'ACTION POTENTIELLES DE L'APPORT DE SUBSTRATS METABOLIQUES SUR LE SOMMEIL	58
2.1.3.1 <i>Détection précoce des nutriments dans l'intestin</i>	58

2.1.3.2	<i>Le système orexinergique, un système d'intégration d'informations relatives à l'éveil et au comportement alimentaire.</i>	59
2.1.3.3	<i>La régulation humorale du sommeil par l'insuline et la sérotonine</i>	59
2.2	DESCRIPTION DE LA DEMARCHE EXPERIMENTALE SUIVIE	61
2.2.1	NOTRE HYPOTHESE DE TRAVAIL : LA MODULATION DU SOMMEIL ET DE SA COMPOSITION EXPRIME LES CONSEQUENCES DE L'APPORT PROTEINO-ENERGETIQUE SUR LE METABOLISME	61
2.2.2	LES PREDICTIONS	62
2.2.3	LA CONSTRUCTION DES MODELES EXPERIMENTAUX DE MODIFICATION DE L'APPORT PROTEINO-ENERGETIQUE	62
2.2.3.1	<i>Un modèle de restriction-réalimentation énergétique destiné à moduler spécifiquement l'accrétion de masse grasse, donc le métabolisme glucido-lipidique</i>	63
2.2.3.2	<i>Un modèle de restriction-réalimentation protéique destiné à moduler spécifiquement l'accrétion de masse maigre, donc le métabolisme protéique</i>	63
2.2.4	LES ETUDES REALISEES	64
2.3	PREMIERE PHASE DE TRAVAIL : LA MODIFICATION DE L'APPORT PROTEINO-ENERGETIQUE PEUT INDUIRE CHEZ LE RAT DES CHANGEMENTS RELATIFS DE SOMMEIL LENT ET DE SOMMEIL PARADOXAL CORRELES A L'EVOLUTION DES COMPOSITIONS CORPORELLES EN MASSE GRASSE ET EN MASSE MAIGRE	65
2.3.1	RESUME DE L'ETUDE	65
2.3.2	CONCLUSIONS DE L'ETUDE	67
2.3.2.1	<i>Retour sur les prédictions de départ : des résultats cohérents avec notre hypothèse de travail</i>	67
2.3.2.2	<i>Des limites qui appellent à une analyse plus détaillée des changements métaboliques obtenus en début de réalimentation</i>	68
2.4	DEUXIEME PHASE DE TRAVAIL : ETUDE DES RELATIONS TEMPORELLES ENTRE METABOLISME ET SOMMEIL AU PREMIER JOUR DES PHASES DE REALIMENTATION ENERGETIQUE OU PROTEIQUE	69
2.4.1	INTRODUCTION	69
2.4.2	RESULTATS	69
2.4.2.1	<i>Modulations métaboliques au cours du premier jour de la réalimentation énergétique</i>	69
2.4.2.1.1	Modulations du métabolisme protéique	69
2.4.2.1.2	Modulations du métabolisme glucido-lipidique	70

2.4.2.2 <i>Modulations métaboliques au cours du premier jour de la réalimentation protéique</i>	71
2.4.2.2.1 Modulations du métabolisme protéique	71
2.4.2.2.2 Modulations du métabolisme glucido-lipidique	72
2.4.3 CONCLUSION : BILAN ET MISE EN PERSPECTIVE DES RESULTATS SUR LES MODULATIONS DU METABOLISME AVEC LES DONNEES OBTENUES SUR LE SOMMEIL	72
2.4.3.1 <i>Confirmation des conclusions de l'étude précédente</i>	72
2.4.3.2 <i>Mise en relation des données sur le métabolisme avec les données heure par heure obtenues sur le sommeil.</i>	73
2.4.3.2.1 Restriction-réalimentation énergétique	73
2.4.3.2.2 Restriction-réalimentation protéique	74
2.5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	75
ARTICLE 1 : RESTRICTION-REFEEDING OF CALORIES AND PROTEIN INDUCES CHANGES TO SLOW-WAVE AND PARADOXICAL SLEEP THAT PARALLEL CHANGES IN BODY LIPID AND PROTEIN LEVELS IN RATS	77
<u>TROISIEME PARTIE : APPROCHE NUTRACEUTIQUE, CAS DE L'APPORT ALIMENTAIRE D'UN HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE LA CASEINE α_{S1} A ACTIVITE DE TYPE ANXIOLYTIQUE</u>	88
3.1 INFLUENCE DE L'APPORT ALIMENTAIRE DE SUBSTANCES A ACTIVITE SPECIFIQUE SUR LA REGULATION DU SOMMEIL : ETAT DE L'ART	89
3.1.1 NUTRITION « OPTIMALE », ALIMENTS FONCTIONNELS ET NUTRACEUTIQUES	89
3.1.2 ALIMENTS ET NUTRIMENTS A ACTIVITE BIOLOGIQUE ET SOMMEIL	91
3.1.3 ETUDE DES PROPRIETES HYPNOGENIQUES DU LAIT	92
3.1.4 LES PROTEINES DU LAIT, SOURCES POTENTIELLES DE MODULATEURS DE SOMMEIL	93
3.2 LE PRODUIT DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA CASEINE α_{S1} BOVINE, A ACTIVITE ANXIOLYTIQUE : UN FACTEUR ALIMENTAIRE SUSCEPTIBLE D'INFLUENCER LA REGULATION DU SOMMEIL	95
3.2.1 UN HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE LA CASEINE α_{S1} BOVINE, LE LACTIUM, PRESENTE UNE ACTIVITE ANXIOLYTIQUE ORIGINALE	95
3.2.2 LE LACTIUM: UN POTENTIEL MODULATEUR DE LA REGULATION DU SOMMEIL PAR VOIE ALIMENTAIRE	97

3.2.3 LES ETUDES REALISEES	98
3.2.3.1 <i>Caractérisation de l'influence de l'ingestion du lactium sur le sommeil</i>	98
3.2.3.1.1 La construction du modèle expérimental	99
3.2.3.1.2 Les hypothèses en jeu	100
3.2.3.2 <i>Etude des voies d'action du lactium</i>	100
3.3 PREMIERE PHASE DE TRAVAIL : ETUDE DE L'EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION AU LACTIUM SUR LE SOMMEIL D'ANIMAUX EN CONDITIONS NORMALES OU STRESSES. EFFET DIRECT OU EFFET INDIRECT LIE A SON EFFET ANXIOLYTIQUE ?	101
3.3.1 RESUME DE L'ETUDE	101
3.3.1.1 <i>Description du modèle expérimental</i>	101
3.3.1.2 <i>Existence d'un effet de la supplémentation au lactium sur le sommeil</i>	102
3.3.1.3 <i>L'effet sommeil du lactium chez les animaux en situation de stress est il bien lié à son effet anxiolytique ?</i>	103
3.3.2 CONCLUSIONS SUR LA NATURE DE L'EFFET DU LACTIUM SUR LE SOMMEIL	105
3.3.2.1 <i>Pas d'effet sédatif ou hypnotique lié à l'ingestion du lactium dans notre modèle</i>	105
3.3.2.2 <i>Effet protecteur de l'ingestion du lactium sur les pertes de sommeil induites par le stress</i>	105
3.3.2.3 <i>Des limites et des zones d'ombre pour expliquer les mécanismes par lesquels le lactium agit sur le sommeil</i>	106
3.3.2.3.1 Lien entre effet sommeil et effet anxiolytique : des questions restent en suspens	106
3.3.2.3.2 Mode d'action du lactium : la grande inconnue	107
3.4 DEUXIEME PHASE DE TRAVAIL : ETUDE COMPLEMENTAIRE SUR LES MECANISMES D'ACTION DU LACTIUM. IMPLICATION DU NERF VAGUE DANS L'EFFET ANXIOLYTIQUE ET PROTECTEUR DU SOMMEIL ?	109
3.4.1 INTRODUCTION	109
3.4.2 PRINCIPE	109
3.4.3 DEROULEMENT DE L'ETUDE	110
3.4.3.1 <i>Animaux</i>	110
3.4.3.2 <i>Traitement à la capsaïcine</i>	110
3.4.3.3 <i>Suivi des traitements et abandon de l'étude</i>	111

3.5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	112
ARTICLE 2 : NUTRACEUTICAL PROTEINS AND PEPTIDES IN HEALTH AND DISEASE, SECTION IV: BODY'S NERVOUS SYSTEM, CHAPTER 17: OPIOID PEPTIDES	114
ARTICLE 3: A TRYPTIC HYDROLYSATE FROM BOVINE MILK ALPHA_{S1}-CASEIN IMPROVES SLEEP IN RATS SUBJECTED TO CHRONIC MILD STRESS	125
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	<u>134</u>
CONTEXTUALISATION DES RESULTATS : LES APPORTS DE NOS TRAVAUX A LA RECHERCHE SUR LES TROUBLES DU SOMMEIL	135
LES ALIMENTS FONCTIONNELS ET LES NUTRACEUTIQUES : NECESSITE D'UN ENCADREMENT SCIENTIFIQUE ET POLITIQUE	138
LOGIQUE COMMERCIALE ET NUTRITION-SANTE	138
DES EFFETS PERVERS PARFOIS PLUS TANGIBLES QUE LES EFFETS REELS...	139
UN CADRE LEGAL EN CONSTRUCTION	140
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>142</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>157</u>
ANNEXE 1 : COMPOSITION ET VALEUR ENERGETIQUE DES REGIMES ALIMENTAIRES	158
ANNEXE 2 : METHODE D'ETUDE DU SOMMEIL PAR ANALYSE DE L'EEG	159
ANNEXE 3 : EVALUATION DE L'OXYDATION DES SUBSTRATS PAR LA METHODE DE LA CALORIMETRIE INDIRECTE	161
ANNEXE 4 : INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES SUR LE LACTIUM	163
ANNEXE 5 : DISPOSITIF D'ETUDE COMPORTEMENTALE DU STRESS, LE TEST D'OPENFIELD	172
ANNEXE 6 : PROCEDURE CHIRURGICALE DE CATHETERISATION DE LA VEINE CAVE VIA LA VEINE JUGULAIRE	173
ANNEXE 7 : LISTE DES ABREVIATIONS	175

Avant-propos, quand la science rencontre la croyance populaire : qui dîne dort ou qui dort dîne ?

On croit souvent que le vieux proverbe « qui dort, dîne » signifie qu'un bon sommeil peut remplacer un bon dîner. La sagesse populaire appuierait-elle, par là, une hypothèse selon laquelle il suffit de dormir pour diminuer sa prise alimentaire ou soulager sa faim ? Voilà chose admirable qui paraîtrait fort douteuse au premier scientifique de passage, même dodu à souhait, tout comme au dernier des malheureux qui, privé de dessert, tacherait en vain de trouver le sommeil. Et pour cause... Le sens originel de cette mystérieuse locution est tout autre : l'inscription « qui dort dîne ! », qui figurait sur la porte des auberges au Moyen-âge, signifiait en réalité que pour avoir un lit, il fallait d'abord payer son dîner sur place. A une époque où il était interdit, pour des raisons religieuses, de vendre du sommeil, les aubergistes avaient recours à cette subtilité pour s'assurer que nul voyageur ne profiterait de leur hospitalité sans se délester au passage de quelque menue monnaie. Cette coutume magnifique, qui fut pour beaucoup dans la réputation de réactivité et de panache de nos forces vives à la française, devint probablement facultative lorsque la chambre devint payante, puis lorsque la marge réalisée par matelas permit de rendre facultative celle du repas... Avec l'aide du temps et de l'oubli, l'ancien avertissement à la clientèle tomba en désuétude. Son sens originel fut finalement dénaturé au point qu'il finit par passer pour une curieuse réflexion sur l'équivalence calorique d'une nuit de sommeil, sans autre forme d'avis médical.

Si nous pouvons donc assez facilement nier à ce proverbe tout fondement scientifique ou empirique, il n'en reste pas moins un témoin privilégié de l'inscription dans le langage d'un imaginaire collectif qui associe volontiers le manger et le dormir.

En vérité, l'étroite relation entre alimentation et sommeil, dont le proverbe évoque le sentiment diffus, a fait depuis longtemps l'objet d'investigations scientifiques poussées. Il apparaît ainsi de plus en plus clairement que le sommeil entretient avec la prise alimentaire et ses conséquences métaboliques des relations réciproques complexes. Même si beaucoup reste à préciser, il semble par exemple que les perturbations du sommeil, en modifiant divers

rythmes hormonaux, influent sur les conséquences métaboliques de la prise de nourriture, et qu'à l'inverse, les horaires et la nature de l'alimentation influent sur la quantité et la qualité du sommeil. Le problème est aigu pour les travailleurs à horaires décalés dont les capacités d'adaptation diminuent avec l'âge. Il ne l'est pas moins pour les jeunes enfants chez lesquels des erreurs d'alimentation peuvent provoquer des troubles du sommeil. Récemment, à la suite de récents et très médiatisés développements montrant l'effet du manque sommeil sur l'appétit et l'obésité, on a même pu voir notre bon vieil adage revenir à l'ordre du jour sous une forme plus « light » : « Qui ne dort pas assez, dîne trop ».

D'un point de vue scientifique, la question des liens entre l'alimentation et le sommeil, sans cesse en mouvement et en progrès, a donc de multiples facettes. Comprendre l'articulation exacte de ces deux grandes fonctions, ses dysfonctionnements et ses remèdes est bien entendu un immense défi. Lors de notre travail de thèse, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à l'influence de l'alimentation sur la régulation du sommeil, et nous en avons exploré deux approches différentes et complémentaires. Nous présenterons en détail quelles sont ces approches et les résultats que nous avons obtenus dans les parties 2 et 3 de ce manuscrit. Mais dans un premier temps, pour bien replacer nos travaux dans leur cadre global, nous allons rappeler dans une première partie (Introduction Générale) quelques grandes notions sur ce qui en est le dénominateur commun : le sommeil, sa régulation et ses fonctions.

Première Partie : Introduction Générale

Le sommeil, un état de la vigilance à part, une grande fonction physiologique encore inconnue

Les deux grandes questions indissociables, « qu'est-ce que le sommeil ? » et « pourquoi dormons nous ? », ont probablement toujours excité la pensée et l'imaginaire de l'homme. Dans la mythologie grecque, le dieu Hypnos prodigue le sommeil aux mortels et aux dieux en les touchant de la branche de pavot qu'il tient ou en les éventant de ses ailes. Son fils Morphée, dieu des songes, apporte alors le rêve aux endormis. Ainsi considéré comme un don des dieux, le sommeil a longtemps été associé à d'importantes fonctions thérapeutiques ou spirituelles. De nos jours, il est toutefois nettement plus probable d'entendre résoudre ces questions par l'évidence : « un sommeil adéquat est nécessaire pour rester éveillé et attentif ». A l'instar de Francis Blanche, d'autres ont plus de mal à trouver des réponses : « Je ne peux rien dire sur mon sommeil : chaque fois que je m'appête à l'observer, je m'endors. ». Mais les scientifiques qui, depuis près d'un siècle, se sont attachés à fournir des explications plus poussées sur les mécanismes du sommeil, de sa régulation, et sur son rôle dans l'organisme ont fait d'importantes avancées dans la compréhension de ces phénomènes.

1.1 Qu'est-ce que le sommeil ?

Le sommeil n'est plus un lieu sûr

Jean Cocteau

1.1.1 Généralités : le sommeil, un état particulier de la vigilance

Nous trouvons dans Le petit Robert la définition suivante : « le sommeil est l'état d'une personne qui dort, état physiologique normal et périodique caractérisé essentiellement par la suspension de la vigilance, la résolution musculaire, le ralentissement de la circulation et de la respiration, et par l'activité onirique. ». Sans qu'aucune des assertions énoncées ne soient

fausses, cette définition ne permet de rendre compte ni de la complexité du sommeil, ni des mécanismes qui le produisent.

1.1.1.1 Définition comportementale du sommeil

Sur un plan comportemental, le sommeil est un état spontané d'inconscience de l'individu défini par quatre critères : 1) diminution de l'activité motrice, 2) augmentation des seuils de réponse sensorielle, 3) adoption par l'individu de postures stéréotypées (par exemple, les humains s'allongent et ferment les yeux), et 4) une relativement facile réversibilité. Ce dernier critère permet de distinguer le sommeil du coma et d'autres états d'inconscience comme l'hibernation ou l'estivation (113).

On peut ajouter à tout cela que cette baisse de la perceptivité du milieu extérieur, avec diminution progressive du tonus musculaire, est périodique : tout comme la prise alimentaire et d'autres variables physiologiques, elle est étroitement liée au rythme circadien.

C'est pourquoi le sommeil est considéré comme un état particulier de la conscience et de son corollaire comportemental, la vigilance.

Un observateur peut d'ordinaire aisément reconnaître si un sujet dort à son comportement. Il a donc été possible d'étudier le sommeil selon des critères tels que la rythmicité des périodes de sommeil (ou nyctémères) et sa profondeur (intensité du stimulus nécessaire pour réveiller le sujet), chez les hommes mais aussi chez d'autres espèces animales. Cependant, au delà de certaines considérations écologiques, ces études apportent peu à la compréhension des phénomènes physiologiques à l'origine du sommeil et de ses manifestations externes. Les critères comportementaux du sommeil varient en outre énormément d'un individu à l'autre et entre les espèces, notamment en ce qui concerne les sites et les postures (fonction du statut dans la chaîne alimentaire, du milieu de vie, etc...) : les dauphins et autres mammifères marins nagent en dormant et certains oiseaux peuvent dormir en plein vol au cours de longues migrations (131). Difficile donc d'y reconnaître la nature profonde, essentielle, du phénomène biologique qu'est le sommeil...

Les scientifiques ont ainsi développé d'autres outils pour entrer dans la compréhension intime des mécanismes à l'origine du sommeil, sa composition et sa régulation. Tout d'abord, l'utilisation de l'enregistrement de l'activité électrique à la surface du crâne a permis

d'identifier que le sommeil était constitué de différents stades. Puis les progrès de la neurochirurgie, neurochimie, génétique, ont permis de découvrir différents réseaux de neurones responsables de l'alternance veille sommeil et leur fonctionnement.

1.1.1.2 L'étude du sommeil par les enregistrements EEG (61)

En utilisant des électrodes métalliques pour mesurer l'activité électrique globale à la surface du cerveau, on a pu enregistrer différents types d'ondes rythmiques et sinusoïdales. Ces enregistrements sont appelés électroencéphalogrammes (EEG). Le signal EEG est obtenu par dérivation : on enregistre la différence de potentiel (en Volts) entre deux électrodes dont l'une au moins doit être placée au-dessus d'une aire cérébrale (électrode corticale). Le terme de dérivation est également utilisé pour désigner l'emplacement précis des électrodes.

Descriptif des différents types de fréquences des ondes EEG :

- Delta, fréquence <4Hz, ces ondes sont associées au sommeil profond.
- Theta, fréquence de 4Hz à 8Hz, ces ondes sont associés à l'hypnose, aux transes, on les voit aussi apparaître pendant le sommeil léger, à l'endormissement, mais elles traduisent également l'activité de l'hippocampe pendant le sommeil paradoxal chez l'animal, comme on le verra plus loin.
- Alpha, fréquence de 8Hz à 13Hz, caractéristiques du stade de l'éveil, lorsque les yeux sont fermés, le sujet calme ou au repos.
- Beta, fréquence 14Hz à 40Hz, de faible amplitude, caractéristiques du stade de l'éveil actif, les yeux ouverts, ces ondes sont associées avec des pensées actives, occupées ou anxieuses.

Lorsqu'ils sont éveillés, les humains, comme beaucoup d'autres vertébrés, ont une activité EEG rapide (16-25Hz) et de faible amplitude (10-30 μ V). Lorsqu'ils sont détendus, les yeux fermés, on enregistre alors une activité sinusoïdale alpha d'environ 10Hz, et d'amplitude légèrement plus importante (50 μ V). Le passage de la veille au sommeil se traduit par une activité EEG de plus en plus lente et de plus en plus forte amplitude (149).

En effet, dans la population de neurones corticaux situés sous l'électrode, chaque neurone reçoit de nombreuses afférences synaptiques. Si ces afférences déchargent à intervalles irréguliers (comme c'est généralement le cas pendant l'éveil), les réponses des neurones ne sont pas synchronisées et la sommation des activités unitaires détectée par l'électrode est de faible amplitude. En revanche, si les afférences déchargent en même temps (comme c'est généralement le cas pendant le sommeil), les réponses des neurones corticaux sont synchronisées et la sommation résultante sera de grande amplitude. Ainsi, l'EEG permet de distinguer selon l'allure du signal différents rythmes d'activité corticale correspondant à différents états d'activation du cerveau.

Le profil EEG caractéristique du sommeil a pu être obtenu grâce à ces enregistrements électriques, souvent combinés à l'enregistrement de l'activité musculaire sur des électromyogrammes (EMG) et des mouvements oculaires sur des électrooculogrammes (EOG), mais aussi à des observations comportementales. Cette méthode a permis de discriminer le sommeil de l'éveil mais également de distinguer, comme nous le verrons par la suite, différents stades au sein même du sommeil, suivant la composition du signal. Elle est encore aujourd'hui la plus utilisée pour mesurer le sommeil.

1.1.1.3 Le sommeil dans le monde animal

L'existence d'un rythme journalier de repos et d'inactivité est une caractéristique essentielle des êtres vivants. L'existence d'états proches du sommeil a pu être très largement démontrée dans le monde animal, aussi bien chez les insectes, les poissons et les amphibiens selon des critères comportementaux et physiologiques, que chez les reptiles selon des critères d'activité EEG.

Cependant, seuls les vertébrés supérieurs comme les mammifères et les oiseaux remplissent les critères basés sur les enregistrements EEG permettant d'identifier chez eux l'existence du sommeil tel qu'on l'observe chez l'homme et tel que nous le considérerons dans la suite du manuscrit : un état complexe et fortement organisé fait de l'alternance de différentes phases (71).

Chez les mammifères, les durées de sommeil sont très variables non seulement d'une espèce à l'autre, mais aussi à l'intérieur d'une espèce donnée, entre les individus, en fonction de l'âge

(suivant la maturation ou la dégradation des processus neuronaux impliqués), de l'environnement et de facteurs génétiques. On a pu cependant constater que la durée de sommeil totale moyenne était corrélée à la taille et au taux métabolique de l'espèce (131). Les petits mammifères, qui ont de grands besoins énergétiques pour la locomotion et la thermorégulation mais peu de réserves semblent ainsi avoir le plus grand besoin de sommeil.

A l'instar de la quiescence chez les végétaux, le sommeil est donc très largement répandu dans le monde animal. Alors qu'il pourrait paraître gênant face à la pression sélective, ce phénomène est probablement apparu précocement et il a persisté au cours de l'évolution. Des adaptations lui permettent même d'être maintenu dans des environnements et modes de vie présentant des contraintes très diverses.

1.1.2 Le sommeil, un phénomène hétérogène fait de l'alternance de deux stades : sommeil lent et sommeil paradoxal (5, 113, 149)

1.1.2.1 Le sommeil lent

Le profil EEG de l'éveil est essentiellement composé d'ondes rapides de type alpha ou bêta. A l'endormissement on voit apparaître des bouffées d'activité de forte amplitude (les « fuseaux ») suivies d'ondes lentes de faible amplitude. Le sommeil qui arrive alors est marqué par une prédominance des ondes lentes delta (0.5-2Hz) de forte amplitude (jusqu'à 300 μ V). On l'appelle sommeil lent. Chez l'homme, on a l'habitude de distinguer quatre stades de sommeil lent, de l'endormissement au stade de sommeil dominé par les ondes delta (plus profond). Les stades 1 et 2 constituent le sommeil lent léger, les stades 3 et 4 le sommeil lent profond. Chez les animaux on ne considère qu'un seul stade de sommeil lent, ou Sommeil à Ondes Lentes (SOL) plus simplement caractérisé par la présence des ondes delta.

Pendant le sommeil lent, l'activité neuronale est diminuée. La plupart des neurones du tronc cérébral, juste en avant de la moelle épinière, réduisent ou arrêtent complètement leurs décharges, mais ceux du cortex et du diencephale ne la diminuent que très peu. Par contre, ces neurones s'activent de manière synchrone, à une basse fréquence, ce qui explique la formation des ondes delta de forte amplitude. Tout cela implique une baisse de la dépense énergétique centrale qui se reflète dans la baisse de la consommation d'oxygène et de la température au

niveau du cerveau. Cela s'accompagne d'une diminution de l'activation sympathique entraînant une baisse du rythme cardiaque et de la pression sanguine. Le tonus musculaire est diminué.

L'homme s'endort en entrant dans le sommeil lent, ce qui fait qu'on a longtemps cru que le sommeil était homogène.

1.1.2.2 La découverte du sommeil paradoxal

Le physiologiste américain Kleitman et ses deux étudiants Aserinsky et Dement découvrirent dans les années 50 que des épisodes d'activité corticale rapide, associés à des mouvements oculaires, ont également lieu pendant le sommeil comportemental. Ils l'appelèrent REM (pour Rapid Eye Movement) sleep (2). Lorsque les sujets humains étaient réveillés pendant le « REM sleep », ils pouvaient rapporter des rêves beaucoup plus précis et « vivants » que pendant le reste du sommeil. Peu de temps après, Jouvet confirma chez le chat l'existence de ce stade de sommeil particulier et montra qu'il était généré par des mécanismes différents de ceux du sommeil ordinaire. Il l'appela sommeil paradoxal, car il semblait combiner des caractéristiques du sommeil, telles qu'une absence de tonus musculaire, et des caractéristiques de l'éveil, tels qu'un électroencéphalogramme rapide, des mouvements oculaires et une respiration irrégulière.

1.1.2.3 Le sommeil paradoxal, une forme active de sommeil

Le sommeil paradoxal est caractérisé par une activité EEG rapide et de faible amplitude. En effet, pendant ce stade de sommeil, le profil d'activité de la plupart des neurones ressemble à celui de l'éveil actif, alors que certains neurones situés dans le pont, le corps genouillé latéral du thalamus et le cortex occipital ont même des poussées d'activité encore plus intenses (activité Ponto-geniculate-occipital ou PGO). On observe également des mouvements oculaires et une irrégularité respiratoire. L'enregistrement de l'activité corticale au-dessus de l'hippocampe montre quant à lui un profil EEG riche en ondes thêta distinct de celui de l'éveil (16, 115). En parallèle, la température et la consommation d'oxygène du cerveau augmentent, atteignant ou même dépassant celles de l'éveil. Cependant, il s'agit bien d'un stade d'inconscience très profonde, où l'on observe même une atonie des muscles squelettiques.

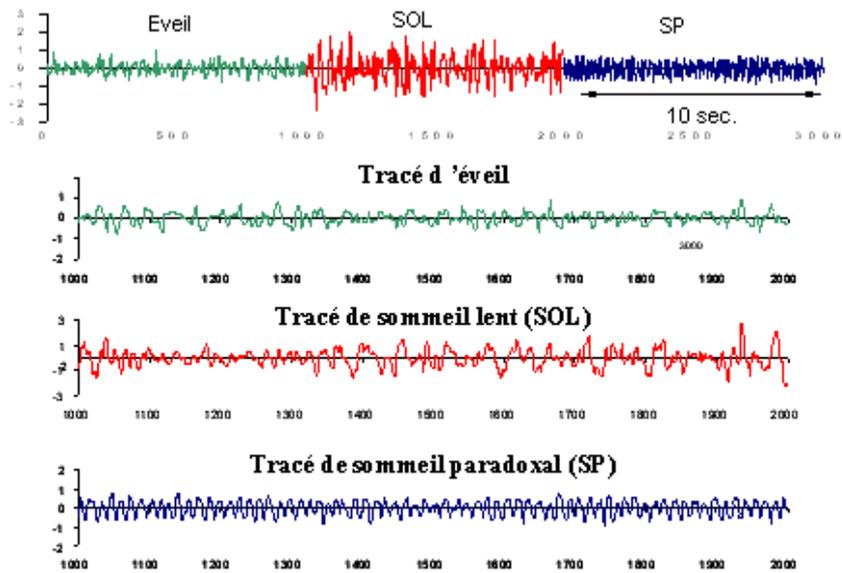


Figure 1 : graphique comparatif des différents profils EEG chez le rat

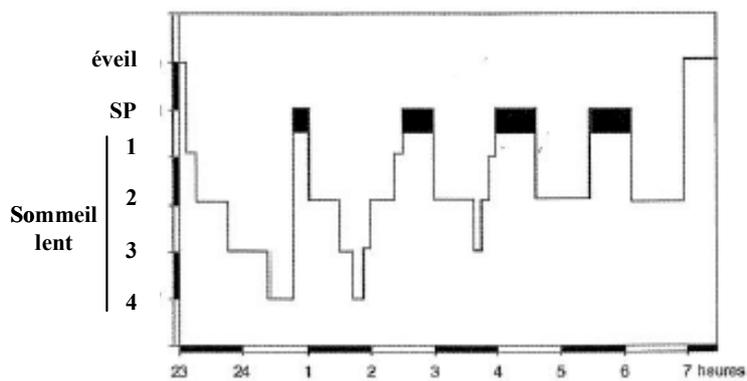


Figure 2 : Représentation schématique de l'enchaînement des différents stades de la vigilance au cours de la nuit (hypnogramme) pour une durée moyenne de sommeil chez le jeune adulte

Outre la signalisation d'une forte activité onirique, une autre grande caractéristique du sommeil paradoxal est l'érection pénienne chez les mâles et le grossissement du clitoris chez les femelles, qui semble totalement déconnecté d'un éventuel contenu érotique du rêve et qu'on observe aussi bien chez l'enfant que chez le vieillard.

1.1.2.4 Discrimination des différents stades de sommeil par EEG

Nous savons ainsi que le sommeil ne peut être considéré comme un continuum du sommeil léger au sommeil profond. Il n'est pas homogène mais se déroule par cycles constitués de deux phases complexes et différentes, dotées de profils d'activité EEG et de mécanismes physiologiques propres: le sommeil calme à ondes lentes ou sommeil lent (SOL), et le sommeil paradoxal (SP). Cette organisation est partagée par tous les vertébrés supérieurs (mammifères et les oiseaux) (71), ce qui permet son étude chez l'animal et notamment chez le rat. Nous avons porté sur la figure 1 un exemple du type de signal EEG qu'on peut obtenir pour l'éveil, le SOL et le SP chez le rat, par l'enregistrement de l'activité EEG avec placement d'une électrode corticale au dessus de l'hippocampe.

1.1.2.5 Une organisation complexe en cycles

Des phases de sommeil lent et de sommeil paradoxal alternent de manière cyclique pendant le sommeil. Chez l'homme, les différents stades de la vigilance forment ainsi un profil très structuré au cours de la nuit. L'étude de leur distribution permet de tracer des hypnogrammes, c'est-à-dire des représentations schématiques de l'alternance et du déroulement des stades de sommeil au cours du temps, tels que celui présenté sur la figure 2.

Sur l'hypnogramme, on peut identifier des cycles de sommeil (où les cinq stades se succèdent). Ils sont au nombre de 4 à 6 pour un dormeur moyen et d'une durée de 90 à 100 minutes chacun. A chaque fois, le cycle commence par une phase de sommeil lent et se termine par une phase de sommeil paradoxal. La composition des cycles varie entre le début et la fin de la nuit : la durée du sommeil lent profond (comme on a coutume d'appeler les stades 3 et 4 du sommeil lent) décroît à mesure que la durée du sommeil paradoxal augmente. Chez l'homme, le jeune adulte semble avoir en moyenne besoin d'une durée de 8 heures de sommeil par nuit pour fonctionner de manière optimale pendant les heures d'éveil. On

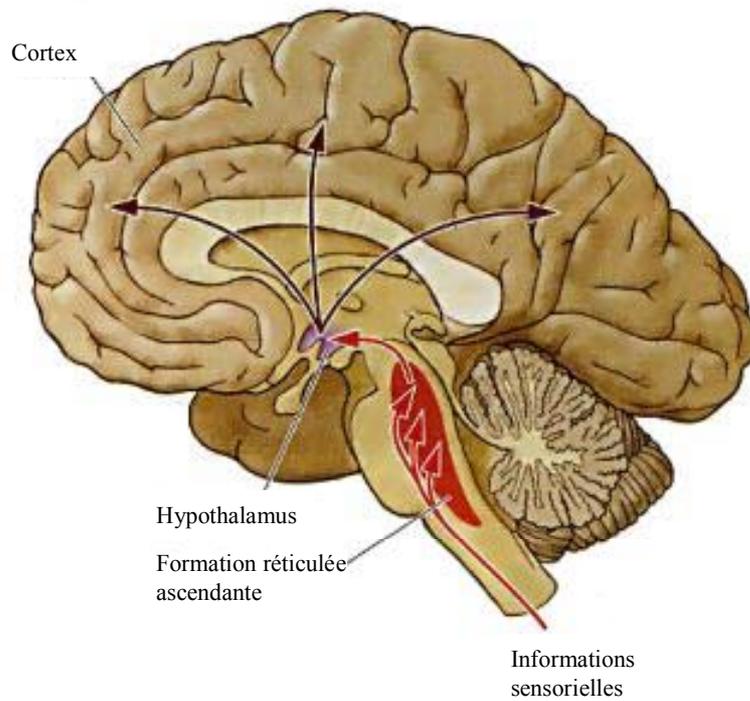


Figure 3 : La Formation réticulée ascendante (59)

En 1949 Horace Magoun et Guiseppe Moruzzi provoquent l'éveil chez le chat endormi en stimulant la formation réticulée; ils découvrent le système d'activation réticulé (102).

observe cependant dans la population une grande variabilité de la durée physiologique du sommeil (de 3 à 12 heures), mais on retrouve toujours la présence de ces cycles en plus ou moins grand nombre.

1.1.3 Le sommeil, un processus actif...

Depuis toujours, le sommeil était considéré comme résultant de la baisse de l'activité cérébrale naturellement induite par la fatigue. Les scientifiques travaillant sur le sommeil pensaient que l'état d'éveil était maintenu par une active stimulation sensorielle et que le cerveau « s'endormait » lorsque avec la fatigue, cette stimulation diminuait.

Au cours de l'épidémie d'encéphalite qui envahit l'Autriche en 1918 (la grippe espagnole), certains malades restaient dans un état de léthargie ou de coma, tandis que d'autres ne dormaient pas pendant plusieurs jours avant de mourir. L'examen de leur cerveau permit à un neurologue viennois, d'origine grecque, Constantin von Economo, de décrire des lésions à des endroits différents selon l'allure clinique de la maladie (154). Les malades qui restaient comateux présentaient une lésion de l'hypothalamus postérieur ou de la partie haute du mésencéphale, tandis que le cerveau des malades insomniaques présentaient des lésions au niveau de l'hypothalamus antérieur (région préoptique). L'attention fut donc attirée pour la première fois sur le rôle du tronc cérébral et de l'hypothalamus dans le contrôle de la veille et du sommeil.

A la fin des années 40 et au début des années 50, la découverte d'un "système d'éveil" au niveau de la formation réticulée mésencéphalique (102) confirma que l'éveil n'était pas maintenu seulement par la stimulation sensorielle, mais par une activité tonique des projections de la formation réticulée dite « ascendante » vers le cerveau (Figure 3). La théorie réticulaire triomphante élimina au début toute théorie active du sommeil. Le sommeil n'était considéré que comme une baisse de la vigilance obtenue par défaut lorsque l'activité de la formation réticulée était diminuée.

Cependant les expériences de stimulation déclenchant l'apparition d'ondes lentes et les expériences de lésion déclenchant l'insomnie devaient faire douter de l'hypothèse d'un sommeil passif en apportant des arguments en faveur d'un phénomène actif résultant de la mise en œuvre de structures nerveuses. Notamment, la découverte de l'induction d'insomnie

par la section du tronc cérébral au niveau du pont suggérait que la partie rostrale de la formation réticulée contenait bien des neurones responsables du maintien de l'éveil, mais que ceux-ci pouvaient être inhibés par des neurones de la partie caudale. De plus, la découverte du sommeil paradoxal et la reconnaissance du sommeil comme un état cérébral fortement organisé obligeait à admettre qu'il existait des processus actifs responsables du sommeil.

La découverte des neurotransmetteurs du système nerveux central conjuguée à l'amélioration des techniques d'exploration du cerveau et à la miniaturisation des dispositifs d'enregistrement de l'activité des neurones a aidé les neurobiologistes à élucider le fonctionnement des réseaux neuronaux du sommeil et de l'éveil. La multiplicité des centres nerveux impliqués a conduit à la notion de systèmes ou de réseaux pour définir un circuit complexe prenant en charge une fonction. On sait maintenant que l'éveil, indispensable à la survie, est garanti par tout un réseau de structures redondantes. L'évolution récente des connaissances tend enfin à indiquer que l'entrée en sommeil et son maintien est un phénomène actif contrôlé par des centres distincts de ceux de l'éveil et sous la dépendance de neuromédiateurs centraux différents.

1.1.4 ...Résultant de mécanismes centraux complexes, en relation avec l'éveil (59, 113, 117, 147, 148)

Les circuits neuronaux activés pendant l'éveil, et ceux qui prennent le relais pour l'endormissement et le sommeil ont été en grande partie découverts. Cependant, notre but ici n'est pas de présenter en détail les structures et les neurotransmetteurs, ni de prétendre à l'exhaustivité. Nous tâcherons plutôt de présenter les grands principes de fonctionnement des réseaux impliqués.

1.1.4.1 Le sommeil suit un rythme circadien

Comme beaucoup d'activités comportementales, telles que l'alimentation, et comme de nombreux mécanismes de régulation homéostatiques telles que la régulation de la température interne ou la sécrétion de corticostéroïdes, le sommeil et l'éveil ont une périodicité d'environ 24 heures. Ces rythmes circadiens sont endogènes : ils subsistent en l'absence d'indices environnementaux. Chez les mammifères, l'horloge interne principale est localisée dans les noyaux suprachiasmatiques, situés dans l'hypothalamus antérieur. L'horloge

suprachiasmatique joue un rôle primordial dans l'organisation temporelle globale de l'organisme, et agit également sur la synchronisation d'oscillateurs périphériques comme ceux présents dans le foie. C'est ainsi un des principaux coordinateurs du rythme veille-sommeil. Sa lésion abolit le rythme circadien des états de veille et de sommeil et conduit à l'homogénéisation de la distribution circadienne du sommeil, même si la durée totale de sommeil est préservée.

Chez l'homme comme chez de nombreuses espèces, les phases du rythme s'adaptent aussi à l'environnement, en réponse à des synchroniseurs externes appelés *zeitgebers* (pour indicateurs de temps). La lumière du soleil est ainsi un puissant *zeitgeber* qui peut être associée aux phases les plus actives ou inactives des rythmes circadiens. C'est pourquoi les hommes dorment la nuit, alors que les animaux nocturnes tels que les rats ou les souris dorment essentiellement le jour.

L'entraînement des rythmes par la lumière est relayé par les afférences rétinohypothalamiques vers le noyau suprachiasmatique, qui influe alors lui-même sur la régulation temporelle du cycle veille sommeil. L'action du noyau suprachiasmatique s'effectue entre autre par la libération de certains peptides dans le liquide céphalo-rachidien, comme l'arginine-vasopressine pendant le jour (et donc l'éveil) et du « vasoactive intestinal peptide » (VIP) pendant la nuit. Le fait que la modulation du rythme circadien par les afférences rétinohypothalamiques puisse mettre quelques jours à se réaliser complètement explique l'effet de décalage (ou jet-lag) entre le besoin de sommeil et l'heure de la journée, subi, par exemple par les voyageurs, en cas de désynchronisation brutale entre l'horloge interne et le cycle lumineux.

1.1.4.2 Le système de l'éveil

Un réseau assez complexe d'une dizaine de structures situées en cascade depuis le tronc cérébral inférieur jusqu'au télencéphale basal et au cortex prend en charge l'éveil. Ce réseau exécutif est contrôlé par un système activé notamment par un des éléments de l'éveil.

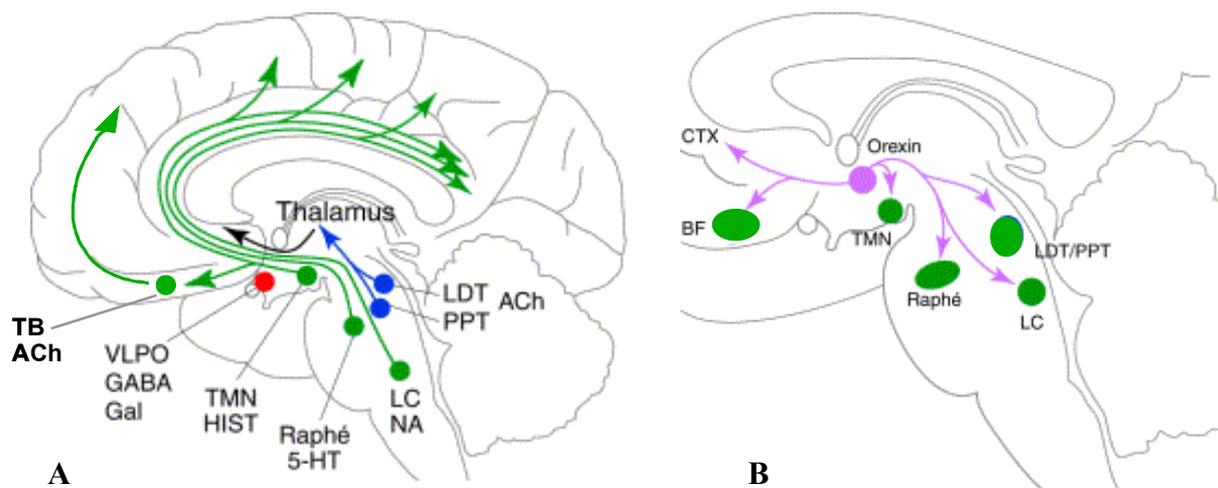


Figure 4 : Les principales voies et structures du réseau de l'éveil (117)

- (A) Le système d'éveil ascendant envoie des projections à partir du tronc cérébral et de l'hypothalamus postérieur à travers tout le cerveau antérieur. Ce système comprend deux voies. La première passe par le thalamus (voie dorsale, en bleu). Elle a pour origine les neurones des noyaux latéro-dorsal et pédiculopontin du tegmentum (LDT, PPT) qui envoient des fibres cholinergiques à de nombreuses cibles du cerveau antérieur et au thalamus, et régule ainsi l'activité corticale. La deuxième voie est extra-thalamique (voie ventrale, en vert). Elle a pour origine les neurones des noyaux aminergiques (neurones du noyau tuberomamillaire (TMN) à histamine (HIST), neurones du raphé à sérotonine (5HT), neurones du locus coeruleus (LC) à noradrénaline (NA)) et projette de manière diffuse à travers le cerveau antérieur en régulant l'activité corticale et hypothalamique. Une des voies importantes du système activateur est représentée par les neurones cholinergiques du télencéphale basal (TB) qui activent directement les neurones corticaux. Les neurones responsables du sommeil du noyau préoptique ventrolatéral (VLPO) contiennent du GABA et galanine.
- (B) Les neurones à orexine de l'hypothalamus latéral innervent toutes les composantes du système d'éveil ainsi que le cortex cérébral (CTX) et participent au maintien de l'éveil.

Réseau exécutif

En premier lieu, le réseau exécutif de l'éveil est constitué du système d'éveil ascendant, qu'on sépare classiquement en deux voies : une voie ventrale et une voie dorsale. Au niveau bulbaire, une partie du noyau magnocellulaire est à l'origine des deux voies. En se projetant sur l'hypothalamus postérieur et le télencéphale basal, il forme la voie réticulo-hypothalamo-corticale (voie ventrale). Il projette également sur les noyaux mésopontins cholinergiques et la formation réticulée mésencéphalique qui, à leur tour, stimulent le système diffus thalamique et forment la voie réticulo-thalamo-corticale (voie dorsale). Ces deux voies sont représentées sur la figure 4A.

Ces systèmes qui projettent dans de nombreuses aires du cerveau dont le cortex entretiennent l'état d'éveil par l'intermédiaire de l'activité excitatrice de nombreux neurotransmetteurs. L'acétylcholine et le glutamate y jouent un rôle très important. L'hypothalamus postérieur contient le seul groupe de neurones synthétisant l'histamine. Ils sont actifs pendant l'éveil et s'arrêtent pendant le sommeil. La pharmacologie de l'histamine soutient son rôle important dans l'activation corticale et permet d'expliquer la somnolence induite par les antihistaminiques. A côté de l'histamine, les autres systèmes aminergiques font partie intégrante de l'éveil. Le locus cœruleus contient des neurones noradrénergiques, actifs au cours de l'éveil, envoyant des projections directes vers le cortex. Enfin le raphé antérieur contient des neurones à sérotonine, actifs pendant l'éveil, se projetant directement vers l'hypothalamus et le cortex. L'ensemble de ces structures du tronc cérébral reçoit des collatérales des afférences sensorielles et végétatives qui participent au maintien de leur activité.

Signalons également le rôle "modulateur" de nombreux systèmes peptidergiques et notamment le rôle important joué par les neurones à orexines de l'hypothalamus latéral, récemment découverts (116). Une implication des orexines dans la narcolepsie humaine (trouble du sommeil se traduisant par des passages incontrôlés de la veille au sommeil paradoxal et une forte somnolence) a été mise en évidence par des études montrant des taux réduits dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints par cette maladie (104). Chez le rat, la lésion spécifique grâce à une neurotoxine (50) ou bien par ablation génétique de neurones à orexines de l'hypothalamus latéral a conduit à la narcolepsie. Ainsi, les orexines peuvent faciliter l'intensité et la stabilité de l'éveil (figure 4B).

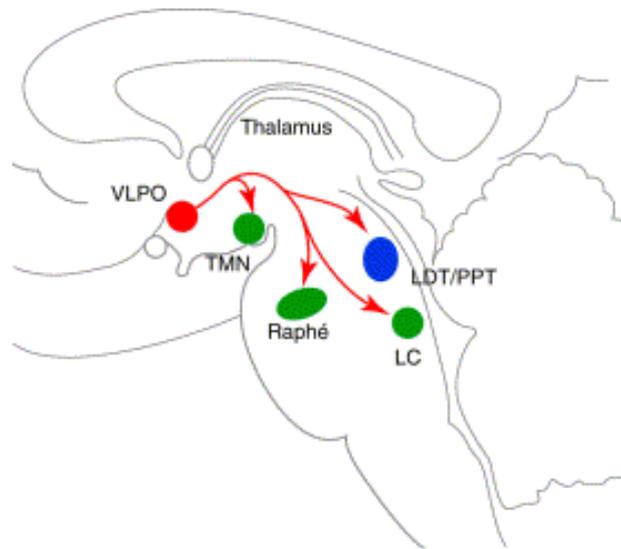


Figure 5 : Le système anti-éveil (117)

Les neurones du VLPO innervent la plupart des structures du système d'éveil (voir Figure 3). En s'activant, ils inhibent ce dernier et favorisent ainsi l'apparition et le maintien du sommeil.

On peut inclure dans le réseau exécutif de l'éveil le noyau suprachiasmatique. En effet, la répartition des états de vigilance entre le jour et la nuit est influencée principalement par les longues phases d'éveil. La lésion du noyau suprachiasmatique abolit le rythme circadien des états de vigilance par la diminution des phases d'éveil et par leur répartition aléatoire dans le nycthémère.

En résumé, la régulation de l'éveil est un phénomène complexe mettant en jeu des structures multiples et redondantes. Aucune des structures décrites, prise isolément, n'est indispensable à l'activation corticale. Le réseau d'éveil, une fois activé, est entretenu par des stimulations internes et externes.

1.1.4.3 Un système anti-éveil responsable de l'endormissement et du sommeil

A l'inverse, le centre nerveux responsable de l'inhibition des structures de l'éveil est un noyau de neurones situés dans l'aire préoptique de l'hypothalamus qu'on appelle VLPO (pour Ventrolateral Preoptic area). Les neurones du VLPO contiennent en effet les neurotransmetteurs inhibiteurs GABA et galanine (principaux neurotransmetteurs inhibiteurs du système nerveux central), et ont des projections sur tous les principaux centres de l'hypothalamus et du tronc cérébral qui participent à l'éveil, permettant ainsi de coordonner l'apparition du sommeil (Figure 5). De plus, on a pu identifier deux parties distinctes du VLPO susceptibles d'être impliquées dans l'apparition du SOL pour l'une, dans l'apparition du SP pour l'autre (87, 118).

Ces neurones de l'aire préoptique reçoivent également des projections à effet inhibiteur venant des différentes composantes du système d'éveil. Ils forment ainsi ensemble un vaste circuit d'inhibitions réciproques dont le résultat est l'alternance veille-sommeil. Ce système est la clé de voûte de la régulation des cycles d'éveil et de sommeil. C'est sur lui que s'exerce tout un ensemble de régulations homéostatiques, en plus de la régulation circadienne, et dont nous parlerons plus tard.

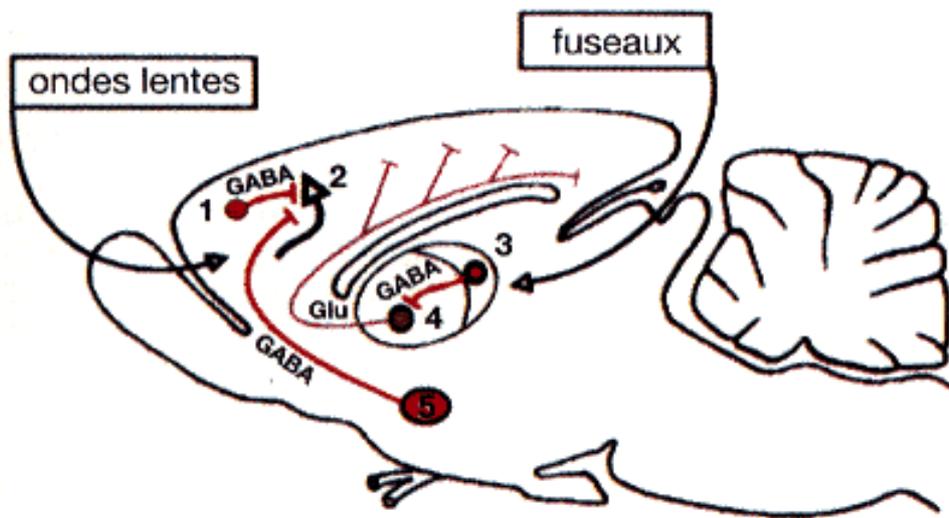


Figure 6 : Réseau exécutif du sommeil lent (147)

Les ondes lentes sont la résultante d'une inhibition GABAergique venant des interneurones corticaux (1) ou du noyau de Meynert (5) et s'exerçant sur les cellules pyramidales (2). Les fuseaux prennent leur origine dans le thalamus, noyau réticulaire (3) et neurones thalamo-corticaux (4).

1.1.4.4 Mécanismes à l'origine du sommeil lent

Le sommeil lent est entraîné par un système exécutif inhibé lors de l'éveil qui entre en action dès que les influences inhibitrices de l'éveil sont levées.

1.1.4.4.1 Système exécutif

L'activité électrique de type fuseau qu'on observe sur l'EEG au moment de l'endormissement prend son origine dans le thalamus et plus particulièrement dans les noyaux réticulaires thalamiques. En effet, ces noyaux sont composés de neurones GABAergiques particuliers qui, lorsqu'ils sont hyperpolarisés, agissent comme un pacemaker (les neurones réticulaires thalamiques, isolés de toute afférence, continuent à osciller rythmiquement) et entraînent des hyperpolarisations cycliques suivies de bouffées de potentiels d'action dans les neurones thalamocorticaux. Les hyperpolarisations sont à l'origine du blocage des informations sensorielles au début de l'endormissement, alors que les bouffées de potentiels d'action induisent une activation synchrone des neurones corticaux à la fréquence des fuseaux (7-14 Hz) (figure 6).

Les ondes lentes de grande amplitude qu'on observe pendant le SOL sont le résultat de la sommation des hyperpolarisations des cellules pyramidales de la couche V du néocortex, induites par des projections GABA venant des interneurons corticaux ou du télencéphale basal (noyau de Meynert). Ces hyperpolarisations de longue durée sont dues à un courant potassique sortant calcium dépendant (Figure 6).

1.1.4.4.2 Système permissif

C'est le système de l'éveil lui-même qui, par le biais de l'acétylcholine, de l'histamine et de la noradrénaline exerce les principales inhibitions sur le système exécutif du SOL. Ces neurotransmetteurs entraînent par exemple la dépolarisation des neurones de la formation réticulée et empêchent ainsi leur hyperpolarisation, donc l'apparition des fuseaux. Il suffit de bloquer ces inhibitions pour obtenir l'apparition des fuseaux et des ondes lentes corticales. Le sommeil lent peut ainsi être considéré comme le résultat de l'inhibition du réseau de l'éveil par le VLPO.

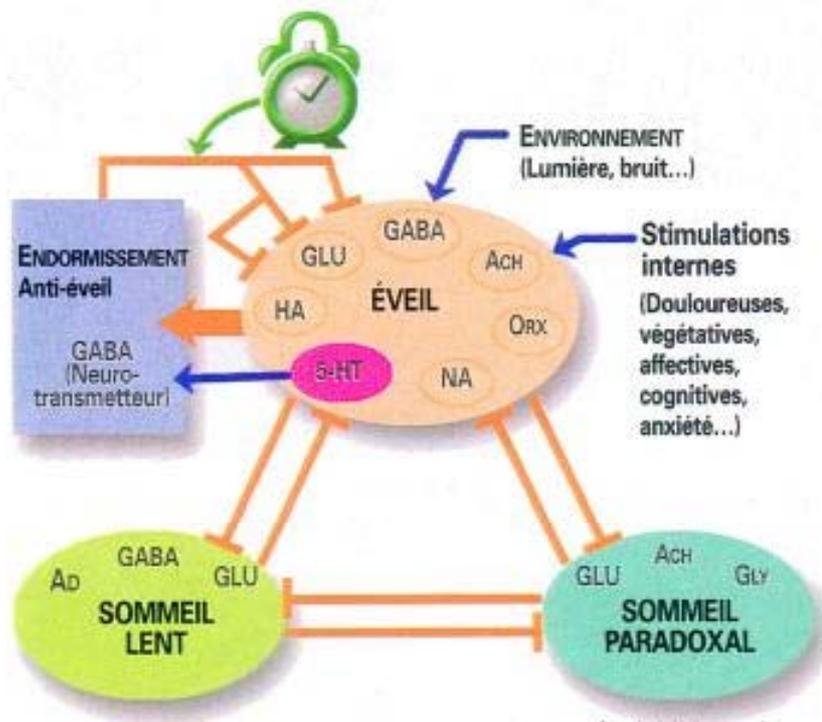


Figure 7 : Schéma de la régulation du cycle veille-sommeil (59)

1.1.4.5 Mécanismes à l'origine du sommeil paradoxal

Très schématiquement, le sommeil paradoxal peut également être envisagé comme résultant de l'interaction de deux réseaux : le réseau exécutif, responsable des aspects phénoménologiques, et le réseau de contrôle dit permissif.

1.1.4.5.1 Le réseau exécutif

Pour chacune des caractéristiques du sommeil paradoxal (SP) comme l'activité PGO, l'atonie musculaire ou la désynchronisation de l'activité corticale, des circuits de neurones qui trouvent leur origine dans le tronc cérébral (et notamment la formation réticulée pontique et le locus cœruleus alpha) ont été identifiés.

1.1.4.5.2 Le contrôle permissif

Le contrôle permissif est effectué par neurones des neurones aminergiques (noradrénaline, sérotonine et histamine) des noyaux du raphé et du locus cœruleus, dans la zone du pont, neurones dits "SP-off". En s'arrêtant de fonctionner, ils lèvent l'inhibition qu'ils exercent sur les neurones du système exécutif et permettent le passage en sommeil paradoxal. La cessation de l'activité des neurones SP-off est due à l'inhibition GABAergique qu'exercent sur eux certaines populations de neurones dits SP-on. Elle est dépendante de la préexistence d'une inhibition de l'éveil donc du SOL. Certains neurones du VLPO semblent également être impliqués de manière plus spécifique dans l'induction du SP (118). Cependant, les mécanismes de régulation qui expliquent le passage du SOL au SP restent encore obscurs.

1.1.4.6 Esquisse d'un modèle de régulation du cycle veille-sommeil

L'état actuel des connaissances permet ainsi d'élaborer un schéma de fonctionnement très simplifié de la régulation du cycle veille sommeil (figure 7).

Le sommeil calme à ondes lentes et le sommeil paradoxal sont, chacun, le produit du fonctionnement de deux réseaux de neurones: un réseau permissif contrôlant le

déclenchement du sommeil, et un réseau exécutif, assimilable à un pacemaker, responsable des signes du sommeil. Les systèmes permissifs font partie du réseau de l'éveil. L'endormissement est la conséquence du blocage de l'éveil par un système anti-éveil situé dans l'aire préoptique, clé de voûte de la régulation du cycle veille sommeil.

Le système anti-éveil de l'aire préoptique est situé à un carrefour stratégique. Il est en effet soumis à l'influence d'autres aires ou noyaux de l'hypothalamus qui contrôlent des fonctions vitales telles que la thermorégulation, la prise alimentaire, la reproduction, et qui, comme l'hypothalamus dorso-médian, peuvent en outre recevoir des informations directes ou indirectes du noyau suprachiasmatique.

Le système anti-éveil, central dans la régulation des cycles de veille-sommeil, est donc susceptible d'intégrer des informations neurales et humorales relatives à l'état fonctionnel de l'organisme et à l'horloge biologique circadienne pour déclencher le sommeil.

On peut distinguer principalement deux types de régulations : une régulation circadienne et une régulation homéostatique (expliquant la stabilité de la durée de sommeil nécessaire à un individu).

En effet, en dehors de la régulation imprimée par le rythme circadien, une des composantes de l'éveil, la sérotonine, est capable de stimuler le système anti-éveil de l'aire préoptique qui, en retour, inhibe l'ensemble du réseau de l'éveil. L'éveil provoque ainsi sa propre inhibition. C'est donc bien un système anti-éveil qui facilite l'endormissement. Il existe également de nombreuses substances secrétées pendant la veille et susceptibles de promouvoir le sommeil, ce sont les substances hypnagogues. Enfin, au niveau bulbaire, le noyau du tractus solitaire joue également un rôle dans l'endormissement : la stimulation des nerfs vago-aortiques et du sinus carotidien provoque l'endormissement d'un animal insomniaque. Les médecins de l'Antiquité avaient déjà fait cette observation. En effet, le mot carotide vient du grec signifiant "qui provoque un sommeil profond".

1.1.5 Le sommeil est une variable extrêmement régulée mais difficile à contrôler (62)

1.1.5.1 Alors que de nombreux facteurs semblent pouvoir ponctuellement augmenter l'éveil...

De multiples facteurs permettent d'augmenter la durée et la qualité de l'éveil. L'éveil est la conséquence de deux mécanismes parallèles : l'inhibition du sommeil et l'activation neuronale généralisée. Ainsi, le rythme circadien avec ses synchroniseurs externes tels que la lumière et la température, mais aussi différentes stimulations sensorielles environnementales (comme le bruit) et internes (la faim, la soif, la douleur) ou encore des stimulations affectives ou cognitives, peuvent agir sur l'éveil. L'observation empirique montre que, lorsque les motivations positives sont suffisamment fortes, il est possible de rester éveillé plus que d'habitude, sans fatigue excessive. L'insomnie est ainsi la plupart du temps un trouble de l'éveil, lié soit à la persistance de l'activité du réseau de l'éveil, soit à l'hypoactivité du système anti-éveil (diminution de l'efficacité du système anti-éveil).

Outre les neurotransmetteurs de type monoamines et les peptides de l'éveil (comme le CRF, Corticotropine Releasing Factor) qui activent le cortex, certaines substances sont éveillantes : par exemple, l'amphétamine ou le modafinil qui agissent en augmentant la durée d'action de l'adrénaline, de la noradrénaline et surtout de la dopamine, dans les synapses. S'il est également possible d'augmenter la qualité de l'éveil par des drogues, il est plus difficile d'en augmenter la durée sans se heurter à des phénomènes d'accoutumance (nécessité de doses plus grandes), d'assuétude (dépendance du sujet vis-à-vis de la drogue) ou de toxicité (de fortes doses d'amphétamines provoquent un tableau de psychose aiguë).

Les facteurs régulateurs comme le rythme circadien, mais aussi les stimulus externes et les neurotransmetteurs et neurohormones variés qui composent le système d'éveil, peuvent augmenter ponctuellement l'éveil et donc affecter le sommeil. En revanche, tout éveil prolongé est suivi d'une augmentation secondaire du sommeil, car c'est pendant cette période que nous produisons les facteurs responsables du sommeil.

1.1.5.2 ...Il est beaucoup plus difficile de contrôler artificiellement le sommeil et de le restaurer en cas de besoin

Le sommeil est une variable extrêmement régulée. La durée journalière de sommeil chez un individu reste en effet à peu près stable de jour en jour, sous une grande variété de conditions. Elle est beaucoup moins facilement affectée que la prise alimentaire, le travail mental et physique ou l'humeur. De plus, un rebond de sommeil (bien que partiel) semble nécessairement succéder à sa privation. On l'observe aussi bien pour le sommeil lent que pour le sommeil paradoxal. Comment l'expliquer ? On a vu que la sérotonine sécrétée pendant la veille entraîne l'activation du système anti-éveil de l'aire préoptique même si les systèmes d'intégration en sont encore inconnus. Il est également très probable que le système anti-éveil soit activé par d'autres substances hypnogènes endogènes peptidiques qui pourraient s'accumuler pendant la veille. Enfin, on a vu que différentes influences vagales pouvaient jouer. Cependant, si le sommeil est sensible à de nombreux facteurs de contrôle endogènes, il est également très difficile de le réguler artificiellement.

1.1.5.2.1 Des substances endogènes pouvant influencer le sommeil

Depuis près d'un siècle, les chercheurs sont à la recherche de ces substances qui s'accumuleraient pendant l'éveil, induiraient le sommeil et seraient métabolisées pendant celui-ci. Leur découverte pourrait à la fois éclaircir la question de la fonction du sommeil et permettre le développement de puissants somnifères naturels. Parmi celles qui ont montré des activités hypnogènes, on compte les peptides muramyl, l'interleukin-1 (une cytokine impliquée dans les réponses immunitaires), le « delta sleep inducing peptide » (substance isolée dans le sang de lapins endormis), un acide aminé essentiel à chaîne longue, le cis-9,10-octadecenoamide, et bien sûr, l'adénosine, témoin du métabolisme central. D'autres substances naturelles pourraient être considérées comme des facteurs régulateurs de sommeil. La GH-RH (Growth hormone-releasing hormone, sécrétée par l'hypothalamus) et la prostaglandine PGD2 augmentent à la fois SOL et SP ; la vasotocine (sécrétée par la neurohypophyse) augmente le SOL et supprime le SP, l'insuline augmente le SOL. Enfin, plusieurs substances semblent produire une augmentation relativement sélective de SP, comme le VIP (qui pourrait interagir avec l'acétylcholine), la cholecystokinine et la bombésine (relâchés dans le tractus digestif après l'ingestion de nourriture), la somatostatine,

ou encore la prolactine. La mélatonine peut activer le sommeil ou l'éveil chez les animaux mais, chez les hommes, cela n'a été montré que chez ceux qui en sont déficients. La liste des substances pouvant influencer sur le système anti-éveil s'allonge petit à petit, révélant que le sommeil est soumis à de multiples régulations homéostatiques mettant en jeu des substances participant à la régulation de nombreuses autres fonctions, comme le métabolisme énergétique, la thermorégulation, la reproduction. Cependant, aucune de ces substances n'a encore été reconnue comme un véritable initiateur de sommeil.

1.1.5.2.2 Des drogues hypnogènes peu satisfaisantes

Les incertitudes concernant les mécanismes du sommeil empêchent le développement de véritables drogues hypnogènes physiologiques. Alors que l'homme a su trouver dans la nature des produits augmentant l'éveil, il n'a pas encore trouvé de molécules hypnogènes bien ciblées. Shakespeare, qui déclarait déjà, par la bouche de Iago (*Othello*, III, 3) : « Ni le pavot, ni la mandragore, ni tous les sirops narcotiques du monde ne te rendront jamais par médecine ce doux sommeil que tu avais hier. », ne s'y était pas trompé. Que pouvons nous dire de plus aujourd'hui ?

Les opiacés et leurs dérivés (morphine, héroïnes) ne sont pas de véritables hypnotiques, mais des analgésiques narcotiques. Les barbituriques entraînent le sommeil en déprimant l'activité du système d'éveil, mais leur excès entraîne une narcose (sommeil artificiel, anesthésie générale du système nerveux) ou un coma, ce qui fait que leur utilisation thérapeutique a été abandonnée. Les benzodiazépines, moins dangereuses, constituent la classe de somnifères la plus couramment utilisée aujourd'hui. Elles peuvent toutefois avoir, selon les molécules et les individus, des effets indésirables (troubles de la mémoire et de l'humeur, effets résiduels, accoutumance, rebond d'insomnie à l'arrêt du traitement) et l'inconvénient de diminuer le sommeil paradoxal. Ces somnifères, qui se fixent sur les récepteurs GABA-A, agissent en potentialisant l'effet du GABA (hyperpolarisation du neurone postsynaptique), donc en améliorant la transmission GABAergique, et ainsi l'activité du système anti-éveil. Elles ont cependant l'inconvénient de ne pas être spécifiques aux systèmes de l'éveil et donc de perturber d'autres circuits, comme celui de la mémoire et de l'humeur.

Le problème est d'isoler un phénotype particulier des sous-unités de récepteurs GABA-A aux endroits stratégiques des réseaux de l'éveil. De nouvelles molécules, agonistes des

benzodiazépines, mais présentant une affinité plus spécifique pour différentes classes de récepteurs GABA-A (notamment ceux impliqués dans la sédation mais pas dans la réduction de l'anxiété), ont ainsi été récemment découvertes (118).

Comme on le voit, des molécules hypnogènes peuvent agir en diminuant l'activité des récepteurs aux acides aminés excitateurs (donc l'activité du système d'éveil) ou en augmentant l'activité des récepteurs GABAceptifs (donc l'activité du système anti-éveil), et ainsi faciliter le sommeil. Cependant, la cascade des événements qui conduisent de l'éveil au sommeil est si complexe qu'il est vain d'espérer isoler un jour une substance qui soit nécessaire et suffisante pour provoquer le sommeil. De plus, même si l'on arrive à faire dormir, il est beaucoup difficile de restaurer un sommeil physiologique fait de l'alternance de SOL et de SP dont les mécanismes de régulation propres restent encore peu connus. Comme nous le verrons par la suite, la question des fonctions respectives de ces deux stades de sommeil est encore loin d'être résolue, ce qui laisse subsister de grandes interrogations quant aux régulations spécifiques de leur apparition et de leur durée, donc quant au moyen de les influencer.

1.2 Pourquoi dormons nous ?

On s'est longuement interrogé sur les causes du sommeil. La principale est l'envie de dormir

Professeur Ougudu, La chose médicale.

1.2.1 Le paradoxe du sommeil : une fonction primordiale pour l'organisme...dont la fonction est une énigme

Même s'ils sous-tendent encore largement l'inconscient collectif, les présupposés selon lesquels le sommeil ne serait qu'un processus passif, issu du repos des fonctions cognitives et sensitives, ont fait long feu depuis longtemps. Les études scientifiques ont en effet montré que le sommeil est en réalité un processus actif, une aptitude de l'organisme contrôlée par le système nerveux, régulée voire même soumise à une homéostasie (une dette de sommeil lent ou de sommeil paradoxal sera toujours suivie d'un rebond) et qui plus est une aptitude de toute évidence vitale à l'organisme. Bref, une fonction.

Cependant, alors que l'alimentation ou la respiration ont une fonction clairement définie, la (les) fonction(s) du sommeil reste(nt) obscure(s). S'il apparaît clairement que le sommeil a un impact bénéfique sur la sensation de repos du corps et du cerveau, on ne connaît pas les fonctions exactes qu'il exerce dans l'organisme. Ainsi la question du rôle du sommeil est donc loin de faire l'unanimité chez les chercheurs.

1.2.2 Les premières explications (62, 129)

L'alternance activité-repos appartient au monde vivant végétal ou animal et nous semble ainsi simplement naturelle. L'éveil, qui est nécessaire à notre survie, s'accompagne des dépenses d'énergie demandées par la satisfaction des besoins immédiats de l'individu ou de l'espèce. Deux notions intuitives expliquent alors le sommeil par rapport à l'éveil. La première est écologique et rend compte d'un héritage génétique que nous tenons de nos ancêtres, les premiers vertébrés à sang chaud (Homéothermes). Comme ils étaient placés dans des conditions de ressources limitées où la nourriture était insuffisante, l'évolution aurait d'abord "inventé" l'hibernation, puis la torpeur, pour permettre, avec la diminution de la température centrale, une économie d'énergie et une survie prolongée en l'absence de nourriture. Une variante à cette notion d'économie d'énergie est celle de la protection : le sommeil pourrait donc avoir évolué pour protéger les animaux de leurs prédateurs en réduisant leur activité pendant la période où ils sont le plus vulnérables. Le sommeil serait l'héritier de ces mécanismes. La seconde notion est fondée sur le concept subjectif de fatigue: l'activité cérébrale ou musculaire entraîne la fatigue et nécessite donc une période de "repos" musculaire et cérébral pendant lequel les cellules nerveuses pourraient devenir inactives. Activité-repos, éveil-sommeil apparaissent ainsi rentrer dans un cadre naturel logique.

En fait, ce schéma est trop simple et ne tient pas compte de la réalité. Il faut admettre, d'une part, que notre cerveau (comme celui de tous les Homéothermes: des oiseaux à l'homme) subit l'alternance, non de deux, mais de trois états de vigilance principaux: l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal. D'autre part, nous savons que le sommeil n'est pas un repos du cerveau, stricto sensu, mais un phénomène actif. Pendant le sommeil paradoxal notamment, le cerveau consomme au moins autant de glucose et d'oxygène que pendant l'éveil. L'organisation des deux types de sommeil laisse d'ailleurs à penser qu'ils occupent des rôles distincts. Il est possible que le sommeil soit l'aboutissement actuel des mécanismes de

conservation de l'énergie, mais les retentissements hormonaux du sommeil lent font supposer que des processus de synthèse peuvent également survenir et jouer sans doute un rôle à la fois au niveau du système nerveux central (phénomènes de mémoire à long terme) et de l'organisme (nanisme par déficit de sommeil). Enfin, le fait que le besoin de sommeil se fasse sentir indépendamment du besoin de conservation d'énergie métabolique, et que sa privation soit suivie d'un rebond, quelles que soient les circonstances environnementales, montre qu'il occupe certainement chez la plupart des Homéothermes d'autres rôles plus complexes.

1.2.3 De nombreuses hypothèses au niveau central

Il apparaît aujourd'hui que le sommeil occupe vraisemblablement non pas une mais plusieurs fonctions. Avec l'augmentation des connaissances concernant les mécanismes à l'origine du sommeil, de nombreuses hypothèses ont vu le jour au sujet de rôles potentiels du sommeil au niveau cérébral (60, 62, 129-131). Nous avons choisi de présenter ici celles qui nous paraissent être les plus intéressantes à l'heure actuelle.

1.2.3.1 Sommeil et cognition

Parce que plusieurs jours de privation de sommeil chez l'homme affectent avant tout les performances intellectuelles, on a pu penser que le rôle du sommeil était de permettre les fonctions mentales supérieures. Cependant, une forte motivation ou la prise d'excitants semblant suffisante pour la corriger, la baisse des performances intellectuelles pourrait également être considérée comme l'expression du besoin d'entrer dans le sommeil.

1.2.3.2 Sommeil lent et réparations cellulaires

Le sommeil dans le monde animal est positivement corrélé au taux métabolique, qui est lui-même corrélé à une augmentation des radicaux libres. Ces molécules hautement réactives peuvent affecter les membranes et éventuellement entraîner des morts cellulaires. Le taux métabolique et la température cérébrale légèrement plus basse pendant le sommeil lent pourraient donner une opportunité de renouveler les enzymes réparatrices affectées par les

radicaux libres et/ou de favoriser leur action. Dormir permettrait de protéger l'organisme contre les effets délétères d'un éveil trop prolongé.

1.2.3.3 Sommeil paradoxal, neurotransmission et maintien de la fonction synaptique

Pendant le sommeil paradoxal, il n'y a pas lieu de supposer une amélioration des réparations cellulaires puisque la plupart des cellules nerveuses sont aussi actives que pendant l'éveil. Cependant, l'arrêt de l'activité des groupes de neurones aminergiques (noradrénaline, sérotonine et histamine) pourrait permettre aux systèmes de récepteurs inactifs de retrouver leur sensibilité et de pouvoir être à nouveau pleinement fonctionnels pendant l'éveil.

1.2.3.4 Sommeil paradoxal, santé mentale et maturation neurale

L'idée que le sommeil paradoxal puisse participer à la maturation neurale est fortement appuyée par le lien étroit qui existe, parmi les espèces, entre la durée du sommeil paradoxal chez le nourrisson et l'immaturation du système nerveux à la naissance. Mais pourquoi le sommeil paradoxal subsisterait-il à l'âge adulte ? Et pourquoi serait-il sélectivement restauré après sa privation sélective chez l'adulte ? Les études montrant une importance du sommeil paradoxal dans la santé mentale, ou même dans l'apprentissage ou la mémorisation sont loin de faire consensus parmi les scientifiques (130). Enfin, les différences de capacités d'apprentissage entre les espèces (ou entre les individus d'une même espèce) ne sont apparemment pas reliées à la durée totale de sommeil paradoxal.

1.2.3.5 Sommeil paradoxal et maintien de l'hérédité psychologique

Chez les animaux immatures à la naissance, qui ont un développement sensoriel retardé, le sommeil paradoxal, par son intense activation neuronale et dépense d'énergie centrale, pourrait agir comme un substitut de stimulation externe et permettre ainsi au cerveau de se développer, notamment en ce qui concerne les comportements instinctif. Chez l'adulte, le sommeil paradoxal offrirait la possibilité d'activer régulièrement les réseaux de neurones responsables de ces comportements, gardiens de notre identité héréditaire, sous l'influence de facteurs génétiques.

Comme on le voit, l'abondance des théories est le signe que le sommeil occupe probablement de nombreuses fonctions au niveau central, dont certaines ont peut-être été correctement identifiées. Il est en fait probable qu'au cours de l'évolution, avec la complexification des organismes et des cerveaux, le sommeil ait évolué pour occuper ou participer à de nouvelles fonctions se surajoutant aux précédentes, et d'importance différentes selon les espèces et leurs besoins propres. Il est donc possible que le sommeil permette la réalisation d'un ensemble de fonctions indépendantes dont la seule caractéristique commune soit une plus grande efficacité à l'échelle du cerveau comme de l'organisme (100). Certains ont ainsi suggéré d'une manière plus générale que le rôle du sommeil pourrait être de réajuster l'organisation des réseaux de neurones, la distribution des récepteurs et des neurotransmetteurs, qui a été modifié pendant l'éveil (47, 90). Il est également possible que le sommeil n'ait qu'une seule grande fonction qui n'a pas encore été largement acceptée. Il est possible enfin que le sommeil serve en réalité une fonction unique plus profonde qui rassemble toutes celles qui ont déjà été perçues.

1.2.4 Implication du sommeil dans la régulation du métabolisme périphérique, piste potentielle pour un rôle majeur du sommeil complexe dans l'organisme

Il semble que le sommeil paradoxal apparaisse au cours de l'évolution avec l'acquisition de l'homéothermie (les oiseaux et les mammifères). La dualité sommeil lent–sommeil paradoxal a pu alors permettre de prendre en charge le besoin fondamental de régulation d'un métabolisme énergétique beaucoup plus intense que suppose l'acquisition de cette caractéristique. Parmi les nombreux travaux qui ont été menés par les chercheurs pour comprendre le rôle qu'occupe le sommeil dans l'organisme, les plus fréquentes expériences sont celles qui s'attachent à étudier les différentes pathologies du sommeil ou bien ce qui se passe lorsqu'on en prive les sujets observés. Comme nous allons le voir, la relation étroite et réciproque qui lie les modifications neuroendocriniennes chroniques associées à la régulation de la balance énergétique et les mécanismes du sommeil nous a poussés à considérer de près une autre hypothèse pour un rôle du sommeil complexe, alternance rythmique de SOL et de SP : sa participation active à la régulation du métabolisme périphérique.

1.2.4.1 Influence du sommeil sur les rythmes hormonaux et circadien

D'une part, la régulation du sommeil semble intimement liée au fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HH). Le sommeil semble avoir un impact direct sur certaines des neurohormones sécrétées par l'hypothalamus et l'hypophyse et être lui-même affecté par certaines d'entre elles. D'autre part, la régulation du rythme veille-sommeil, tout comme le contrôle de la prise alimentaire et donc du métabolisme périphérique, est en étroite relation avec l'horloge interne située dans les noyaux suprachiasmatiques ; elle peut également rétroagir à son tour sur le système circadien et par là même, peut influencer un grand nombre de paramètres (14) liés au métabolisme périphérique.

Ainsi, le sommeil agit directement sur la sécrétion de plusieurs hormones, comme la prolactine (PRL) et l'hormone de croissance (GH). Les pics de sécrétion de PRL et de GH sont corrélés positivement aux ondes lentes de l'activité électroencéphalographique (caractérisant le sommeil lent et survenant chez l'homme majoritairement en début de nuit) (150). Ces deux hormones sont directement liées au métabolisme, et en particulier à l'anabolisme. La sécrétion nocturne de thyrotropine (TSH) est fortement influencée à la fois par le sommeil (ou sa privation) et l'horloge suprachiasmatique (52). Le cortisol (et les corticostéroïdes en général) est sécrété par les glandes surrénales juste avant l'heure habituelle de réveil et durant les premières heures de la phase active. Sa sécrétion est d'autre part également stimulée par les situations de stress et d'exercice physique survenant pendant l'éveil.

Toutes ces hormones sont fortement impliquées dans la régulation du métabolisme.

1.2.4.2 Données pathologiques et épidémiologiques: conséquences des perturbations du sommeil sur le métabolisme périphérique

1.2.4.2.1 Le travail en horaires décalés

Plusieurs études ont rapporté que les sujets avec un travail à horaires décalés (nocturnes ou tournants) ont un risque cardio-vasculaire accru. Il a également été montré qu'il existe une relation significative positive entre le nombre d'années de travail posté et l'indice de masse corporelle ou le rapport tour de taille/ tour de hanches, témoin de l'adiposité abdominale.

L'horaire irrégulier des pauses de récupération (alternant les phases nocturnes et diurnes), la déstructuration des repas, le stress inhérent au travail ainsi que le niveau socio-économique n'expliquent pas tout. Il semble que des altérations hormonales et métaboliques ainsi qu'une qualité moindre du sommeil, probablement liées à la désynchronisation des rythmes, pourraient être incriminées dans ce phénomène (132).

1.2.4.2.2 Les troubles du sommeil

La narcolepsie est une maladie chronique du sommeil caractérisée par deux grands symptômes cliniques : somnolence journalière excessive et survenue de crises de cataplexie, c'est à dire, perte soudaine de la tonicité musculaire, provoquée par les émotions. Or, il a été découvert que la narcolepsie s'accompagnait d'un accroissement de l'indice de masse corporelle et d'une prédisposition à l'obésité indépendante du sexe et des traitements pharmaceutiques. Cela pourrait être lié aux taux réduits de moitié de leptine périphérique constatés chez les individus concernés. La leptine, sécrétée par les cellules adipeuses, étant un des principaux marqueurs d'adiposité, il semble que des altérations complexes de la régulation du métabolisme énergétique soient présentes chez les patients atteints de narcolepsie (125).

La plupart des troubles du sommeil, à l'inverse, sont liés à un défaut dans l'organisation et le déroulement du sommeil : durée plus courte ou temps de sommeil plus fragmenté. Ils rentrent dans le cadre de ce qu'on appelle la dette de sommeil.

1.2.4.2.3 La dette de sommeil et le syndrome plurimétabolique

La dette de sommeil chronique est devenue de plus en plus fréquente parmi les individus résidant dans les pays développés en raison des modes de vie et des opportunités imposés ou offerts par la société moderne. La réduction de sommeil, « volontaire » ou liée à des pathologies du sommeil, associée à la perturbation des cycles, est aujourd'hui très répandue et encore plus marquée dans certains cas : garde à vue, prison, service de réanimation, organisation du travail (les trois 8), rythmes familiaux (122, 137). Aujourd'hui, de nombreuses études épidémiologiques montrent une association de la dette de sommeil à la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 parmi la population (136, 141).

Tout ceci suggère fortement une implication de la dette de sommeil et/ou de la désynchronisation plus générale entre l'horloge circadienne endogène et le mode de vie dans le syndrome plurimétabolique associant intolérance au glucose, obésité et maladies cardiovasculaires (122).

1.2.4.3 Données expérimentales : les expériences de privation de sommeil et leur conséquences pour l'organisme

1.2.4.3.1 Conséquences d'une réduction de sommeil chez l'homme

Divers travaux ont montré que la qualité du sommeil joue un rôle significatif dans la régulation de la glycémie chez le sujet sain. Mais au-delà, une étude sur la restriction récurrente du sommeil à 4 heures par jour pendant 6 jours chez de jeunes hommes a montré que la dette de sommeil entraîne des répercussions métaboliques (diminution de la tolérance au glucose) et endocriniennes (hyperactivité sympathique, baisse de la TSH et hypercortisolisme vespéral) mimant celles du vieillissement physiologique et susceptibles d'avoir des conséquences pathologiques à long terme (137). Ainsi, le profil glycémique diurne de sujets sous perfusion de glucose est plus élevé après une nuit de privation de sommeil qu'après une nuit de sommeil normale, alors que les profils d'insulino-sécrétion apparaissent comparables. Ces résultats suggèrent que la privation de sommeil nocturne s'accompagne d'une diminution de la tolérance au glucose le lendemain, probablement liée à une réduction de la sensibilité à l'insuline. Par ailleurs, ils indiquent que des perturbations du sommeil sont susceptibles d'aggraver certaines anomalies métaboliques chez l'individu âgé et chez le sujet obèse, voire chez le patient diabétique (123, 124).

De plus, la privation partielle de sommeil chez l'humain est également corrélée à une augmentation des taux diurnes de ghréline, hormone orexigène sécrétée par le tractus digestif, et à une diminution des taux diurnes de leptine plasmatique, hormone anorexigène synthétisée par le tissu adipeux (136, 138, 139, 141). Ces deux molécules sont fortement impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire. Ces résultats, qui ont été utilisés pour montrer une implication du manque de sommeil dans l'induction de l'obésité, viennent également à l'appui de l'implication du sommeil dans la régulation du métabolisme.

1.2.4.3.2 Privation totale de sommeil chez les animaux

Everson a réalisé des privations prolongées de sommeil chez des rats de laboratoire. Il a ainsi été établi que le sommeil était indispensable à la vie puisque les rats maintenus éveillés meurent au bout de 16 jours, sans qu'aucune autre cause ne soit identifiée (35, 36). Le manque de sommeil perturbe donc des processus biologiques vitaux. Les principaux symptômes, tels que la perte de poids, paradoxalement associée à une hyperphagie, qui apparaissent de façon précoce, sont attribués à l'augmentation progressive de la dépense énergétique périphérique et à une utilisation accélérée des nutriments. De plus, les rats montrent une apparence affaiblie ainsi que des lésions érythémateuses sur la peau de la queue et sur la surface plantaire des pattes. Finalement, le facteur qui engendre la mort est la baisse des résistances aux infections qui permet aux agents pathogènes opportunistes de se développer. Le système immunitaire est donc le premier à faillir, mais d'autres systèmes tels que la thermorégulation, la conservation de l'énergie et la restauration tissulaire sont également fortement perturbés.

En fait, il semble que la privation de sommeil soit responsable, outre l'augmentation de la dépense énergétique, d'une sorte de malnutrition protéino-énergétique car les rats en présentent certains symptômes caractéristiques tels qu'anémie et hypoalbuminémie plasmatique. Et on s'attend bien à ce qu'un accroissement de la dépense énergétique entraîne une augmentation de la demande en protéines. Cependant, alors qu'un régime hyper protéique aggrave l'état de santé des rats (perte de poids augmentée face au coût énergétique d'utilisation des protéines), on peut ralentir le développement des symptômes pathologiques en nourrissant les rats avec un régime hyper calorique équilibré mais riche en gras, donc facilement utilisable pour subvenir à la demande métabolique accrue. Indirectement, en augmentant l'apport calorique, il permettrait de réduire le catabolisme protéique ce qui expliquerait pourquoi il est plus efficace qu'un régime hyperprotéique pour maintenir le bilan azoté (39).

Pour aller plus loin, l'expérience a été arrêtée juste avant que les rats ne meurent. On leur a alors permis de dormir à nouveau et on a observé, parallèlement à un rebond de sommeil avec un fort taux de sommeil paradoxal, un renversement de tous les symptômes observés précédemment jusqu'au retour à la normale de leur état de santé au bout de 15 jours (38). Ainsi, ne les ayant pas seulement suspendus mais également renversés, il apparaît que le

sommeil sert ou permet les processus anaboliques. Effectivement, il a été montré que la privation de sommeil entraîne la suppression des pics de GH et la diminution des concentrations plasmatiques des principales hormones anaboliques comme GH, IGF-1 et PRL (37).

La privation de sommeil totale et chronique a donc des conséquences délétères sur la régulation du métabolisme énergétique, provoquant l'établissement d'un stade catabolique intense, l'impression étant qu'en absence de sommeil les processus de synthèse, synthèse protéique, mais aussi les processus de mise en réserve énergétique sous forme de lipides sont inhibés et que rien, pas même un apport énergétique très élevé ne peut s'opposer à ce stade catabolique qui conduit, si la privation de sommeil se prolonge, à la mort du sujet.

1.2.4.4 Dualité sommeil lent sommeil paradoxal : possibilité d'une action différentielle sur le métabolisme énergétique et protéique

Il semble assez difficile de discerner indépendamment l'un de l'autre le rôle du SOL et celui du SP au niveau métabolique. Il a été montré que la privation spécifique de SP chez les rats engendre les mêmes perturbations qu'une privation totale de sommeil (76), la différence majeure étant que les symptômes apparaissent moins rapidement. Cela tend tout de même à nous faire envisager un rôle très important du SP dans la régulation du métabolisme. Il paraît donc faux d'affirmer, en se basant sur les études des sécrétions hormonales, que seul le SOL serait en rapport avec le métabolisme, et que le SP serait plutôt impliqué dans les processus de stockage cognitif.

En outre, certaines études ont suggéré que la synthèse protéique et le sommeil paradoxal sont liés. D'abord, l'importance du SP mise en évidence durant le stade post-natal précoce est connue pour être concomitante à des synthèses protéiques intenses. De plus, chez l'animal, l'apprentissage, qui est suspecté d'être corrélé avec la formation de nouvelles protéines s'accompagne également d'un accroissement de la durée du SP. On a également constaté que les taux cérébraux d'expression protéique étaient augmentés dans le cerveau au cours du SP (90). Enfin, l'inhibition des synthèses protéiques dans le corps entier entraîne une baisse spécifique du sommeil paradoxal (29, 30).

La dualité du sommeil permet d'envisager la possibilité d'une action différentielle des deux types de sommeil dans la régulation du métabolisme énergétique d'une part, et du

métabolisme protéique d'autre part. Il est toutefois important de préciser que cette relation entre sommeil et métabolisme n'est pas univoque car la régulation du sommeil et celle du métabolisme énergétique entretiennent selon toute vraisemblance des relations réciproques multiples.

1.3 Bilan : Pourquoi s'intéresser à l'influence de l'alimentation dans la régulation du sommeil ?

1.3.1 Les troubles du sommeil, un problème de santé public majeur

Les troubles du sommeil sont la plupart du temps étudiés comme symptômes ou conséquences secondaires d'autres pathologies (psychiatriques, neurodégénératives, ou autres). Pourtant, il est clair qu'ils constituent en eux-mêmes un problème de santé publique majeur qu'il faudrait mieux étudier (82). En dehors de certaines affections rares telles que la narcolepsie ou l'hypersomnie, les troubles du sommeil qui entraînent une dette de sommeil, tels que l'insomnie ou encore ce qu'on pourrait qualifier de « mauvais sommeil » (dette de sommeil moins importante que l'insomnie mais plus répandue et moins facilement détectée), sont en effet très fréquents parmi les populations humaines.

Les études épidémiologiques qui ont été réalisées pour étudier la prévalence des troubles du sommeil au sein de la population et pour en évaluer l'impact socio-économique ont malheureusement souffert d'une grande hétérogénéité dans la définition des symptômes pris en compte. Dans une étude épidémiologique récente de grande ampleur portant sur un échantillon représentatif de la population française et utilisant des critères bien établis définissant l'insomnie sur un plan clinique (83), 73% des gens rapportent avoir un problème de sommeil. Plus précisément, ils sont 19%, soit près de une personne sur cinq, à répondre aux critères définissant l'insomnie, et 9% à présenter une insomnie sévère pour laquelle ils reçoivent généralement un traitement médicamenteux (84). Cela montre une prévalence très importante de la dette chronique de sommeil parmi la population.

Or l'insomnie chronique a la plupart du temps des conséquences directes sur la fatigue et la somnolence (réduction de la vigilance, irritabilité) pendant la journée ; et cela a un coût économique immédiat pour le système de santé (augmentation du recours au soin et aux consultations, consommation excessive d'hypnotiques et de tranquillisants). Malheureusement, ces problèmes déjà plus ou moins bien pris en charge ne sont probablement que peu de choses en comparaison de la partie immergée de l'iceberg que représentent les coûts indirects aussi bien sociaux que médico-économiques qui découlent des problèmes de manque de sommeil volontaire ou non, déclarés ou non. En effet, si les accidents dans lesquels la fatigue est impliquée sont 2,5 fois plus fréquents chez les insomniaques chroniques, plus généralement, la dette de sommeil est un facteur de baisse de la productivité du travail, d'« erreurs humaines », d'accident au travail et sur la route. En ce qui concerne l'insomnie chronique, elle est un facteur de risque majeur dans le développement de nombreuses pathologies psychiques (anxiété, dépression, alcoolisme et dépendances variées), mais aussi physiques, et plus généralement un très bon facteur prédictif de la mortalité. A titre indicatif, il faut savoir que pour 1988, aux Etats-Unis, l'ensemble des coûts induits a été évalué à environ 100 milliards de dollars. Il faut maintenant ajouter à cette longue liste d'effets néfastes les conclusions d'études physiologiques et épidémiologiques récentes montrant que la dette de sommeil, même volontaire et non déclarée comme trouble du sommeil, pourrait être un facteur de risque très important pour le développement et l'aggravation de pathologies métaboliques aussi répandues que l'obésité et le diabète de type 2 (136). La dette de sommeil semble également être impliquée de manière générale dans la baisse des défenses immunitaires (34).

Nous avons vu que ces troubles pouvaient être difficiles à soigner : on ne connaît pas encore dans le détail les mécanismes de régulation du sommeil. Les molécules les plus utilisées, les anti-dépresseurs et les somnifères sont la plupart du temps inaptes à restaurer un sommeil physiologique fait de l'alternance cyclique de sommeil lent et de sommeil paradoxal. De plus, on ignore encore largement les conséquences secondaires qu'ils peuvent entraîner et comment y remédier.

1.3.2 Comment l'alimentation est-elle susceptible d'affecter le sommeil ?

Sommeil et alimentation entretiennent tous les deux avec le rythme circadien mais également avec de nombreuses autres fonctions, des interactions complexes, multiples et réciproques. En dehors de la régulation homéostatique propre au sommeil, il est ainsi clair que les rythmes veille-sommeil et les rythmes circadiens peuvent être modifiés par des influences extérieures telles que la disponibilité de nourriture ou la température ambiante. Il s'agit de régulations de type « allostatiques », qui permettent d'adapter ces rythmes à différentes situations, selon les besoins (118). Ainsi, sommeil et prise alimentaire sont modulés de telle sorte que les besoins de l'un et l'autre ne surviennent pas au même moment du cycle journalier. Nous avons également tous fait les expériences suivantes : la faim empêche de trouver le sommeil, un lourd repas assoupit. Les systèmes de la sensibilité viscérale et de la régulation de la prise alimentaire semblent avoir des incidences sur les systèmes centraux responsables de l'éveil.

L'influence de l'alimentation sur le sommeil constitue un vaste champ d'étude pour mieux comprendre la régulation du sommeil mais aussi pour en prévenir ou en soigner les éventuels dysfonctionnements. Un des principaux bénéfices que l'on peut espérer de traitements alimentaires du sommeil et de ses troubles est la possibilité de rétablir un sommeil physiologique, respectant les cycles normaux d'alternance des phases de SOL et de SP que les traitements pharmacologiques ont souvent du mal à rétablir.

Pour étudier les conséquences de l'alimentation sur la régulation du sommeil, nous avons choisi deux approches, deux angles complémentaires, qui ont servis de base aux travaux de recherche présentés dans cette thèse.

1.3.2.1 Première approche

L'alimentation en tant qu'apport de substrats métaboliques, influe directement sur les mécanismes de régulation du métabolisme périphérique. Or celui-ci est vraisemblablement l'objet d'une régulation couplée à celle du sommeil. On peut donc soupçonner que l'apport protéino-énergétique, par la voie des régulations à court, moyen et long terme qu'elle exerce sur le métabolisme périphérique, est susceptible de moduler la régulation du sommeil. On le voit, cette approche conduit également à interroger l'hypothèse du rôle du sommeil dans la régulation du métabolisme périphérique. Dans la deuxième partie de la thèse, nous

expliciterons cette approche que nous appellerons « approche métabolique », les arguments qui la fondent et comment elle nous a fait aboutir à nos propres travaux. C'est alors que nous présenterons les modèles que nous avons construits et les résultats que nous avons obtenus pour avancer vers une meilleure compréhension des mécanismes métaboliques qui lient alimentation et sommeil.

1.3.2.2 Deuxième approche

D'une manière plus directe, l'alimentation apporte certains composants qui individuellement, peuvent avoir une activité fonctionnelle dans l'organisme et notamment, agir sur la régulation du sommeil. Certains d'entre eux pourraient constituer un moyen de lutter contre les troubles du sommeil. Dans cette deuxième approche, que nous appellerons « approche nutraceutique », nous considérerons donc l'alimentation comme un vecteur potentiel de substances exogènes de type hypnogènes ou du moins, susceptibles d'influencer le sommeil. Dans la troisième partie de la thèse, nous présenterons les arguments et travaux venant à l'appui de cette potentialité de l'alimentation et nous aborderons notamment le cas des peptides à activité biologique du lait. C'est alors que nous présenterons les modèles que nous avons construits et les résultats que nous avons obtenus dans l'étude du cas d'un hydrolysate peptidique particulier à activité anxiolytique.

Avis au lecteur

Sans avoir la prétention de croire que les travaux et les perspectives présentés ici révolutionneront vos nuits (peupleront vos rêves ?), nous avons tout de même la naïveté d'espérer que ces quelques tentatives d'éclairage donneront à certains un autre regard sur la fonction physiologique la plus méconnue et la plus martyrisée de nos sociétés post-modernes hyperactives et neurasthéniques : le sommeil. Que ce soit dans la deuxième ou la troisième partie, les travaux que nous avons effectués ont au moins ceci en commun d'apporter des résultats permettant d'ouvrir d'attrayantes pistes d'étude sur l'influence de l'alimentation sur le sommeil, tout en laissant derrière eux un goût d'inachevé. Nous présenterons donc, au terme de chaque partie, quelques propositions et perspectives pour continuer à rêver.

Dur travail que celui consistant, avec le recul inhérent à la rédaction du manuscrit, à faire le constat de la petitesse de ce qui a été réalisé, et de l'immensité de ce qui reste à faire. Encore plus difficile, l'amère constatation que l'on aurait pu aller plus loin et poursuivre la voie tracée par les premiers résultats si seulement... Bien sûr, la recherche est par essence non finie, toute découverte ouvrant le pas sur de nouvelles questions, mais cette béquille ontologique ne suffit pas à effacer l'amertume de celui qui sait qu'il aurait pu et peut-être même dû aller plus loin. Quelques soient les toujours bonnes raisons à ces manques, des écueils méthodologico-matériels qu'il a fallu dépasser au temps qui passe trop vite et aux heures de labeur trop comptées, la rédaction de thèse est un travail empreint de regrets, où la seule vraie consolation réside peut-être dans le sentiment qu'après tout, le constat de nos limites est une étape préliminaire nécessaire à toute avancée des connaissances et que finalement, aboutir sur le pas d'un chemin qui nous invite à avancer, c'est déjà réaliser quelque chose.

Le malheureux

Sombre soir sans espoir,
Nuit sans fin sans sommeil,
Le remord le remplit
Mais est-ce que ça suffit ?
Seul, il reste en éveil,
Malheureux dans le noir.

David

Deuxième Partie :
Approche Métabolique,
influence des apports protéino-énergétiques
en lien avec une modulation du métabolisme
énergétique et protéique sur la régulation
du sommeil et de ses différents stades

2.1 Influence de l'apport de substrats métaboliques sur la régulation du sommeil : état de l'art

2.1.1 Introduction

L'alimentation, considérée en terme d'apports énergétiques et protéiques (donc en tant qu'ensemble de macronutriments ou encore de substrats métaboliques) a une influence directe sur la balance énergétique. Elle influence aussi la régulation du métabolisme par le biais de signaux à court terme liés aux repas et à l'absorption intestinale, à la mécano- et chémo-sensibilité viscérale. Elle participe également à la régulation de facteurs hormonaux (tels que la leptine ou l'insuline) qui sont des signaux régulateurs fondamentaux du métabolisme périphérique. Enfin, certaines pathologies du comportement alimentaire peuvent entraîner sur le long terme de graves perturbations de la balance énergétique.

Or, comme on a pu le voir auparavant, la régulation du sommeil est en lien étroit avec la régulation du métabolisme périphérique. Il semble fort probable que le sommeil joue un rôle important dans la régulation du métabolisme et qu'en particulier, SOL et SP ne soient pas impliqués de la même façon dans la régulation du métabolisme énergétique global (essentiellement glucido-lipidique) et dans la régulation du métabolisme protéique.

On peut donc supposer que l'apport protéino-énergétique est susceptible d'avoir une influence sur le sommeil. De nombreux indices viennent à l'appui de cette idée en montrant une très forte implication de la prise alimentaire et de ses conséquences métaboliques pour l'organisme, dans l'initiation et le déroulement du sommeil et de ses différents stades. Certaines études semblent même montrer que l'apport protéino-énergétique est apte à jouer de manière différentielle sur le SOL et le SP.

2.1.2 Arguments en faveur d'une influence des apports énergétiques et protéiques de l'alimentation sur le sommeil

Des expériences réalisées chez le rat mais également des observations faites chez l'homme montrent que le volume et la nature des repas influencent la durée et la répartition des différentes phases de sommeil.

2.1.2.1 Le sommeil postprandial

Nous sommes portés à penser a priori que la propension à s'endormir est accrue après le repas. Cette intuition est appuyée par des études sur l'homme montrant sa perception subjective d'un endormissement et d'une baisse de la vigilance après l'ingestion de nourriture, en particulier après un repas riche en glucides (107, 155). Chez le rat, une corrélation plus élevée est observée entre le repas et la durée du sommeil survenant une à deux heures après l'ingestion, c'est à dire au moment où l'essentiel des nutriments ingérés au cours du repas passe la barrière intestinale pour être métabolisés au niveau cellulaire. Cependant, des études ont montré dans des conditions d'hyperinsulinémie expérimentale (perfusion continue d'insuline) que la réponse était plus rapide, comme si les aliments ingérés n'influaient positivement sur l'endormissement que dans la mesure de leur utilisation métabolique (18).

La plupart des données sur l'animal montrent que les repas et leurs constituants jouent un rôle dans la survenue d'un sommeil postprandial. Les données chez les humains, bien que moins claires, viennent également à l'appui de cette hypothèse même s'il semble bien que le facteur influencé soit moins la latence de l'arrivée du sommeil que la durée des épisodes de sommeil en phase postprandiale (159).

2.1.2.2 Apports énergétiques ou protéiques en excès ou déséquilibrés et sommeil

Une façon d'augmenter significativement les apports alimentaires (énergétiques) et le gain de poids est d'offrir à des rats de laboratoire un accès sans restriction à un assortiment de nourritures riches en énergie et à forte palatabilité, régime dit « cafétéria ». On peut également rendre des rats hyperphagiques par la lésion de l'hypothalamus ventromédian. Dans ces situations où la disponibilité des nutriments est augmentée, on observe une augmentation de la

durée totale de sommeil, tant celle du SOL que celle du SP. Il semble que le SOL soit plus affecté que le SP. En effet, tous les paramètres étudiés (durée totale, variations circadiennes, durée moyenne des épisodes de sommeil) sont augmentés, ce qui n'est pas le cas pour le SP. De plus, lorsque les rats sont à nouveau nourris normalement, le SOL met plus de temps à revenir aux niveaux habituels (17, 22).

Le rôle de la composition des repas est bien illustré par une expérimentation réalisée sur des sportifs d'endurance soumis au régime dissocié scandinave (passage d'une alimentation hypoglycémique à une alimentation hyperglycémique pour augmenter les réserves de glycogène avant une compétition). Dans cette étude, il a été montré que le passage à une alimentation presque exclusivement lipido-protéique augmentait le SP alors que le passage à une alimentation hyperglycémique favorisait le SOL (45).

2.1.2.3 Expériences de privation de nourriture et de réalimentation

La dénutrition expérimentale réduit la durée de sommeil. Il a été montré que toute privation alimentaire à plus ou moins brève échéance (échéance qui dépend du niveau des réserves énergétiques disponibles dans l'organisme) conduit à une diminution importante du sommeil (10, 18, 26, 70). En effet, la privation totale de nourriture chez des rats pendant 4 jours consécutifs entraîne une diminution progressive du SOL comme du SP. Il est intéressant de noter que cette diminution du sommeil est observée chez des rats de 240-250 g alors que la même privation n'entraîne pratiquement aucune modification du sommeil dans le cas des rats initialement plus gros (380g). Lorsque l'on prolonge la privation de nourriture chez les rats, on peut arriver à une disparition virtuelle totale du sommeil au bout de 6 à 11 jours, le SP disparaissant plus tôt que le SOL (70). Ces résultats montrent qu'en l'absence d'apports externes, l'évolution du sommeil au cours de la privation alimentaire dépend de l'importance des réserves énergétiques endogènes (18).

Cependant, des études chez l'homme ont montré qu'au bout de quatre jours de jeûne total, on observait plutôt une augmentation du sommeil lent profond (89). De même, chez l'oie, dans un contexte de restriction énergétique de longue durée où les réserves lipidiques finissent par participer à hauteur de 90% de la dépense énergétique, le sommeil (et en particulier le SOL) augmente (25). On pourrait croire que ces résultats vont à l'encontre de ceux observés chez le rat, mais en réalité ils traduisent surtout des réponses métaboliques différentes chez des

espèces disposant de réserves énergétiques importantes leur permettant de soutenir un jeûne prolongé, et qui trouvent dans le sommeil un moyen de réduire leur dépense énergétique pour limiter l'utilisation des réserves graisseuses, en réduisant leurs besoins. Lorsque les réserves énergétiques sont suffisantes (comme chez l'oie ou bien chez les rats rendus obèses par lésion du VMH (18)), le sommeil semble donc pouvoir être aussi utilisé comme un outil de conservation d'énergie, au même titre que les phénomènes d'hibernation et de torpeur.

L'importance de l'apport protéino-énergétique pour le sommeil peut également être corroborée par les effets de la réalimentation orale ou intraveineuse chez les sujets privés de nourriture. En effet, la restitution de la nourriture chez l'homme ou chez le rat s'accompagne d'un rebond du SOL et du SP au-delà des durées normales simultanément à une reprise de poids, puis d'un retour à la norme. En phase de fort besoin du métabolisme comme après une privation de nourriture, on observe chez le rat une augmentation parallèle des phases de sommeil et des phases de prise alimentaire (10). De même, chez les patients anorexiques et insomniaques en traitement, la durée de sommeil augmente au cours de la réalimentation, en parallèle avec la reprise de poids, avant de retomber aux niveaux précédents lorsque le poids normal est atteint (77).

2.1.2.4 Nutrition parentérale et sommeil

L'idée d'une modulation du sommeil par les événements métaboliques associés à la prise alimentaire est renforcée par les expériences d'alimentation parentérale exclusive. Les résultats montrent en particulier que le sommeil est intimement lié non seulement à la quantité, mais aussi à la nature et au degré d'utilisation cellulaire des métabolites circulants (21).

Des rats privés de nourriture ont reçu leurs apports caloriques journaliers par des perfusions continues ou discontinues de substances nutritives spécifiques. La mise à disposition de l'organisme d'un apport exclusif intraveineux d'acides aminés augmente considérablement et d'une façon spécifique le nombre d'épisodes et par là même la durée totale de SP, bien que la perfusion ne fournisse que 60% des besoins caloriques (à cause d'une tolérance limitée) et qu'elle entraîne une perte de poids. Ceci apporte un argument majeur à l'hypothèse d'une relation privilégiée entre SP et métabolisme protéique. Une étude chez l'homme a montré qu'une injection supplémentaire d'acides aminés au cours de la nuit conduisait à une

diminution du SP (78). Il est cependant possible que dans ce dernier cas, l'injection a fait diminuer le rapport tryptophane/acides aminés circulants donc l'accès du tryptophane au cerveau et ainsi l'activation sérotoninergique du sommeil (voir 2.1.3.3).

Une simple perfusion de glucose seul n'affecte pas les quantités de sommeil. Cependant, la même quantité de glucose, injectée lorsqu'on laisse les animaux avoir accès à la nourriture, ou bien perfusée soit en parallèle avec de l'insuline exogène, soit de façon discontinue (plus insulinosécrétrice) entraîne bien une augmentation significative de la durée du sommeil. Ces résultats semblent indiquer que la durée du sommeil n'est augmentée que dans la mesure où les substrats métaboliques circulants sont susceptibles d'être effectivement utilisés, grâce à la sécrétion adéquate d'hormones métaboliques telles que l'insuline ou encore la GH. (qui jouent sur le sommeil par le biais de mécanismes centraux) (18, 106).

L'ensemble de ces résultats conduit à proposer une hypothèse de potentialisation du sommeil par un facteur proportionnel au degré d'utilisation des métabolites au niveau tissulaire, appelée théorie ischymétrique du sommeil (20, 21).

2.1.2.5 Influence de l'état nutritionnel et métabolique à long terme sur le sommeil : troubles du comportement alimentaire et métaboliques et régulation du sommeil.

Nous avons déjà montré que des troubles du sommeil pouvaient être impliqués dans des dysfonctionnements de la régulation du métabolisme à long terme (voir 1.2.4.2). A l'inverse, on a pu constater que des troubles du sommeil étaient au moins partiellement imputables à des perturbations du métabolisme déjà installées (80).

L'anorexie correspond à une impossibilité de manger par dégoût ou par absence d'appétit. En réalité, il s'agit avant tout d'une restriction alimentaire volontaire et délibérée. Les enregistrements EEG indiquent une diminution du temps de sommeil total et une augmentation du temps d'éveil nocturne. Dans certaines études, une diminution du pourcentage de SOL est rapportée (105). Ce sommeil court et interrompu étant aussi observé chez des patients obèses en phase de perte de poids, ces résultats indiquent que des problèmes de sommeil sont liés à des conditions de déplétions énergétiques chez l'homme. Souvent la reprise de poids s'accompagne d'une amélioration de la qualité du sommeil et d'un rebond du

SOL. Ainsi, les insomnies constatées chez des patients atteints d'anorexie mentale peuvent être partiellement renversées par une alimentation forcée et un gain de poids (77).

A l'inverse, l'hyperphagie caractéristique du syndrome de Kleine-Levin et souvent de l'obésité accompagne généralement une hypersomnie et en particulier une augmentation du SOL chez les individus atteints (18). Il est maintenant clairement établi qu'il y a une relation directe entre l'apport alimentaire journalier, le statut nutritionnel et l'organisation du sommeil chez les patients atteints d'anorexie et d'obésité (151).

La malnutrition hypoprotéique, phénomène d'origine essentiellement socio-économique, implique un important déséquilibre dans l'apport protéino-énergétique et dans le métabolisme, qui s'accompagne de dermatoses, d'anémies, d'hypoalbuminémies et surtout de déficiences du système immunitaire. Elle est particulièrement néfaste chez l'enfant, la synthèse protéique ayant une importance particulière dans le développement cérébral. On lui associe une perturbation des cycles de sommeil (23, 42).

Enfin, le diabète de type 1 s'accompagne également de troubles du sommeil. Chez les rats, on lui associe une diminution du SP (19).

2.1.3 Hypothèses sur les voies d'action potentielles de l'apport de substrats métaboliques sur le sommeil

La prise alimentaire, par l'intermédiaire de ses différentes composantes, semble être un facteur déterminant de la quantité journalière de sommeil et de la qualité du sommeil. Nous présentons ici quelques pistes relatives aux voies d'action impliquées.

2.1.3.1 Détection précoce des nutriments dans l'intestin

Lors de la digestion, il est établi que les cellules entéroendocrines de la paroi du duodénum détectent la présence des nutriments dans la lumière intestinale, et sécrètent en réponse des médiateurs neuroactifs. Ces derniers sont capables d'activer des afférents sensoriels comme ceux des terminaisons du nerf vague situées à proximité.

En ce qui concerne la qualité de l'apport protéino-énergétique, on peut constater que la réponse de la viscérosensibilité intestinale chimique à la présence de graisse ou de protéines est différente de celle induite par les sucres. Les lipides et les protéines (peptides et acides aminés) stimulent la libération de cholécystokinine (CCK) alors que les sucres stimulent la libération de sérotonine (110, 111). Ces messagers, qui activent des fibres du nerf vague, sont à l'origine d'un message afférent d'origine gastrique et intestinal impliqué dans la régulation de la capacité absorptive et digestive de l'intestin. Par l'intermédiaire du noyau du tractus solitaire, ces signaux sont par ailleurs traités au niveau de l'hypothalamus et interviennent ainsi dans le contrôle de la prise alimentaire comme un signal anorexigène. Il est vraisemblable qu'ils puissent, par cette voie vagale (56, 121), ou encore directement par voie humorale (128), influencer la régulation du sommeil.

2.1.3.2 Le système orexinergique, un système d'intégration d'informations relatives à l'éveil et au comportement alimentaire.

Les neurones à orexines de l'hypothalamus latéral, qui participent de manière très importante aux mécanismes de régulation du sommeil, notamment en améliorant la stabilité des phases d'éveil, sont en interaction avec les autres systèmes de neurotransmetteurs activateurs de l'éveil. Ils reçoivent également de nombreuses informations de systèmes peptidergiques bien connus pour leur participation au contrôle à court terme de la prise alimentaire (comme NPY, « Proopiomelanocortin » POMC) et de signaux métaboliques (glucose, ghreline, leptine) (24, 127, 140). Les neurones à orexines de l'hypothalamus latéral (LH), qui projettent vers de nombreuses aires du cerveau apparaissent ainsi comme un lieu d'intégration de nombreux messages relatifs à l'alimentation et à l'excitation du système nerveux, susceptible de moduler en réponse la stabilité de l'éveil, donc d'influer sur la régulation du sommeil.

2.1.3.3 La régulation humorale du sommeil par l'insuline et la sérotonine

La synthèse de sérotonine cérébrale dépend directement de la concentration de tryptophane (Trp) au niveau central, donc du passage du Trp du sang au cerveau. Or au niveau des systèmes de transport de la barrière hématoencéphalique, le Trp rentre en compétition avec les autres acides aminés neutres apolaires (Large Neutrals Amino Acids ou LNAAs) tels que la tyrosine, phénylalanine, leucine, isoleucine, valine et méthionine. Comme la composition du

repas en macronutriments affecte le rapport entre la concentration plasmatique de Trp et celle des autres LNAAs, elle affecte également la synthèse de sérotonine.

Ainsi, un repas riche en glucides provoque une sécrétion d'insuline, qui entraîne une mobilisation des acides aminés plasmatiques, si bien que le ratio des concentrations plasmatiques Trp/LNAAs augmente et que le passage du Trp dans le cerveau est facilité. Il en résulte une augmentation de la synthèse de sérotonine (156, 157). Ce mécanisme est souvent invoqué pour expliquer en partie le phénomène de satiété, mais il peut aussi rendre compte de la somnolence post-prandiale car la sérotonine est, comme nous l'avons vu auparavant, un des acteurs de l'endormissement. Cette action sert de support pour expliquer en partie le rôle des glucides sur l'induction du sommeil et l'augmentation du SOL.

A l'inverse, un repas riche en protéines a tendance à faire baisser le ratio des concentrations plasmatiques Trp/LNAAs car les protéines apportent relativement moins de Trp que de LNAAs dans la circulation.

2.2 Description de la démarche expérimentale suivie

2.2.1 Notre hypothèse de travail : La modulation du sommeil et de sa composition exprime les conséquences de l'apport protéino-énergétique sur le métabolisme

Les considérations sur l'alimentation, le métabolisme énergétique et le sommeil que nous avons rapportées jusqu'à présent montrent que le sommeil est dépendant d'un apport alimentaire quantitatif et qualitatif adéquat, mais aussi de ses conséquences métaboliques. Des facteurs métaboliques et des nutriments pourraient agir comme des modulateurs de sommeil. On constate ainsi une forte implication de l'apport protéino-énergétique sur la régulation des cycles veille-sommeil mais aussi sur les durées relatives du sommeil lent et du sommeil paradoxal. De plus, comme nous l'avons vu dans l'Introduction Générale (1.2.4), on peut suspecter le sommeil et ses différentes phases d'agir par des mécanismes centraux sur la régulation de la balance énergétique et du métabolisme.

Cela nous a conduit à formuler l'hypothèse de travail suivante : une des fonctions du sommeil est de participer à la modulation du métabolisme périphérique induite par les apports alimentaires. Le sommeil établirait un état stable de référence pour interpréter la situation métabolique du sujet et transcrirait cette analyse en modulant l'activité des noyaux hypothalamiques impliqués dans les mécanismes de régulation du métabolisme périphérique. Ainsi, le sommeil permettrait d'ajuster l'équilibre des processus anaboliques et cataboliques en fonction de la disponibilité des réserves énergétiques et protéiques et des apports alimentaires protéino-énergétiques. En particulier nous avons supposé que des apports alimentaires affectant différemment la régulation du métabolisme énergétique et celle du métabolisme protéique agissent au travers d'une modulation de la répartition du sommeil en SOL et SP. En effet, l'existence d'une relation dépendante de l'alimentation, qui lierait de manière plus spécifique les modulations du sommeil lent et du sommeil paradoxal à celles des métabolismes énergétique et protéique, est suggérée par certaines études mais mérite d'être clairement établie et éventuellement quantifiée.

Nous avons essayé de mieux comprendre ces mécanismes en tirant de notre hypothèse de travail des prédictions que nous avons cherché à vérifier.

2.2.2 Les prédictions

Comme nous venons de l'expliquer, nous pensons que les apports alimentaires ne sont pas passivement pris en charge par les différentes voies du métabolisme périphérique, mais qu'ils sont à l'origine de messages permettant d'induire une modulation de la régulation du métabolisme au niveau central, et ce, entre autre, par la modulation de la quantité de sommeil et de sa répartition entre SOL et SP. Les différents indices que nous avons trouvés dans la littérature nous ont conduits à penser que le sommeil lent était préférentiellement impliqué dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique alors que d'un autre côté le sommeil paradoxal était lui plus particulièrement impliqué dans la régulation du métabolisme protéique. Cela nous a incité à formuler les prédictions suivantes :

- une manipulation de l'apport protéino-énergétique du régime alimentaire destinée à provoquer des changements majeurs dans le métabolisme glucido-lipidique devrait entraîner de grandes modifications du sommeil, et plus particulièrement de la durée totale ou relative de sommeil lent.
- une manipulation de l'apport protéino-énergétique du régime alimentaire destinée à provoquer des changements majeurs dans le métabolisme protéique devrait entraîner de grandes modifications du sommeil, et plus particulièrement de la durée totale ou relative de sommeil paradoxal.

2.2.3 La construction des modèles expérimentaux de modification de l'apport protéino-énergétique

Nous avons donc mis en place des modèles de perturbations du régime alimentaire général, par la variation de l'apport protéino-énergétique, nous permettant d'aboutir à de grandes modifications métaboliques contrôlées, soit glucido-lipidiques, soit protéiques. Ces procédures ont toutes été appliquées au même modèle animal : le rat mâle Wistar.

2.2.3.1 Un modèle de restriction-réalimentation énergétique destiné à moduler spécifiquement l'accrétion de masse grasse, donc le métabolisme glucido-lipidique

Il est maintenant bien établi qu'une restriction alimentaire totale conduit à la mobilisation des réserves énergétiques disponibles, et en premier lieu celle des réserves lipidiques stockées dans les tissus adipeux. A l'issue d'une restriction alimentaire, il a été montré chez le rat qu'une réalimentation permet de restaurer les réserves énergétiques préalablement épuisées, mais qu'une réalimentation contrôlée, c'est à dire limitant l'énergie ingérée, permet de restaurer plus spécifiquement les réserves lipidiques au détriment de la croissance de masse maigre (31, 32).

Nous avons donc décidé d'appliquer une stratégie d'alimentation composée de 4 jours de privation totale de nourriture, suivie pendant 6 jours d'une réalimentation avec le même régime standard d'entretien que nous avons utilisé avant la phase de restriction (ou P14, voir Annexe 1), mais seulement à hauteur de 80% de l'énergie nécessaire pour les rats en situation normale.

Grâce à ce modèle que nous avons appelé « restriction-réalimentation énergétique », nous espérons obtenir, pendant la réalimentation, une phase métabolique tournée vers l'accrétion spécifique de tissus adipeux, donc privilégiant l'anabolisme glucido-lipidique.

2.2.3.2 Un modèle de restriction-réalimentation protéique destiné à moduler spécifiquement l'accrétion de masse maigre, donc le métabolisme protéique

Plusieurs études ont montré qu'une restriction protéique induite par une alimentation sur régime hypo-protéique de longue durée entraîne chez le rat un profil de croissance ralenti, essentiellement en ce qui concerne la croissance de la masse maigre, alors que la croissance de la masse grasse reste forte. Les rats acquièrent un profil du type « petit obèse » caractérisé par une forte adiposité (rapport de masse grasse sur masse maigre) et un déficit de masse maigre (48). D'autre part, il a été montré qu'une alimentation hyper-protéique entraîne chez le rat un maintien de la croissance de la masse maigre avec un ralentissement de la croissance de la masse grasse. Cela nous a conduit à penser qu'une réalimentation protéique avec un régime hyper-protéique chez le rat en situation de restriction protéique pourrait permettre de rétablir le déséquilibre en restaurant la masse maigre au détriment de la masse grasse (92).

Nous avons donc décidé d'appliquer une stratégie d'alimentation composée de 3 semaines de restriction protéique avec un régime hypo-protéique (ou P5, voir Annexe 1), suivi de 6 jours de réalimentation avec un régime hyper-protéique (ou P35, voir Annexe 1).

Grâce à ce modèle, nous espérons obtenir, pendant la réalimentation, une phase métabolique tournée vers l'accrétion de tissus maigres (et surtout des muscles), donc vers l'anabolisme protéique.

2.2.4 Les études réalisées

Dans un premier temps, notre travail a été d'étudier la validité de nos prédictions, en analysant les variations de sommeil obtenues lors des différentes phases d'orientations métaboliques provoquées par le jeu sur la composition de l'apport protéino-énergétique. Cela nous a permis de mieux appréhender la nature de la relation qui semble exister entre la qualité du sommeil et l'alimentation. Nous le présenterons sous la forme de l'article que nous avons publié sur cette question.

Dans un deuxième temps, les résultats que nous avons obtenus nous ont conduit à aller étudier de plus près, dans ces modèles, la nature de la coordination entre les modulations métaboliques et les variations dans la composition du sommeil.

Nous verrons que les résultats obtenus confirment nos prédictions et semblent donc tout à fait cohérents avec notre postulat de départ, même s'ils font apparaître des phénomènes plus complexes que ceux du type :« le Sommeil Paradoxal module les synthèses protéiques », et « le Sommeil Lent module les synthèses glucido-lipidiques ». Par là même, ils constituent une étape de plus vers l'explicitation des mécanismes exacts qui lient l'apport protéino-énergétique, le sommeil et ses différents stades, et le métabolisme périphérique.

Les enjeux d'une telle approche sont nombreux. A un premier niveau, ils résident dans l'intérêt de caractériser plus précisément l'influence que l'alimentation peut avoir sur le sommeil. A un niveau plus élevé, on peut y voir la recherche d'une meilleure compréhension des relations qu'entretiennent métabolisme et sommeil ; autrement dit une piste pour comprendre la régulation du sommeil et le rôle qu'il occupe dans l'organisme.

2.3 Première phase de travail : la modification de l'apport protéino-énergétique peut induire chez le rat des changements relatifs de sommeil lent et de sommeil paradoxal corrélés à l'évolution des compositions corporelles en masse grasse et en masse maigre.

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans la revue Behavioral Brain Research en 2005 (voir Article 1 à la fin de la Partie).

2.3.1 Résumé de l'étude

Dans cette première phase expérimentale, nous avons soumis les rats à nos deux modèles de modifications de l'apport protéino-énergétique : la restriction-réalimentation énergétique ou la restriction-réalimentation protéique. Les modifications obtenues sur le métabolisme ont été validées par étude de la composition corporelle des animaux sur l'ensemble de chaque période de restriction ou de réalimentation. Ils correspondent sensiblement à nos attentes :

- restriction-réalimentation énergétique : la procédure de restriction a principalement modifié la masse grasse, seul compartiment dont le poids relatif a diminué significativement. La réalimentation a entraîné, elle, une augmentation spécifique de masse grasse puisque c'est le seul compartiment dont le poids relatif a augmenté significativement. Toutefois, la masse maigre a elle aussi subi, en valeur absolue, des changements assez importants (pertes puis restauration). La réalimentation énergétique a finalement été une phase marquée par une restauration globale des réserves utilisées (dont les tissus maigres), avec une priorité donnée à l'accrétion de tissus adipeux, cependant moins forte que ce que nous attendions.
- restriction-réalimentation protéique : la restriction protéique induit une perte spécifique de masse maigre (peau, carcasse) et une augmentation du poids relatif de la masse grasse. La réalimentation protéique a bien induit, conformément à nos attentes, une réplétion des tissus maigres et une diminution relative du poids de la masse grasse.

Nous pouvons donc déduire de l'analyse de la composition corporelle des animaux que nous avons bien obtenu, au cours des périodes de réalimentation, grâce à nos modèles expérimentaux, une phase métabolique tournée soit vers l'augmentation générale des synthèses avec une accrétion plus spécifique de tissus adipeux, soit vers l'accrétion spécifique de tissus maigres aux dépens de la masse grasse.

Dans le cadre de ces modèles de restriction-réalimentation, nous avons pu suivre, à l'aide d'une procédure d'étude du sommeil par l'acquisition puis le traitement du signal EEG (voir Annexe 2), l'évolution de la quantité de sommeil, ainsi que la répartition entre sommeil lent et sommeil paradoxal au cours des différentes périodes. Cette procédure, qui a en grande partie été mise en place et validée au laboratoire à l'occasion de nos propres travaux, inclut notamment une méthode originale d'analyse automatique du signal EEG, qui permet à la fois d'accélérer et d'homogénéiser la discrimination des différents stades de la vigilance tels que l'éveil, le SOL et le SP. Alors que les animaux ont été soumis à un cycle jour-nuit avec début de la phase lumineuse, celle où les rats dorment, à 6h00, le sommeil a été analysé tous les jours d'étude de 10h00 à 18h00, ce qui est supposé avoir permis de couvrir la plus grande partie du sommeil journalier.

Dans un premier temps, les résultats obtenus nous ont permis de confirmer que le sommeil dépend d'un apport énergétique suffisant. En effet, la restriction énergétique a induit une perte de sommeil importante, tant pour le sommeil lent que pour le sommeil paradoxal, alors que pendant la réalimentation énergétique, on a observé une restauration du sommeil.

D'autre part, nos résultats sur les phases de réalimentation ont permis d'éclairer de manière originale la relation qualitative qui semble exister entre le sommeil, l'apport protéino-énergétique et le métabolisme :

- Pendant la phase de réalimentation énergétique, qui a entraîné le métabolisme vers l'augmentation des synthèses et une accrétion plus spécifique de tissus adipeux, la restauration progressive de sommeil a privilégié, de manière transitoire, (au premier jour de réalimentation) le sommeil lent.
- Pendant la phase de réalimentation protéique, qui a entraîné le métabolisme vers une accrétion spécifique de tissus maigres, on a observé de manière également transitoire (au premier jour de réalimentation) une augmentation spécifique de sommeil paradoxal.

2.3.2 Conclusions de l'étude

2.3.2.1 Retour sur les prédictions de départ : des résultats cohérents avec notre hypothèse de travail

Ces résultats ont confirmé nos prédictions sur l'existence d'une relation entre le sommeil et sa composition (SP/SOL) et la régulation du métabolisme énergétique induite par la modulation de l'apport protéino-énergétique. Pour la première fois, nous montrons que des changements de l'alimentation peuvent influencer le sommeil non seulement de manière quantitative, mais aussi de manière qualitative, et ce dans un sens qui reflète l'orientation du métabolisme global dans des processus qui altèrent soit les réserves adipeuses, soit les réserves de protéines. Ainsi, dans nos contextes où le métabolisme est en phase de récupération à la suite d'une malnutrition énergétique ou protéique, l'évolution précoce du rapport SP/SOL apparaît comme un marqueur prédictif inversement corrélé à l'évolution de l'adiposité, aussi bien dans un sens que dans l'autre.

Nos résultats indiquent également plus précisément, comme nous en avons fait l'hypothèse, l'existence d'un lien spécifique entre le SOL et métabolisme énergétique (général mais en particulier glucido-lipidique), et d'un lien spécifique entre le SP et métabolisme protéique. En effet l'augmentation des masses tissulaires et l'accrétion particulière de tissus adipeux lors de la réalimentation énergétique est le signe d'une modulation du métabolisme vers l'augmentation de l'anabolisme et/ou la diminution du catabolisme. De même l'accrétion spécifique de tissus maigres lors de la réalimentation protéique est le signe d'une modulation du métabolisme protéique vers l'augmentation de l'anabolisme et/ou la diminution du catabolisme. Il paraît toutefois difficile de relier directement et de manière quantitative les durées absolues de SOL et de SP, les quantités de protéines ou de calories apportées, et le taux d'activité de telle ou telle voie métabolique.

Le fait que les modifications de la composition du sommeil soient observées uniquement de manière transitoire, au passage de la restriction vers la réalimentation, nous conduit plutôt à penser, en accord avec notre postulat, que l'évolution différentielle du sommeil lent et du sommeil paradoxal pourrait constituer une sorte d'impulsion permettant de changer les orientations du métabolisme périphérique en réponse aux modifications de l'apport

alimentaire. Elles se produisent ainsi probablement au moment où les modifications des orientations métaboliques sont les plus fortes.

2.3.2.2 Des limites qui appellent à une analyse plus détaillée des changements métaboliques obtenus en début de réalimentation

Cependant, les critères d'étude du métabolisme que nous avons utilisés ne nous donnent pas d'autres indications sur l'évolution du métabolisme que des caractéristiques globales, sur l'ensemble des périodes de réalimentation. Or les principales modifications du sommeil se situent au premier jour des réalimentations. Le fait que les données sur le sommeil et sur le métabolisme que nous obtenons ne se situent pas à la même échelle temporelle constitue donc un frein à l'interprétation de nos résultats et à l'établissement de leur cohérence avec notre hypothèse de travail. Nous avons ainsi décidé d'étudier plus précisément les modulations du métabolisme à la fin des périodes de restriction et au début des périodes de réalimentation pour mieux comprendre d'où peuvent venir les corrélations entre le métabolisme et l'évolution du sommeil que nous observons.

Que se passe-t-il précisément en terme de changements métaboliques au cours des premières heures du passage de l'état de restriction énergétique ou protéique vers le stade de réalimentation énergétique et protéique, là où le sommeil est soumis à ses principales modifications ? A-t-on bien, d'une part une relation entre le métabolisme qui s'oriente vers la synthèse en général dans le cadre d'une restauration des réserves énergétiques et l'augmentation spécifique du SOL, et d'autre part une relation entre le métabolisme qui s'oriente vers la synthèse protéique, et une augmentation spécifique de SP ? Peut-on mettre en évidence des variations à court-terme de l'orientation du métabolisme qui coïncident avec les changements observés des stades de vigilance ?

2.4 Deuxième phase de travail : étude des relations temporelles entre métabolisme et sommeil au premier jour des phases de réalimentation énergétique ou protéique.

2.4.1 Introduction

Pour répondre aux questions ouvertes par l'étude précédente, la mesure de la dépense énergétique par calorimétrie indirecte (oxydations glucidiques et lipidiques) (voir Annexe 3) et le dosage de l'azote excrété (oxydations protéiques) nous ont permis de suivre les évolutions précises du métabolisme énergétique et protéique des animaux dans nos deux modèles expérimentaux. Cette étude a été réalisée au cours des phases de transition que constituent le dernier jour de la période de restriction et le premier jour de la période de réalimentation, au cours des mêmes fenêtres temporelles que les enregistrements de sommeil. Elle nous a permis de connaître, heure par heure, les changements métaboliques obtenus. Nous avons ainsi pu vérifier leur cohérence avec les changements de composition corporelle à plus long terme, et vérifier s'ils coïncident avec les principales modifications observées sur les stades de la vigilance, qui ont également lieu pendant ces deux jours.

2.4.2 Résultats

2.4.2.1 Modulations métaboliques au cours du premier jour de la réalimentation énergétique

2.4.2.1.1 Modulations du métabolisme protéique

A la fin de la période de 4 jours de restriction alimentaire totale, les animaux sont en bilan protéique négatif bien que les taux d'oxydation protéique soient très réduits (0.18 mg/min pour une valeur moyenne d'environ 1 mg/min chez un animal nourri). La réalimentation

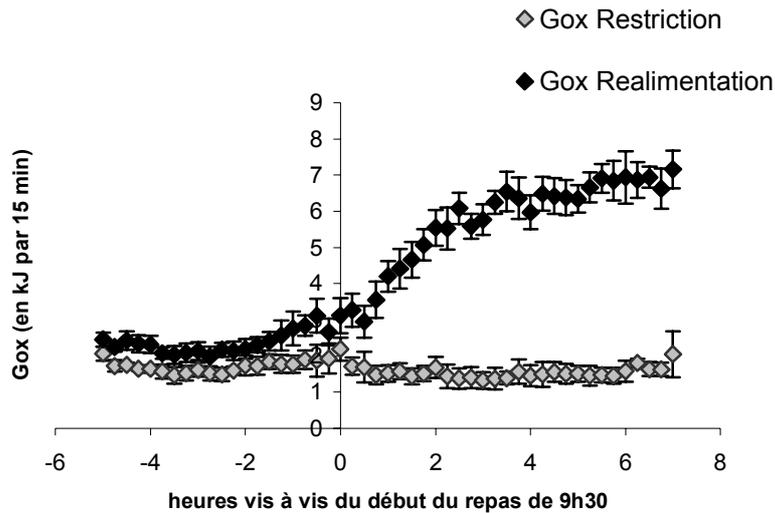


Figure 8 : Participation des oxydations glucidiques au métabolisme de repos (Gox) avant et pendant le jour 1 de la réalimentation énergétique.*

Gox REST : données obtenues avant et pendant le dernier jour de restriction (sans repas) ; Gox REAL données obtenues avant et pendant le premier repas de réalimentation énergétique.

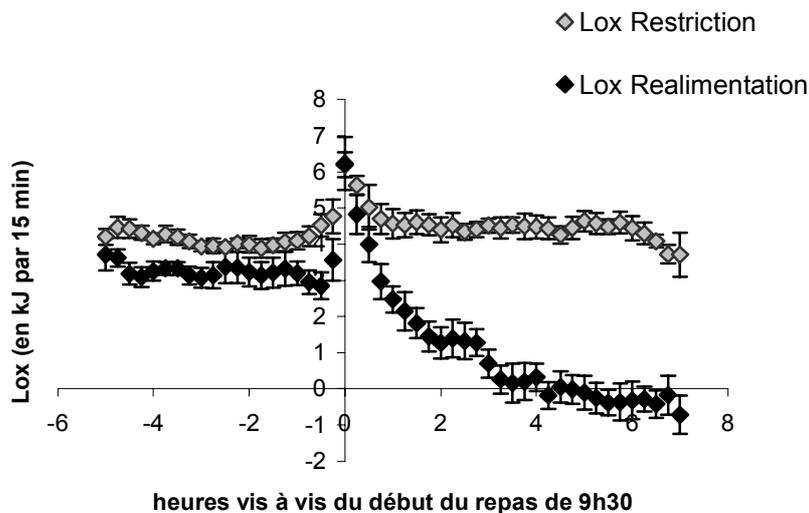


Figure 9 : Participation des oxydations lipidiques au métabolisme de repos (Lox) avant et pendant le jour 1 de la réalimentation énergétique.*

Lox REST : données obtenues avant et pendant le dernier jour de restriction (sans repas) ; Lox REAL données obtenues avant et pendant le premier repas de réalimentation énergétique.

* Le métabolisme de repos est calculé par application du filtrage de Kalman au métabolisme total pour en soustraire la dépense énergétique liée à l'activité.

n'augmente que très marginalement les taux d'oxydation protéique (variation non significative), indiquant que la quasi totalité des acides aminés apportés par la réalimentation sont préservés et entrent donc dans les synthèses protéiques. Les estimations des oxydations protéiques et des mises en réserves de protéines avant et après le premier repas de réalimentation (donné à 9h30) sont exposées dans le tableau 1.

période	estimation de la quantité de protéine catabolisée (mg)	quantité de protéine ingérée (mg)	estimation de la quantité de protéine mise en réserve (mg)
REST J3 (18h-9h30)	135.1	0	-135.1
REST J4 (9h30-17h)	102.5	0	-102.5
REST J4 (18h-9h30)	150.6	0	-150.6
REAL J1 (9h30-17h)	137.0	1120	983.0

Tableau 1 : Estimations des quantités de protéine oxydées et mises en réserves au cours des différentes périodes.

Avec REST J3 pour le troisième jour de restriction, REST J4 pour le quatrième jour de restriction, et REAL J1 pour le premier jour de réalimentation énergétique. Les données présentées sont des moyennes (n=8) pour une quantité de protéine obtenue par multiplication par un facteur 6.25 de la quantité d'azote excrétée dans les urines.

2.4.2.1.2 Modulations du métabolisme glucido-lipidique

A la fin de la restriction, les lipides sont le substrat énergétique prépondérant, mais on observe, malgré la durée du jeûne, une oxydation glucidique qui reste importante et difficile à comprendre si on admet que les réserves de glycogène sont normalement épuisées en 24 heures. La réalimentation marque une augmentation très importante de l'oxydation glucidique, alors que l'évolution au cours du temps du taux d'oxydation des lipides montre une décroissance très rapide : elle est inhibée en 4 heures puis passe en négatif. Les estimations des oxydations glucidiques et lipidiques en fin de restriction et en début de réalimentation sont présentées sur les figures 8 et 9.

Ainsi, le premier jour de la réalimentation se caractérise par une orientation intense et rapide du métabolisme vers la restauration des réserves énergétiques lipidiques. La baisse de l'oxydation lipidique et le fait qu'elle devienne progressivement négative signifie non

seulement que les lipides sont très peu oxydés et donc stockés, mais encore que les animaux sont susceptibles d'utiliser une partie de leur glucose pour refaire des lipides (lipogenèse de novo, $Lox < 0$).

2.4.2.2 Modulations métaboliques au cours du premier jour de la réalimentation protéique

2.4.2.2.1 Modulations du métabolisme protéique

A la fin de la période de restriction protéique de 24 jours, le métabolisme est orienté vers une situation d'économie de protéine mise en évidence par des taux d'oxydation protéique très faibles (~ 0.1 mg/min). Cela permet un bilan protéique global faiblement positif. La restauration d'un niveau d'apport protéique élevé au moment de la réalimentation n'entraîne qu'une augmentation marginale du taux d'oxydation protéique, ce qui traduit la mise en réserve de la quasi totalité des acides aminés apportés par le repas. Les estimations des oxydations protéiques et des mises en réserves de protéines avant et après le premier repas de réalimentation (donné à 9h30) sont exposées dans le tableau 2.

période	estimation de la quantité de protéine catabolisée (mg)	quantité de protéine ingérée (mg)	estimation de le quantité de protéine mise en réserve (mg)
P5 J23 (18h-9h30)	60.1	650	589.9
P5 J24 (9h30-17h)	30.2	500	469.8
P5 J24 (18h-9h30)	85.0	650	565.0
P35 J1 (9h30-17h)	46.9	3400	3353.1

Tableau 2 : Estimations des quantités de protéine oxydées et mises en réserves au cours des différentes périodes dans la restriction-réalimentation protéique.

Avec P5 J23 pour l'avant dernier jour de restriction, P5 J24 pour le dernier jour de restriction, et P35 J1 pour le premier jour de réalimentation protéique. Les données présentées sont des moyennes ($n=8$) pour une quantité de protéine obtenue par multiplication par un facteur 6.25 de la quantité d'azote excrétée dans les urines.

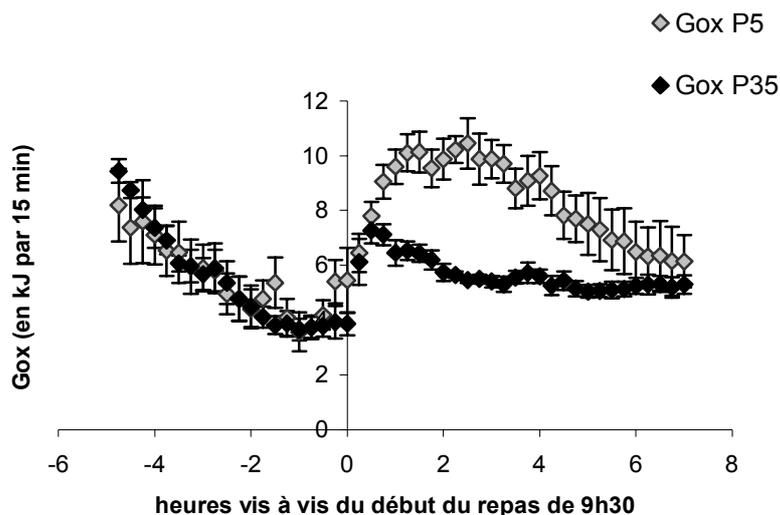


Figure 10 : Participation des oxydations glucidiques au métabolisme de repos (Gox) avant et pendant le jour 1 de la réalimentation protéique.*

Gox P5 : données obtenues avant et pendant le dernier jour de restriction protéique à P5 ; Gox P35 : données obtenues avant et pendant le premier repas de réalimentation protéique à P35.

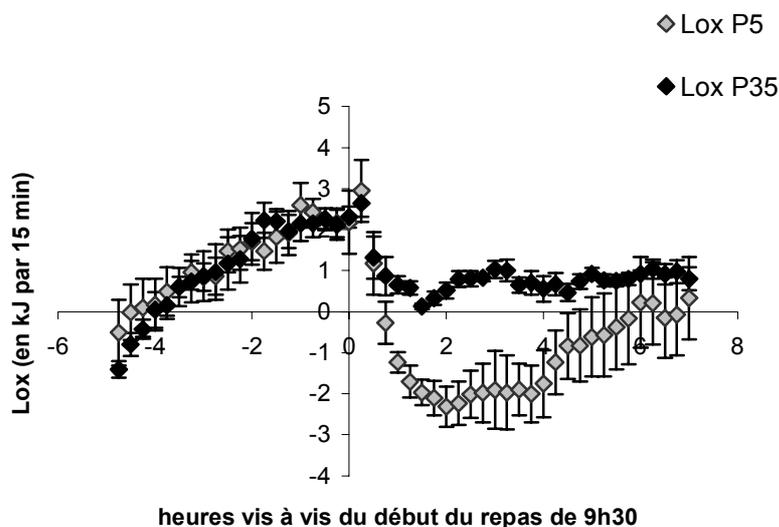


Figure 11 : Participation des oxydations lipidiques au métabolisme de repos (Lox) avant et pendant le jour 1 de la réalimentation protéique.*

Lox P5 : données obtenues avant et pendant le dernier jour de restriction protéique à P5 ; Lox P35 : données obtenues avant et pendant le premier repas de réalimentation protéique à P35.

* Le métabolisme de repos est calculé par application du filtrage de Kalman au métabolisme total pour en soustraire la dépense énergétique liée à l'activité.

2.4.2.2.2 Modulations du métabolisme glucido-lipidique

L'apport relatif important en glucides et lipides au cours du régime hypoprotéique imposait une mise en réserve importante des lipides et des glucides alimentaires conduisant à une période de lipogenèse intense pendant 4 à 5 heures après le repas, comme le traduisent les valeurs fortement négatives d'oxydations lipidiques suite au repas hypoprotéique. Le jour de la réalimentation, la réduction relative des apports glucido-lipidiques au profit des protéines permet de maintenir le niveau post-prandial d'oxydation lipidique à des niveaux positifs tandis que l'oxydation des glucides est elle aussi plus faible que sous régime déficient en protéine. Les estimations des oxydations glucidiques et lipidiques en fin de restriction et en début de réalimentation sont présentées sur les figures 10 et 11.

Le bilan énergétique global de ces modifications se traduit ainsi par une diminution importante de l'effet thermique du repas, probablement en partie lié à la disparition du coût de la lipogenèse de novo qui n'est pas contrebalancé par le coût de la synthèse protéique. En résumé, dans les heures qui suivent la réalimentation protéique, après un délai correspondant selon toute vraisemblance à une phase céphalique, le métabolisme est modifié vers la synthèse protéique et la remobilisation des réserves lipidiques accumulées au cours de la restriction protéique.

2.4.3 Conclusion : bilan et mise en perspective des résultats sur les modulations du métabolisme avec les données obtenues sur le sommeil

2.4.3.1 Confirmation des conclusions de l'étude précédente

La première conclusion tient dans le constat des importantes modifications métaboliques qui ont lieu dès le premier repas de réalimentation énergétique ou protéique par rapport à l'état de restriction mesuré la veille. La transition de la restriction vers la réalimentation entraîne ainsi rapidement des changements profonds du métabolisme et très probablement de sa régulation.

La deuxième conclusion est que ces changements précoces dans l'organisation et l'allure du métabolisme, correspondent exactement à ce qu'on peut observer par l'analyse des

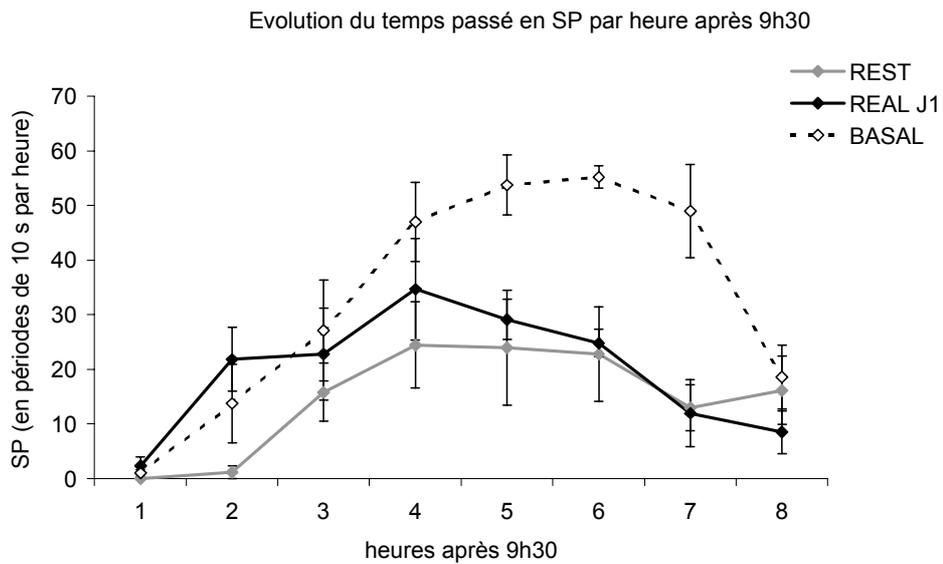
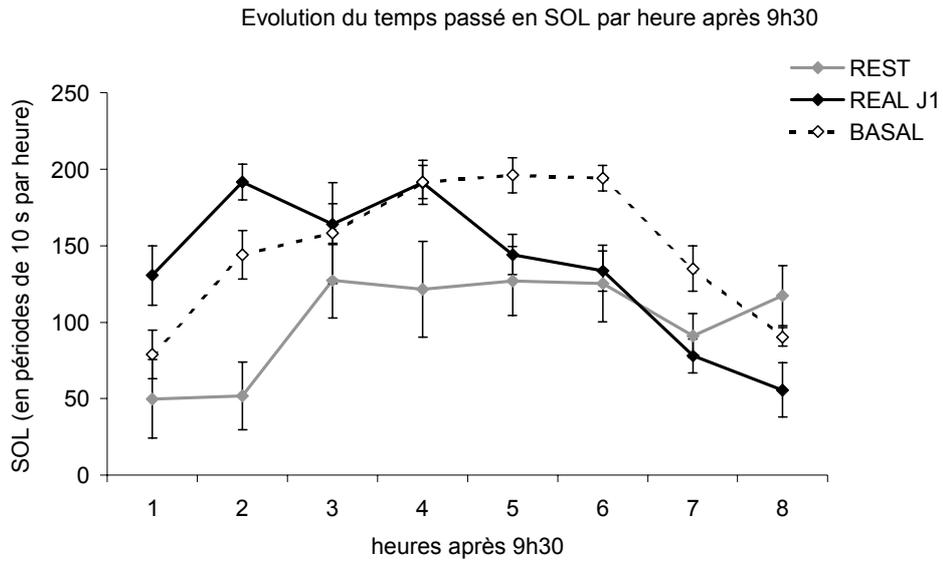


Figure 12 : Evolution du temps passé en SOL et du temps passé en SP après 9h30 (heure du repas), par tranche de 1h. Protocole de restriction-réalimentation énergétique

BASAL pour les rats nourris avec un régime standard ; REST pour le dernier jour de la restriction énergétique ; REAL J1 pour le jour1 de la réalimentation énergétique.

compositions corporelles sur l'ensemble des phases de réalimentation, pour nos deux modèles : dans un cas, une restauration des réserves lipidiques (avec une orientation du métabolisme glucido-lipidique vers la synthèse de lipides) mais aussi dans une certaine mesure des tissus protéiques préalablement utilisés; dans l'autre, une orientation vers la synthèse protéique et vers la mobilisation des réserves lipidiques (avec une orientation du métabolisme glucido-lipidique vers l'oxydation lipidique).

Cette étude nous permet donc de confirmer la validité de nos prédictions puisque nous avons pu mettre en évidence une relation temporelle étroite entre l'orientation du métabolisme et l'évolution des stades de vigilance : d'une part anabolisme lipidique et augmentation spécifique du SOL, d'autre part synthèse protéique, catabolisme lipidique et augmentation spécifique de SP.

2.4.3.2 Mise en relation des données sur le métabolisme avec les données heure par heure obtenues sur le sommeil.

La mise en perspective de nos résultats sur le métabolisme avec les données obtenues sur le sommeil pendant ces mêmes périodes offre de précieux renseignements.

2.4.3.2.1 Restriction-réalimentation énergétique

Nous avons déjà vu que dans le modèle de restriction-réalimentation énergétique, les principales variations dans la quantité de sommeil et sa composition induites par la réalimentation ont lieu au premier jour, avec un rebond spécifique du SOL par rapport au SP. Nous avons représenté les données obtenues sur le sommeil avant et après la réalimentation sur la figure 12.

L'analyse détaillée de la durée du sommeil au cours du temps montre que ce rebond spécifique du Sommeil lent se joue justement dans les premières heures de la réalimentation, dans la même période où le métabolisme énergétique se réoriente vers les processus de restauration des réserves lipidiques.

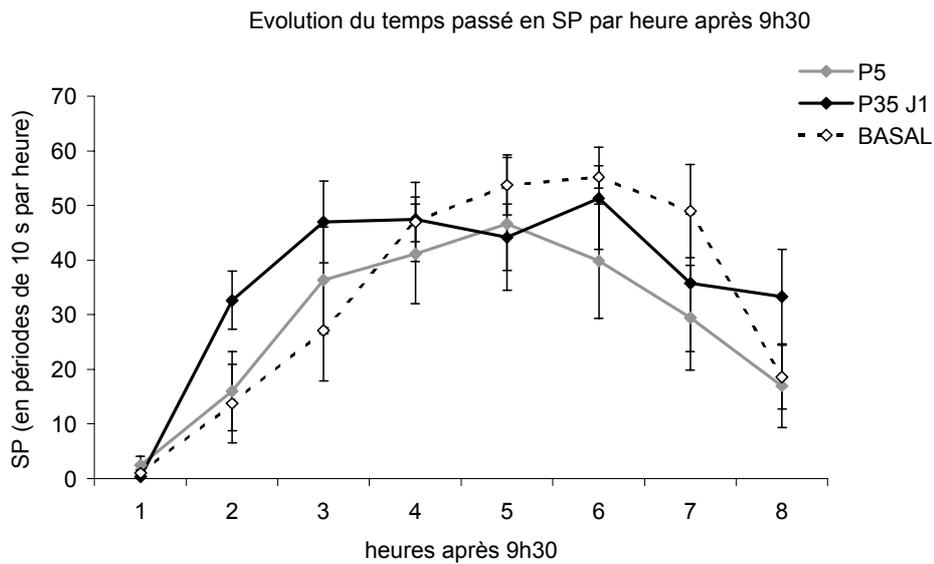
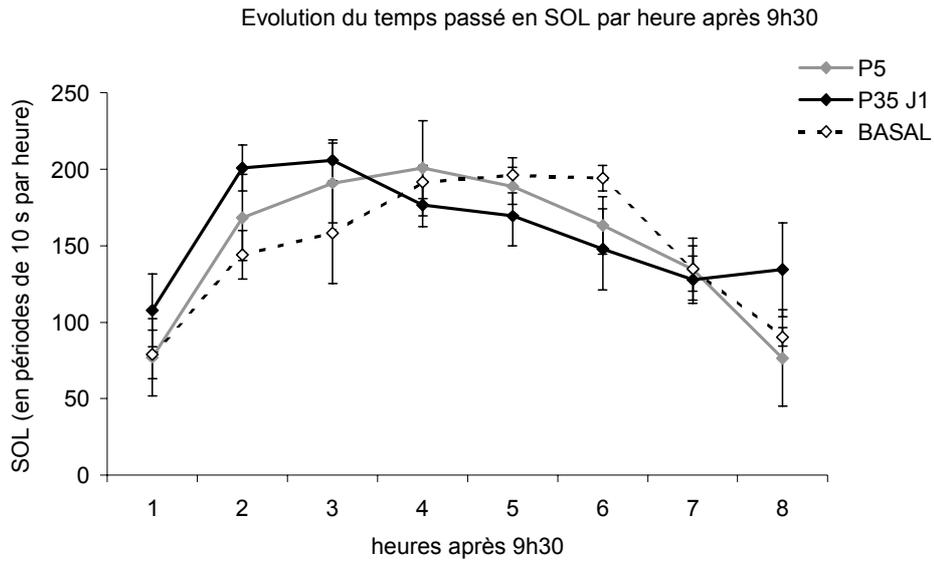


Figure 13 : Evolution du temps passé en SOL et du temps passé en SP après 9h30 (heure du repas), par tranche de 1h. Protocole de restriction-réalimentation protéique

BASAL pour la situation des rats nourris avec un régime standard ; P5 pour le dernier jour de la restriction protéique ; P35 J1 pour le jour1 de la réalimentation protéique.

2.4.3.2.2 Restriction-réalimentation protéique

Dans le modèle de restriction-réalimentation protéique, c'est aussi au jour 1 de la réalimentation protéique que les variations dans la quantité de sommeil et sa composition sont les plus importantes, avec un rebond spécifique du SP par rapport au SOL. Nous avons représenté les données obtenues sur le sommeil avant et après la réalimentation sur la figure 13.

L'analyse détaillée de l'organisation du sommeil au cours du temps montre que ce rebond spécifique du Sommeil Paradoxal se joue justement dans les premières heures au cours desquelles l'oxydation des lipides est maintenue positive tandis que la synthèse protéique est probablement la plus intense.

2.5 Conclusion et perspectives

La comparaison des données sur l'évolution du sommeil et du métabolisme sous l'influence de l'apport protéino-énergétique dans nos modèles expérimentaux met en évidence une coordination très précise de leurs modifications, conformément aux prédictions de l'hypothèse de travail sur l'existence de relations étroites entre l'intensité et la qualité du métabolisme et la durée et la qualité des stades de vigilance, ce qui valide les principes de base de cette hypothèse. Il est ainsi possible d'interpréter nos résultats comme le témoignage de liens (1) entre l'augmentation spécifique de SOL et l'engagement privilégié du métabolisme périphérique vers les voies de la synthèse et de l'accrétion lipidique, (2) entre l'augmentation spécifique de SP et l'engagement privilégié du métabolisme périphérique vers les voies de la synthèse et de l'accrétion protéique.

Cependant, même si les travaux réalisés ici permettent de mieux comprendre la nature du lien entre les modifications du sommeil, le métabolisme et l'apport alimentaire, les principes de fonctionnement de ce lien restent inconnus. Il est clair que l'ensemble des variations est induit par l'apport alimentaire, mais les relations de cause à effet entre les régulations du sommeil et les régulations métaboliques restent à démontrer. Si tout porte à croire que les modifications du métabolisme et du sommeil au cours des heures qui suivent la réalimentation protéique ou énergétique sont l'expression d'une même réponse centrale, beaucoup reste à faire pour pouvoir montrer comment elle est élaborée : les changements observés se produisent-ils en parallèle et de manière indépendante ou bien, comme le propose notre postulat, les changements métaboliques dépendent-ils du développement préalable d'un pattern spécifique au niveau des stades de vigilance ? Pour déterminer, par exemple, une relation causale entre le sommeil et le métabolisme énergétique, il faut pouvoir mettre en évidence que des modifications spécifiques se produisent au cours du sommeil et de ses différentes phases, au niveau central ou périphérique, et que ces modifications sont propres à modifier le métabolisme énergétique.

Or, le deuxième grand mérite et l'originalité de nos modèles expérimentaux de modification de l'apport protéino-énergétique et de nos résultats est d'avoir pu mettre en évidence le phénomène de corrélation entre modifications orientées du métabolisme et modifications de la composition du sommeil dans un temps relativement court, durant les premières heures qui suivent la réalimentation énergétique ou protéique. Ceci nous donne la possibilité d'aller

étudier de manière très précise les mécanismes mis en œuvre, et notamment les liens de cause à effet entre le sommeil et ses différentes phases, et le métabolisme. L'un des grands regrets de ce travail de thèse est de ne pas avoir pu explorer les potentialités ouvertes par nos premiers travaux pour répondre à cette question, par les pistes que nous proposerons ici.

Il serait ainsi tout d'abord très précieux d'améliorer encore notre capacité analytique sur nos modèles expérimentaux par la réalisation de mesures complémentaires précisant l'intensité des synthèses protéiques, en continu, au cours des différentes phases et notamment au premier jour de la réalimentation. On pourrait envisager d'utiliser des molécules traceuses pour quantifier le marquage obtenu dans les différents tissus et pour mesurer directement les taux de synthèse protéique au moment voulu. Nous pourrions alors envisager des mesures à très court terme du métabolisme énergétique et protéique, tout en enregistrant l'activité EEG afin d'étudier l'évolution exacte du métabolisme en fonction des différentes phases de sommeil, et cela dans les situations très orientées que nous créons pendant la transition entre restriction et réalimentation.

Pour déterminer et approfondir d'éventuels liens de cause à effet entre métabolisme et sommeil, dans ce cadre, différents types d'expériences peuvent être envisagées. D'une part, on pourrait étudier les conséquences de l'utilisation de molécules inhibant les voies des synthèses ou des oxydations protéiques ou lipidiques sur les modifications du sommeil normalement observées (7, 46, 73). On pourrait également envisager au cours de la réalimentation des privations spécifiques de sommeil total ou de sommeil paradoxal. Cette dernière procédure pourrait être réalisée de façon douce au cours des premières heures de la réalimentation en manipulant les rats dès l'apparition de SOL ou de SP (101).

Une première piste d'investigation des mécanismes centraux à l'origine de cette relation pourrait venir de l'étude de l'activité de différentes zones cérébrales impliquées dans les mécanismes de régulation du sommeil et du métabolisme énergétique, en fonction des différentes phases de sommeil et des différents types de réalimentation ou encore, selon qu'on aura laissé dormir les rats ou non. On peut imaginer découvrir des différences d'activité, en fonction des stades de sommeil, de leur absence ou de leur présence, dans des zones connues pour être impliquées dans la régulation du métabolisme, par exemple par marquage immunohistochimique de la protéine FOS (exprimée par c-fos, un gène précoce, marqueur de l'activation neuronale) ou encore par l'enregistrement EEG à partir d'électrodes profondes placées dans ces structures.

Article 1 : Restriction-refeeding of calories and protein induces changes to slow-wave and paradoxical sleep that parallel changes in body lipid and protein levels in rats.

Research report

Restriction-refeeding of calories and protein induces changes to slow wave and paradoxical sleep that parallel changes in body lipid and protein levels in rats

Benjamin Guesdon^{*}, Julie Minet-Ringet, Daniel G. Tomé, Patrick C. Even

UMR INRA 914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France

Received 8 June 2005; accepted 10 June 2005
Available online 1 August 2005

Abstract

Recent data have suggested that the activity of various brain nuclei is modulated during sleep. In this context, we developed the idea that sleep may participate in adapting brain responsiveness to feeding, so as to tune the control of peripheral energy metabolism. In order to characterize the nature of a possible link between sleep and peripheral energy metabolism, we have investigated the relationship between sleep parameters [wakefulness (W), slow wave sleep (SWS), paradoxical sleep (PS)] and the intensity of peripheral lipid and protein deposition processes. To achieve this, by manipulating the amount and quality of food available to rats, we induced states of energy or protein depletion/repletion which would specifically affect lean or fat body mass, which was quantified by an analysis of body composition. In parallel, using a permanently implanted cortical electrode, we measured electroencephalogram signals (EEG) to quantify the time spent in W, SWS and PS. Analysis of EEG changes in relation to the changes induced in body composition, showed that (1) the amount of sleep (PS and SWS) followed the evolution of energy supply levels, and (2) the time spent in PS relative to SWS varied to a considerable degree (14–23.5%) and followed the same trend as the ratio of lean body mass to fat mass. These results suggest the possible existence of quantitative and qualitative interactions between sleep quality and the anabolic and catabolic processes of peripheral fat and protein deposition.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Sleep; Peripheral energy metabolism; Body composition; Fasting; Refeeding

1. Introduction

It is now acknowledged that the regulation of arousal and sleep–wake cycles results from interactions between different neuronal networks. Sleep itself is actively generated by the interplay of several neuronal populations using different transmitters: Non-REM sleep (or slow wave sleep, SWS) is generated by neurons in the basal forebrain and medulla interacting with neurons in the midbrain and diencephalon, whereas REM sleep (or paradoxical sleep, PS) is generated by neurons in the caudal midbrain and pons, interacting with neurons in the medulla and forebrain [30].

Although enormous strides have been achieved in our understanding of how sleep occurs in humans and other animals, and in spite of indications of vital functional importance, there is no widespread agreement on why sleep is important. A number of theories have of course been put forward, but they have been challenged by contrary evidence or have been proved not to be generally applicable. Nevertheless, it is now acknowledged that sleep is a period during which numerous processes occur in the brain that converge to re-initiate or re-calibrate neuronal activities, allowing the sorting, selection and integration of information received during the awakened state [13,17]. This has led some researchers to suggest that sleep may be critically involved in learning and memorisation processes [19]. Although the evidence for this hypothesis appears to be weak and contradictory [29], other suspected functions of sleep, such as its interdependent

^{*} Corresponding author. Tel.: +33 1 44 08 72 49; fax: +33 1 44 08 18 25.
E-mail address: guesdon@inapg.fr (B. Guesdon).

relationship with peripheral energy metabolism, may indeed be relevant.

Although most studies that investigated the physiological function(s) of sleep at a neurological level did not directly take account of feeding behaviour and the regulation of energy metabolism, some authors recorded the activity of nuclei involved in regulating energy balance and showed that their activity could be modified during sleep [23]. Furthermore, several hypothalamic areas (suprachiasmatic nucleus, preoptic area, lateral hypothalamus, ventromedial hypothalamus) have been shown to be implicated in the regulation of both energy metabolism and sleep. The convergence of hypothalamic sites involved in both sleep and the regulation of energy metabolism recently culminated in the discovery of the orexin neuropeptides, produced in the lateral hypothalamus (LH), which are closely involved in the regulation of feeding behaviour, energy metabolism and sleep [26]. The existence of these peptides strongly suggests coordination processes between the behavioural and physiological consequences of these complementary homeostatic functions [32]: for instance, when the orexinergic system is activated, sleep is inhibited but feeding behaviour is activated.

The few authors who, during the last 20 years, have investigated the relationship between sleep, feeding behaviour and energy metabolism, showed that sleep was highly dependent on an appropriate energy supply. They indeed showed that starvation induces dramatic sleep losses in the rat, that develop all the more rapidly as the levels of body energy stores are initially low [1,3,5,16]. On the other hand, sleep (and in particular SWS) was demonstrated to be increased in a context of long-term fasting in geese, where lipids account for more than 90% of energy expenditure [4]. The authors analyzed this phenomenon, with reference to the results in rats, as being related to the larger lipid reserves in geese, their adaptation to fasting periods and as a means of reducing energy expenditure in order to limit the mobilization of fat stores. Thus, when sufficiently large lipid reserves are available (as is the case in geese [4] or VMH-lesioned rats [3]), sleep also appears to be used as an energy conservation mechanism, even in species that do not enter hibernation or torpor. Moreover, it was shown that the inhibition of whole body protein synthesis could selectively decrease paradoxical sleep [6,7], leading us to suspect a particular link between PS and whole body protein metabolism. In addition, other studies showing feeding-induced sleep modulations led to the ischymetric sleep hypothesis [2], i.e. the energy control of sleep by nutrients and more precisely by nutrient metabolism. Because the availability of dietary amino acids has been shown to specifically affect paradoxical sleep [2,18], a link has also been suggested between the quality of nutrient supply and the quality of sleep. These results suggest that metabolic and nutrient factors may act as modulators of sleep, which in turn would be able to act on the central processes responsible for modulating energy reserves and metabolism.

Conversely, it has also been shown that sleep deprivation has lethal consequences on the regulation of energy

metabolism by provoking an hyper-catabolic state under which synthesis processes are inhibited [27,28]. In this case, even a high calorie intake cannot counteract the catabolic processes and prevent the death of the sleep-deprived animal [10–12]. Rebounds of sleep following total sleep deprivation and rebounds of slow wave or paradoxical sleep following selective deprivation of these stages show that the body needs adequate levels of both SWS and PS. During further studies, paradoxical sleep deprivation was shown to be nearly as efficient as total sleep deprivation in provoking hyper-catabolism [24].

When the body is resting, energy metabolism is no longer submitted to the fluctuations which occur during wakefulness, related to activity, stress and other external stimuli. In this context, sleep may be a process that allows the brain to become informed about the energy status of the body, so that energy homeostasis is adjusted as a function of the way in which sleep develops (total sleep duration as well as the ratio of PS to SWS), with SWS and PS being differentially implicated in either energy or protein metabolism. In line with this, our working hypothesis was therefore that SWS would be specifically modified when the organism needed to change its way of regulating global energy homeostasis, whereas PS would be specifically modified when the organism needed to adapt to a change in protein homeostasis. To test this hypothesis, we submitted rats to nutritional challenges which tried to disturb more specifically either overall energy metabolism (depletion and then repletion of body fat) [8,9] or protein metabolism (depletion and then repletion of body protein) [20,31]. In parallel, we recorded sleep patterns in order to quantify the changes to both sleep duration and the PS to SWS ratio as a result of these energy manipulations.

2. Materials and methods

2.1. Experimental diets

Three different semi-synthetic diets, provided by the diet preparation workshop at INRA, Jouy-en-Josas, were used during this study. They contained varying proportions of energy in a protein form. The P14 maintenance diet (P14) contained 14% of protein as energy, whereas the P5 and P35 diets, used as low- and high-protein diets, contained respectively 5 and 35% of protein as energy. All diets were supplemented with minerals, vitamins and fibre in line with AIN-93M requirements [25] and were moistened (mixed with water 1:1) to prevent spillage. The precise composition of these diets and their calorie values are shown in Table 1.

2.2. Animals and surgical procedure

All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609EEC), for care and use of laboratory animals. Male Wistar rats (Dépré, Saint-Doulchard, France), weighing 200–220 g at their arrival, were kept under standard conditions of temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) in a noise-attenuated room lit with an artificial 12 h

Table 1
Diet composition and caloric values

Ingredients	P5		P14		P35	
	g/kg	kcal/kg	g/kg	kcal/kg	g/kg	kcal/kg
Total milk proteins	50	187.4	140	524.6	340	1274.0
Starch	680.5	2497.2	622.4	2288.3	449.5	1652.6
Saccharose	132.2	518.1	100.3	393.1	73.2	286.9
Soya oil	40	376.6	40	378.1	40	378.1
Minerals	35	0.0	35	0.0	35	0.0
Vitamins	10	39.1	10	39.1	10	39.1
Cellulose	50	0.0	50	0.0	50	0.0
Cholin	2.3	0.0	2.3	0.0	2.3	0.0
Total	1000	3618.4	1000	3623.3	1000	3630.8
Caloric value (kJ/g)	15.1		15.2		15.2	

light–dark cycle (lights on at 0700 h) and housed in individual cylindrical cages with an opening at the top to enable EEG recordings [22]. Water was available ad libitum throughout the experimental period. All rats were fed ad libitum with the P14 maintenance diet from the time of their arrival in the laboratory. After adaptation to the laboratory conditions, the rats were implanted with cortical electrodes to enable EEG recordings. To achieve this, they were anaesthetized with a mixture of Ketamine (75 mg/kg, Imalgène 1000) and Xylazine (1 mg/kg, Rompun 1%) and placed on a stereotaxic frame. Two silver wire (Phymep) EEG electrodes soldered onto a female connector (male SMC basement for coaxial connectors) were fixed in place. The cortical electrode, which terminated with a 0.5 mm diameter sphere, was inserted through a hole in the skull until it came into contact with the dura mater. This electrode was positioned 3 mm lateral to the sagittal suture and 4 mm anterior to the bregma. The second electrode, used as a ground electrode, was positioned subcutaneously. Four jewellery screws were then fixed lateral to the skull and served to anchor the electrodes and the connector with dental cement (Dentalon® Plus, Kulzer–Heraeus). No muscle electrodes were used because the derivations employed provided a clear distinction between the three main vigilance stages: wakefulness (W), slow wave sleep (SWS), and paradoxical sleep (PS) [21]. All the rats were allowed to recover for at least 10 days after surgery. During this period, they were accustomed to being fed during two separate periods, according to the following schedule: 55% of the daily requirements previously measured were given at 1800 h, i.e. one hour before lights off, and this food remained available throughout the night period, the remaining 45% being made available between 0900 and 1100 h. The aim of this feeding schedule was to create a close link between feeding and sleep patterns and thus to enable analysis of the relationships between sleep and feeding [21]. Surgery and application of the feeding schedule induced a transient decline in body weight, but preoperative weight was recovered within 3 days.

2.3. Experimental feeding procedures

Two groups of rats were studied, each submitted to a strategy of nutrient restriction-refeeding, with the EEG patterns recorded at key points of the procedure (Fig. 1).

Experiment 1—energy depletion/repletion. Rats implanted with cortical electrodes and adapted to the P14 diet were subjected to 4 days of fasting, at the end of which six rats were sacrificed for an analysis of body composition. The other rats were refed for a

further 6 days with the same P14 diet as that supplied during the control period, but the amount was limited to 80% of what they ingested spontaneously before fasting. They were then sacrificed and their body composition was analyzed. This partial refeeding protocol was expected to induce a specific accretion of body fat at the expense of lean body mass [8,9]. Sleep patterns were recorded between 0930 and 1730 h, i.e. over an 8 h period, starting 30 min after presentation of the light-period meal. Two days of recordings were made during the control period in order to habituate animals to the recording device and to control the quality of the EEG signal. Their sleep patterns were then recorded during the last 2 days of the control period (BASAL), during the last day of the restriction period (REST) and during days 1, 2, 4 and 6 of the refeeding period (RD1, RD2, RD4, RD6).

Experiment 2—protein depletion/repletion. Rats implanted with cortical electrodes and adapted to the P14 diet were fed for 24 days with the low-protein diet (P5). This regimen was expected to induce a progressive increase in adiposity without a concomitant increase in food intake and body weight [31]. At the end of this period, six rats were sacrificed for the analysis of body composition. The other rats were refed for 6 days with a high-protein diet (P35) in order to induce a specific recovery of lean body mass at the expense of fat mass. They were then sacrificed and their body composition was analyzed. Sleep patterns were recorded between 0930 and 1730 h, i.e. for an 8 h period, starting 30 min after presentation of the light-period meal. Two days of recordings were made in order to habituate animals to the recording device and to control the quality of the EEG signal. Their sleep was then recorded during the last day of the low-protein feeding period and during days 1, 2, 4 and 6 of the high-protein refeeding period (RD1, RD2, RD4, RD6).

2.4. Sleep recording procedure

A flexible electrical wire was screwed to the skull connector by mean of a female SMC-plus for a coaxial connector and plugged into a electrical swivel connector (Air precision, Le Plessis-Robinson, France) so that the EEG signal could be transmitted to an amplifying system (10,000×) (Astro-Med-Grass 7P5C and 7DAQ and A-M System Inc. 1700). The amplified signal was connected to a data acquisition board (DAS 1800, Keithley Instrument, Palaiseau, France) plugged into a personal computer. Data was acquired on six rats simultaneously, under the control of a PC program written in the laboratory using ASYST V4.1 (Keithley Instrument). The amplified signals were digitized at a frequency of 100 Hz, fil-

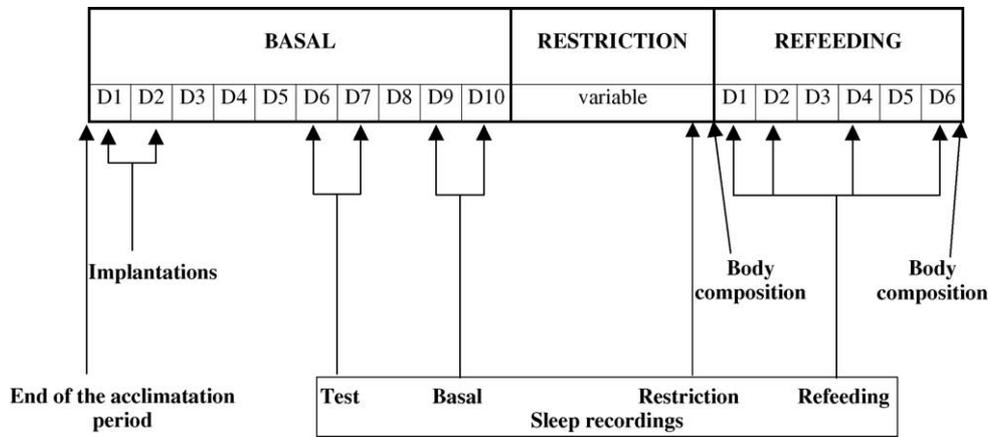


Fig. 1. Protocol schedules.

tered below 1 Hz and above 40 Hz and saved on a hard disk at 10 s intervals. All measurements of wakefulness (W), slow wave sleep (SWS) and paradoxical sleep (PS) were made by visual inspection of the graphic replay of data files on the computer screen by two independent observers. The assignment of sleep stages followed standard criteria. As for EEG patterns, SWS episodes of less than 20 s within a W episode were not distinguished from wakefulness, and conversely, episodes of W of less than 20 s within a period of SWS were not distinguished from SWS. The duration of sleep phases were established at ± 5 s. Analysis of the sleep–wake cycle during each 8 h period showed the time spent in wake, SWS and PS.

2.5. Statistical analysis of sleep data [15]

The procedures for sleep data recording were repeated twice in each group so that at least five workable sleep recordings could be obtained for the same rat throughout the fasting–refeeding periods. Paired analysis was important to take account of the inter-individual variability of sleep patterns in basal conditions. *t*-Tests for paired data were therefore used to analyze the sleep changes during the different periods within each experimental procedure. Inter-group comparisons were also performed, using a *t*-test for unpaired data to compare sleep patterns between the two studies.

2.6. Body composition analysis

Body composition was analyzed by dissecting and weighing the different tissues and organs. White adipose tissue (WAT) was measured from the retroperitoneal, epididymial and subcutaneous fat and was considered as the indicator of fat body mass. We also report here the data obtained on the weight of skin, carcass and main organs. The body composition of the rats was analyzed before and after the refeeding periods under the different protocols, thus making it possible to verify that the feeding manipulations induced the expected changes in body composition. The body composition of rats in this study was also compared with the body composition of rats receiving the P14 diet ad libitum, using the body-composition bank of data accumulated in the laboratory over past years. Differences in body composition were analyzed by ANOVA followed, when necessary, by a post hoc Tukey’s test.

3. Results

3.1. Effects of energy or protein depletion/repletion on body weight and body composition

Tables 2 and 3 summarize the body composition data collected during the key periods of experiments 1 and 2. For comparison, we have also included body composition data obtained in rats kept under standard P14 conditions. The changes to total body weight in the different groups of this study, as well as in a standard P14 group, are shown in Fig. 2.

Energy depletion–repletion (Experiment 1) mainly induced changes to fat mass (Table 2). Energy restriction induced an important loss of weight (39 g on average, i.e. 14% of the initial body weight). This weight loss mainly affected adipose tissue, the weight of which decreased by 59%. Skin and carcass weights were also reduced but to a lesser extent (22 and 20%, respectively) while in contrast, the vital organs appeared to have grown despite the fasting period (+21% on average for organ weights). Thus, as expected, the energy

Table 2
Body composition of rats in the energy depletion/repletion protocol

	P14	Restriction	Refeeding
Absolute values (S.E.M.) (g)			
Weight	276.00 (5.42) b	236.85 (4.57) a	279.88 (4.21) b
WAT	22.87 (1.93) c	9.16 (0.72) a	15.64 (1.04) b
Skin	51.37 (2.44) b	40.03 (1.63) a	44.85 (1.35) a,b
CARC	137.15 (5.11) c	109.40 (1.84) a	121.41 (1.38) b
Organs	64.60 (5.38) a	78.25 (2.51) b	97.99 (1.62) c
Percentage vs. body weight			
Weight	100.00	100.00	100.00
WAT	8.29 (0.69) c	3.86 (0.27) a	5.57 (0.31) b
Skin	18.57 (0.62) b	16.89 (0.56) a,b	16.01 (0.28) a
CARC	49.72 (1.72) b	46.22 (0.51) b	43.40 (0.37) a
Organs	23.41 (1.88) a	33.03 (0.83) b	35.02 (0.46) b

At the end of the restriction period, at the end of the refeeding period, and with respect to standard P14 rats of the same weight before the restriction period. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Values on the same line that do not share the same letter are significantly different at $P < 0.05$, ANOVA followed by post hoc Tukey’s test.

Table 3
Body composition of rats in the protein depletion/repletion protocol

	P14	P5	P35
Absolute values (S.E.M.) (g)			
Total weight (g)	428.64 (8.94) b	381.98 (5.09) a	412.32 (11.97) a,b
WAT (g)	58.40 (4.70)	55.48 (1.86)	46.20 (5.75)
Skin (g)	75.00 (3.27) c	49.48 (0.87) a	60.57 (2.05) b
Carcasse (g)	184.03 (1.55) c	157.68 (1.99) a	169.17 (2.17) b
Organs (g)	111.21 (5.78) a	119.34 (2.53) a	136.39 (4.44) b
Percentage vs. body weight			
Total weight	100.00	100.00	100.00
WAT	13.60 (0.99) a,b	14.51 (0.36) b	11.09 (1.15) a
Skin	17.50 (0.66) c	12.95 (0.16) a	14.69 (0.21) b
Carcasse	43.00 (0.82)	41.30 (0.50)	41.14 (0.84)
Organs	25.91 (1.01) a	31.24 (0.46) b	33.08 (0.58) b

At the end of the P5 period, at the end of the P35 period, and with respect to rats after 3 weeks on a standard P14 diet. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Values on the same line that do not share the same letter are significantly different at $P < 0.05$, ANOVA followed by post hoc Tukey's test.

restriction procedure induced a specific reduction in fat mass which, relative to total body weight, decreased from 8.3 to 3.9%. The controlled refeeding procedure (80% of the intake measured at satiety) allowed the rats to catch up their weight, with a mean growth of 43 g during the 6 days of refeeding. Carcass and organs weights increased during the refeeding period, but relative to total body weight, they did not change significantly. As expected, an important proportion of energy was stored in the adipose tissue and this was the only compartment whose weight relative to total body weight increased significantly during the refeeding procedure (+44%). In conclusion, despite some variations observed in the weight of lean tissues, fat mass was the component most affected by the energy restriction/repletion procedure applied.

Protein repletion after depletion (Experiment 2) induced a specific increase in lean mass (Table 3). The 3 weeks of low-protein regimen allowed the rats to grow, but significantly less than what is usually observed in rats kept under standard conditions. Moreover, during this period, important changes in body composition occurred: the tissues most

affected appeared to be the skin (−26% relative to body weight) and to a lesser extent the carcass (−4%), probably because they served as sources of endogenous amino acids. In contrast, fat mass was not affected and thus increased relative to overall body weight (+7%). As during energy restriction, the vital organs appeared to be well preserved during this period so that at the end of the protein restriction period, their weight relative to body weight had increased by 21%. During the 6 days of protein repletion with the P35 diet, fat mass decreased only slightly (despite a significant weight gain) and thus decreased by 24% relative to overall body weight. In contrast, the weight of lean tissues, organs, carcass and particularly skin all increased during protein repletion. To summarize, protein repletion induced an arrest in the fat mass growth and a recovery of lean tissues.

3.2. Effects of energy or protein depletion/repletion on sleep

The effects of energy or protein restriction and refeeding on sleep are shown in Fig. 3.

Sleep changes induced by food energy restriction and refeeding (Experiment 1). Energy restriction decreased total sleep duration by 36%, SWS by 32% and PS by 56%. SWS fully recovered as early as the first day of refeeding, but it was 4 days before PS returned to values that were not significantly lower than those recorded in the basal state. When sleep quality was considered in terms of the PS/SWS ratio, fasting reduced this PS/SWS ratio from 22 to 14%. This low ratio was maintained throughout most of the refeeding period, despite the overall recovery of sleep, because SWS recovered as early as the first day of refeeding while 4–6 days were necessary for PS to recover completely.

Sleep changes induced by protein restriction and refeeding (Experiment 2). After 23 days of protein restriction, both total sleep duration and SWS duration were not significantly different from the values measured in the P14 fed rats in experiment 1 (total sleep: 1430 versus 1454 with $P = 0.88$,

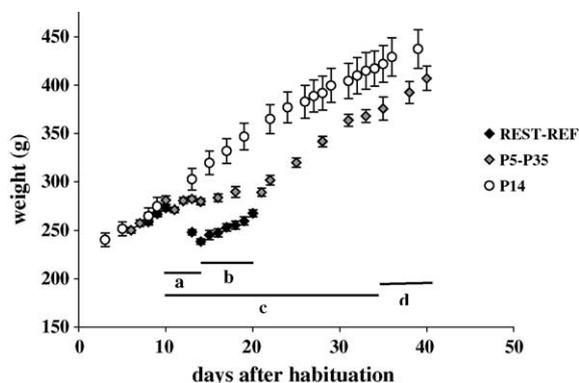


Fig. 2. Changes to the weight of rats during the two protocols and under standard P14 conditions. REST-REF, rats following the energy depletion/repletion protocol; P5–P35, rats following the second protein depletion/repletion protocol: (a) for the restriction period, (b) for the refeeding period, (c) for the P5 period and (d) for the P35 period.

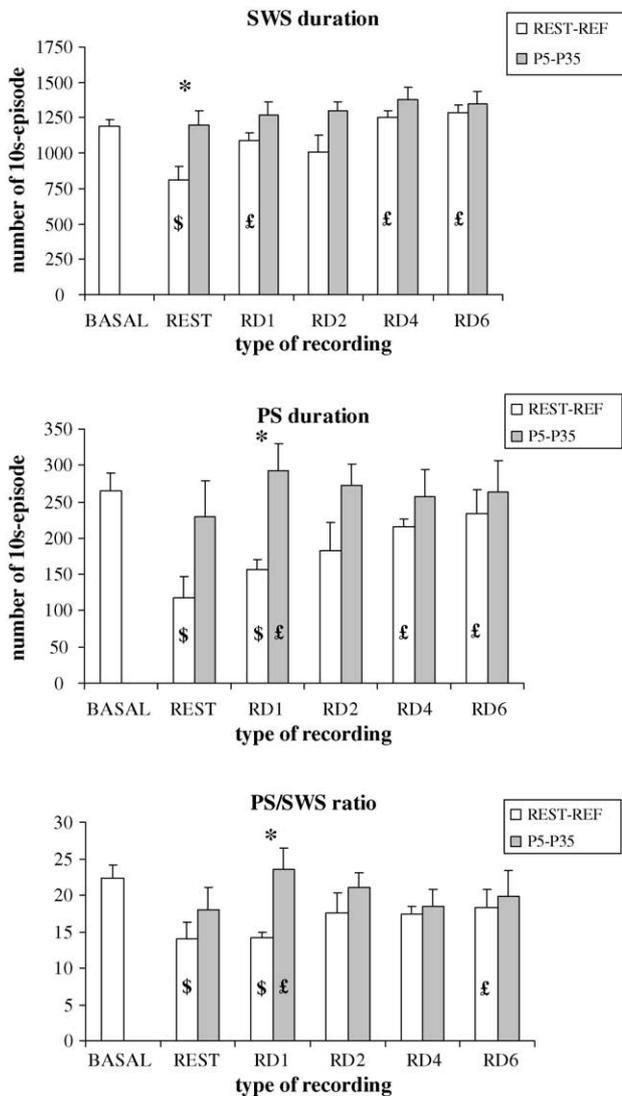


Fig. 3. SWS duration, PS duration and PS/SWS ratio at the different stages for each depletion/repletion protocol: (\$) data significantly different from BASAL; (£) data significantly different from REST; (*) significant inter-group difference.

inter-group *t*-test; SWS: 1201 versus 1189 with $P=0.92$, inter-group *t*-test). Protein repletion with P35 did not significantly affect total sleep duration or SWS duration, but specifically increased PS duration as well as the PS/SWS ratio (significant at day 1). These data revealed a transient modification to the composition of sleep because of the important and specific peak of PS that occurred during the first day of protein repletion.

Taken together, the results of this study show that energy repletion favoured fat deposition together with the specific recovery of SWS, while protein repletion in the absence of previous fat depletion favoured the recovery of lean body mass as well as the specific recovery of PS. We observed a impressive difference in the PS/SWS ratio between the two protocols during the first day of energy repletion (23.5% versus 14%, $P=0.014$, inter-group *t*-test). Under both con-

ditions, however, the phenomenon was transient, and only particularly visible during the first day of repletion.

4. Discussion

This study constitutes a first step towards a clearer understanding of the links between sleep and peripheral energy metabolism. In this instance, we challenged the hypothesis that SWS could be specifically related to lipid metabolism (and more generally to energy metabolism) and that PS could be specifically related to protein metabolism disturbances. The nutritional changes imposed on the rats were expected to create a short period of strong synthesis of either lipids or protein, in order to reveal whether qualitative links exist with sleep parameters. In this framework, they were designed to create a state of energy or protein deficit during an initial period, followed by correction of this deficit during a second period, with sleep being recorded at various key points. For the first time, we have shown that nutritionally induced metabolic changes are able to influence the quantity and the quality of sleep in ways that reflect how whole body metabolism is engaged in processes that alter either fat or protein stores. Under these experimental conditions, the PS/SWS ratio was found to constitute a satisfactory marker of opposite evolutions in adiposity while energy metabolism was devoted to returning the body composition to normal after protein or energy malnutrition. These results highlight a complex quantitative and qualitative relationship between sleep and energy metabolism, and further support the idea that sleep could be a function involved in the adaptation of peripheral metabolism.

During the first experiment, 4 days of fasting induced the expected loss of weight and fat, in agreement with the rapid depletion of fat reserves observed in rats of the same age and weight [14]. However, as the lipid stores became depleted, protein sparing was affected and significant losses of lean tissues also occurred. They mainly affected the skin (from which all dissectible subcutaneous adipose depots were of course removed) and muscles. In contrast, all vital organs were spared. Therefore, despite the relatively short period of restriction, the rats finally displayed a protein deficit in addition to the expected lipid losses. Part of this protein deficit was recovered despite the controlled refeeding procedure that was expected to favour lipid rather than protein deposition [8]. Indeed, this procedure had been developed because it could be expected that controlled refeeding after body weight loss would favour fat rather than protein deposition [8]. However, the short-term fasting conditions applied during this study (unlike long-term fasting conditions imposed during the study referred to above) probably induced a larger protein deficit and consequently a partial recovery of this deficit despite the controlled refeeding procedure. Although the procedure applied did not produce as specific a loss and recovery of lipid as expected, the principal objectives were attained in such a way that, during this experiment, lipids were the first

body components mobilized during fasting and then re-stored during refeeding. Two types of changes to sleep patterns were associated with the changes to body composition. Firstly, the fasting procedure induced a strong reduction in total sleep duration, a phenomenon which has previously been reported [1,3,16]. Other studies demonstrated an increase in sleep duration in fasted geese, but the authors compared their results with those observed in rats by referring to the fact that geese (as well as humans), have larger energy stores than rats and are thus able to face longer periods of fasting. In this context, and unlike rats, they suggested that geese might be able to develop processes to reduce energy expenditure during fasting and that the enhancement of SWS could be a way of achieving this goal, for as long as energy stores are large enough to prevent protein catabolism [4]. Accordingly, increases in SWS were observed in rats only after they have been rendered obese by a VMH lesion [3]. During the present study, young lean rats were used and they had already dramatically depleted energy stores when sleep was recorded on the fourth day of fasting, thus explaining the marked loss of sleep. Taken together, these data suggest that sleep is dependant on the energy available in the body rather than on food intake per se. Moreover, it supports the hypothesis that sleep helps to limit catabolism, depending on the energy status of the body, but a reduction in sleep duration reflects a state of energy depletion that probably also affects protein stores (as was observed in geese when fasting was pursued). Thus, as previously reported, our fasting conditions induced a decrease in both SWS and PS, reflecting a marked energy deficit. Furthermore, we observed a reduced PS/SWS ratio. According to our hypothesis, this last result could be expected if at the end of the 4 days of fasting, the protein balance was more markedly affected than the lipid balance which was in fact possible when we considered the degree of protein loss from the skin and muscles.

In line with the objectives of this study, the most interesting result was observed during the process of controlled refeeding. During this period, the changes to body composition assessed from carcass analysis were in agreement with previous reports showing characteristic, high energy efficiency and partitioning towards fat accretion [8,9]. In agreement with our working hypothesis, we observed a specific recovery of SWS during refeeding. However, this phenomenon was limited to the first day of refeeding. As we had initially expected the phenomenon to last for several days, we recorded sleep for 6 days and only measured body composition after 6 days of refeeding. It is thus not possible from the present data to be certain that the higher and more specific recovery of lipid stores occurred mainly during the first day of refeeding, when SWS was specifically restored. Additional studies, involving the direct measurement of lipid and protein synthesis, an *in vivo* analysis of body composition and calorimetric studies, need to be undertaken to verify that most of the lipid recovery measured at the end of the 6 days of refeeding in fact occurred during the first day. Nevertheless, the main trends of the present results confirm the hypothesis that SWS

is highly dependant on energy balance, and moreover is more specifically related to fat sparing. Thus, it may constitute a means of informing the brain and possibly adjusting the metabolism to the specific requirements of lipid or energy balance.

During the second study, the rats were maintained for 3 weeks under low-protein feeding before measuring sleep. This period was necessary for the rats to adapt to the new regimen, to reach a new steady state and sustain significant changes in body composition. This relatively long adaptation period prevented from measuring sleep patterns under P14 feeding because the probability of obtaining a faulty EEG signal increases with time. Thus, the rats were implanted only a few days before being placed on the low-protein diet. The effects of the low-protein diet on body composition were in agreement with previously published results [31] and in line with the aim of the procedure in as much as during this period, the rats became fatter. It would have been interesting to record sleep during the first days of the low-protein diet, because it is probably during this period that the negative protein balance developed, but the surgery was too recent to permit satisfactory EEG recordings at that time. As a result of the adaptation to the low-protein diet, SWS was well preserved and PS only slightly reduced, probably because during this period, the rats had managed to stabilize their protein balance.

In contrast with other studies that showed that under well-controlled conditions of refeeding after low-calorie semi-starvation (when body fat is markedly depleted and the growth of lean tissues arrested), high-protein levels in the refeeding diet do not have any significant effect on the rate of protein accretion [9], the depletion diet used during our experiment was available *ad libitum* and body protein was the component that was by far the most reduced. However, as observed during fasting, the vital organs were well preserved, and once again, carcass and particularly skin proteins were preferentially mobilized. Refeeding these rats with a high-protein diet induced a specific gain in lean body mass, and even induced an arrest in fat mass growth. In agreement with our hypothesis, this specific accretion of protein was accompanied by an increase in PS that was apparent throughout the 6 days of refeeding, even though the phenomenon was only significant during day 1. However, SWS also increased slightly but steadily, despite the fact that the rats were reducing their fat mass, which suggests that SWS perhaps reflected the overall energy status of the rats (and in this context was also dependent on the protein status) rather than more specifically the lipolytic or lipogenetic orientation of lipid metabolism. Interestingly, we had shown in a previous study that refeeding rats (previously food-restricted as in the first experiment) with a P14 diet containing a highly digestible and tryptophan rich protein (alpha-lactalbumin) induced an immediate and complete recovery of SWS but did not significantly improve PS recovery [21]. Body composition was not measured during that study, but other studies have shown that rats receiving alpha-lactalbumin are leaner than those fed whole

milk protein, suggesting that the improved recovery of SWS did not result from increased fat storage but rather (as during the present study) from a general improvement in energy metabolism.

In contrast, the concomitance between PS and protein recovery observed in the present study seems to be more in agreement with a close relationship between PS and protein synthesis or protein turnover. Indeed, PS was reduced in rats adapted to a low-protein diet (a context in which it is now well established that protein turnover is reduced), as well as in the food-restricted rats that exhibited a clear protein deficit. PS was only partially restored at a late stage following fasting and controlled refeeding during which lipids were preferentially restored, but recovered immediately after protein depletion then repletion, when proteins were deposited to the detriment of lipids. The results of this experiment thus confirm the hypothesis that PS is more specifically dependent on protein balance and is also related to protein sparing. Thus, it may constitute a means of informing the brain and possibly adjusting metabolism to the specific requirements of the protein balance.

In conclusion, the present results confirm a close quantitative relationship between sleep and the energy status of the body, but also, and for the first time, clearly demonstrate a qualitative relationship between sleep and lipid/protein synthesis/degradation. Because sleep, through SWS and PS parameters as well as the PS to SWS ratio, seems to be able to express the metabolic status of the organism, it may participate in adjusting the activity of various brain nuclei as a function of the energy status of the body, in order to adapt brain responsiveness to feeding and tune the control of peripheral energy metabolism. The brain nuclei possibly modulated by sleep, that in turn may tune the control of peripheral energy metabolism, still need to be revealed, but the organization of the hypothalamic nuclei already suggests close relationships in the control of sleep, food intake and energy metabolism. Some hypothalamic region (for example, the posterior hypothalamus which receive projections from PS-ON neurons) or those parts of the hypothalamus involved in regulating arousal and feeding behaviour, such as the preoptic area, lateral hypothalamus or anterior hypothalamus, may be good candidates for mediating the impact of sleep on peripheral metabolism. Much work will be necessary before the precise mechanisms connecting sleep and energy metabolism are deciphered, but the probability of such relationships offers new insights into the way sleep may be altered in people subjected to environmental stress which affects their feeding behaviour and/or energy status, and may offer nutritional and behavioural alternatives to pharmacological treatments.

Acknowledgement

The authors would like to thank Sophie Daré for technical assistance.

References

- [1] Borbély AA. Sleep in the rat during food deprivation and subsequent restitution of food. *Brain Res* 1977;124:457–71.
- [2] Danguir J, Nicolaïdis S. Intravenous infusions of nutrients and sleep in the rat: an ischymetric sleep regulation hypothesis. *Am J Physiol* 1980;238:E307–12.
- [3] Danguir J. Nutrition, métabolisme et sommeil. *Cah Nutr Diet* 1984;XIX–X.
- [4] Dewasmes G, Cohen-Adad F, Koubi H, Le Maho Y. Sleep changes in long-term fasting geese in relation to lipid and protein metabolism. *Am J Physiol* 1984;247(4):R663–71.
- [5] Dewasme G, Duchamp C, Minaire Y. Sleep changes in fasting rats. *Physiol Behav* 1989;46(2):179–84.
- [6] Drucker-Colin R, Zamora J, Bernal-Pedraza J, Sosa B. Modification of REM sleep and associated phasic activities by protein synthesis inhibitors. *Exp Neurol* 1979;63(3):458–67.
- [7] Drucker-Colin R, Espejel RM. Chronic administration of chloramphenicol, a protein synthesis inhibitor, selectively decreases REM sleep. *Behav Neural Biol* 1980;29(3):410–3.
- [8] Dulloo AG, Girardier L. Adaptive changes in energy expenditure during refeeding following low-calorie intake: evidence for a specific metabolic component favoring fat storage. *Am J Clin Nutr* 1990;52(3):415–20.
- [9] Dulloo AG, Girardier L. Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse. *Metabolism* 1992;41(12):1336–42.
- [10] Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat. III. Total sleep deprivation. *Sleep* 1989;12(1):13–21.
- [11] Everson CA, Wehr TA. Nutritional and metabolic adaptations to prolonged sleep deprivation in the rat. *Am J Physiol* 1993;264:376–87.
- [12] Everson CA. Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 1995;69(1–2):43–54.
- [13] Gally JA, Edelman GM. Neural reapportionment: an hypothesis to account for the function of sleep. *CR Biol* 2004;327(8):721–7.
- [14] Goodman MN, Larsen PR, Kaplan MM, Aoki TT, Young VR, Ruderman NB. Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am J Physiol* 1980;239(4):E277–86.
- [15] Horgan GW. Statistical analysis of nutritional studies. *Br J Nutr* 2001;86(2):141–4.
- [16] Jacobs BL, McGinty DJ. Effects of food deprivation on sleep and wakefulness in the rat. *Exp Neurol* 1971;30(2):212–22.
- [17] Kavanau JL. Memory, sleep, and dynamic stabilization of neural circuitry: evolutionary perspectives. *Neurosci Biobehav Rev* 1996;20(2):289–311.
- [18] Lacey JH, Hawkins C, Crisp AH. Effects of dietary protein on sleep E.E.G. in normal subjects. *Adv Biosci* 1978;21:245–7.
- [19] Maquet P. The role of sleep in learning and memory. *Science* 2001;294(5544):1048–52.
- [20] Meyer JH. Interaction of dietary fiber and protein on food intake and body composition of growing rats. *Am J Physiol* 1958;193:488–94.
- [21] Minet-Ringuet J, Le Ruyet PM, Tome D, Even PC. A tryptophan-rich protein diet efficiently restores sleep after food deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 2004;152(2):335–40.
- [22] Nicolaïdis S, Rowland N, Meile MJ, Marfaing-Jallat P, Pesez A. A flexible technique for long term infusions in unrestrained rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1974;2:131–6.
- [23] Peterfi Z, Churchill L, Hajdu I, Obal Jr F, Krueger JM, Parducz A. Fos-immunoreactivity in the hypothalamus: dependency on the diurnal rhythm, sleep, gender, and estrogen. *Neuroscience* 2004;124(3):695–707.
- [24] Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat. X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* 2002;25(1):68–87.
- [25] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition

- ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123(11):1939–51.
- [26] Salin-Pascual R, Gerashchenko D, Greco MA, Blanco-Centurion C, Shiromani PJ. Hypothalamic regulation of sleep. *Neuropsychopharmacology* 2001;25(S5):S21–7.
- [27] Scheen AJ, Van Cauter E. The roles of time of day and sleep quality in modulating glucose regulation: clinical implications. *Horm Res* 1998;49(3–4):191–201.
- [28] Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 1999;354:1435–9.
- [29] Siegel JM. The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science* 2001;294:1058–63.
- [30] Valatx JL. In: Benoit O, Forêt J, editors. *Régulation du cycle veille-sommeil*. Masson éditeur: Le sommeil humain; 1995. p. 25–37.
- [31] White BD, He B, Dean RG, Martin RJ. Low protein diets increase neuropeptide Y gene expression in the basomedial hypothalamus of rats. *J Nutr* 1994;124:1152–60.
- [32] Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:429–58.

Troisième Partie :
Approche Nutraceutique,
cas de l'apport alimentaire d'un hydrolysat
trypsique de la caséine α S1 à activité de
type anxiolytique

3.1 Influence de l'apport alimentaire de substances à activité spécifique sur la régulation du sommeil : état de l'art

Au delà de l'approche globale qui considère les liens entre l'alimentation et le sommeil au travers des relations étroites que ces deux grandes fonctions entretiennent avec le métabolisme énergétique, il existe une approche plus directe à la problématique de l'influence de l'alimentation sur la régulation du sommeil. Elle consiste en l'étude de molécules ou principes actifs contenus dans les aliments et susceptibles de se comporter comme des régulateurs du sommeil. En effet, des aliments pouvant avoir un impact spécifique sur certaines fonctions de l'organisme par le biais de principes actifs ont déjà été identifiés. Il est également vraisemblable qu'il existe des aliments pouvant jouer de cette manière sur le sommeil, même si beaucoup reste à faire pour déterminer leurs principes actifs et leurs modalités d'action.

3.1.1 Nutrition « optimale », aliments fonctionnels et nutraceutiques

Le rôle primaire de l'alimentation est de fournir des substances nutritives en suffisance pour rencontrer les besoins nutritionnels d'un individu. Cependant de nombreuses données scientifiques sont aujourd'hui venues à l'appui de l'hypothèse selon laquelle des produits alimentaires et des composants d'aliments, en plus de la fourniture de nutriments de base, peuvent avoir des effets physiologiques et psychologiques bénéfiques en exerçant des fonctions spécifiques dans l'organisme. La science de la nutrition s'est ainsi déplacée vers des concepts de nutrition "positive" ou "optimale", selon lesquels le but de l'alimentation n'est plus seulement de répondre au besoins physiologiques en nutriments, mais aussi de permettre le maintien de l'organisme en bonne santé, si bien qu'aujourd'hui, une grande partie de la recherche est axée sur l'identification de composants biologiquement actifs dans les produits alimentaires, et sur l'étude du potentiel qu'ils représentent pour améliorer l'état physique, mental et réduire le risque de maladies.

Le concept d'aliment fonctionnel, qui est né au Japon, est apparu pour désigner un aliment qui apporte, en plus des nutriments, un bénéfice pour la santé. Aujourd'hui, la définition la plus

couramment adoptée est celle d'un aliment semblable en apparence à un aliment conventionnel, destiné à être consommé dans le cadre d'une alimentation normale, et dont il a été démontré, documentation scientifique à l'appui, qu'il procurait, au-delà des fonctions nutritionnelles de base, des bienfaits physiologiques ou une réduction du risque de maladies chroniques. C'est le cas de nombreux aliments traditionnels comme les fruits, les légumes, le soja, les céréales complètes et le lait, qui contiennent des composants bénéfiques pour la santé. En plus de ces aliments de la vie de tous les jours, de nouveaux produits ont été fabriqués pour augmenter ou incorporer ces composants avantageux dans notre alimentation. A titre d'exemple, ces composants peuvent être des minéraux, des vitamines et des acides gras spécifiques, des fibres alimentaires, des substances phytochimiques (comme les stérols végétaux), des antioxydants ou encore des probiotiques. Le terme de nutraceutique vient quant à lui des Etats-Unis. Un aliment nutraceutique est un produit isolé ou purifié à partir d'aliments et qui a montré des bienfaits du même ordre que ceux attendus avec les aliments fonctionnels (64, 66, 67).

Notons toutefois qu'en France comme en Europe, il n'existe pour l'instant pas de définition légale de l'aliment fonctionnel ni, a fortiori, du nutraceutique, ce qui fait que, bien qu'ils ne soient pas seulement des aliments, ils ne sont pas sujets à une réglementation plus stricte que ces derniers sur le plan de leur distribution et de leur consommation. Le principal contrôle s'effectue donc sur le plan de l'autorisation des allégations associées à ces produits. Différentes normes ont été adoptées dans chaque pays en attendant une réglementation à l'échelle européenne, mais il existe déjà un large consensus sur le fait que les allégations de santé doivent être solidement justifiées pour protéger le consommateur, promouvoir le commerce et encourager la recherche universitaire et l'innovation dans l'industrie alimentaire.

Si la découverte ou redécouverte de ces produits et de leurs propriétés représente un potentiel thérapeutique très intéressant, elle nécessite également que leur exploitation commerciale croissante, et le marketing qui y est associé, obéisse à un cahier des charges prédéfini pour que le consommateur, qui n'est pas forcément un expert, ne soit pas induit en erreur dans ses choix. Nous y reviendrons dans la Conclusion générale, mais déjà, à l'heure où nous écrivons, les ministres de la Santé des 25 États membres de l'Union européenne se sont unanimement accordés sur la proposition de texte renforçant la réglementation relative aux allégations nutritionnelles et de santé des aliments. D'une part, il sera interdit aux industriels de faire état d'atouts « nutritionnels » et/ou « santé » si leur produit est trop déséquilibré (trop sucré, trop salé, trop gras...), d'autre part les allégations nutritionnelles affichées sur les emballages

devront être prouvées scientifiquement et entérinées par l'Autorité Européenne pour la Sécurité Alimentaire (AESA) avant toute commercialisation, en particulier celles qui affirmeraient qu'un aliment peut réduire des risques de maladie (65).

Dans le domaine des aliments fonctionnels et des nutraceutiques, la recherche occupe donc une place de premier ordre et se doit de répondre aux questions soulevées avec une rigueur à la hauteur des enjeux concernés.

3.1.2 Aliments et nutriments à activité biologique et sommeil

Certains aliments ou boissons ont été identifiés de longue date pour leur capacité à agir sur la régulation du sommeil. Des plantes médicinales telles que la camomille, le houblon, la valériane (ses racines) et autres, sont prises en infusion pour leur effet légèrement sédatif promoteur de sommeil. A l'inverse, des produits végétaux riches en caféine (café, cacao) sont utilisés depuis longtemps pour augmenter la vigilance et retarder l'endormissement. Malgré cela, l'idée selon laquelle les constituants d'un repas normal peuvent influencer les fonctions cérébrales est nouvelle. Ce n'est que récemment qu'il est devenu clair que des nutriments particuliers peuvent exercer une action sur le fonctionnement du système nerveux central, et notamment sur la régulation veille-sommeil. Cependant, jusqu'à présent, de grandes zones d'ombre persistent dans la détermination de leurs voies d'actions et/ou de leurs efficacités fonctionnelles, ce qui freine leur utilisation à des fins thérapeutiques.

En premier lieu, il s'agit des nutriments précurseurs de la synthèse de neuromédiateurs, dont la disponibilité permet d'influer sur le fonctionnement cérébral (40). Parmi ceux-ci, certains acides aminés apportés par l'alimentation peuvent agir directement au niveau central sur la production des neurotransmetteurs monoamines qui en sont les dérivés : le tryptophane et la tyrosine apportés par l'alimentation influent ainsi respectivement sur la synthèse de sérotonine et des catécholamines (dopamine, adrénaline, noradrénaline) centrales. L'influence de ces derniers sur la régulation du sommeil mais aussi sur d'autres fonctions au niveau central est à envisager. En particulier, l'influence bénéfique sur le sommeil de l'apport en tryptophane et d'aliments qui augmentent sa disponibilité, par le biais de la synthèse de sérotonine a été bien établie (9, 120, 158).

En second lieu, il s'agit de peptides alimentaires à activité biologique qui pourraient avoir une activité spécifique sur le système nerveux et le fonctionnement cérébral. En effet, dans la séquence d'acides aminés des protéines alimentaires, il existe un grand nombre de peptides d'intérêt ayant manifesté des propriétés pharmacologiques variées. Parmi eux, on trouve notamment des peptides à activité biologique de type activité opiacée au sujet desquels nous avons effectué une synthèse bibliographique (54) (voir Article 2 à la fin de la Partie). Cependant, en dépit de quelques indices montrant, dans certains cas très restreints, une influence fonctionnelle sur le système nerveux central, la question de leur absorption puis de leur éventuelle action sur les fonctions cérébrales chez l'homme adulte reste en grande partie irrésolue.

Comme nous le constatons, les aliments représentent donc également des sources potentielles de composants biologiquement actifs sur les fonctions cérébrales dans leur ensemble et le sommeil en particulier. Parmi eux, le lait, dont la composition renferme certains de ces facteurs nutritionnels de grand intérêt, est un aliment dont les propriétés calmantes et hypnogéniques ont été attentivement étudiées.

3.1.3 Etude des propriétés hypnogéniques du lait

De nombreux bénéfices physiologiques sont attribués au lait et notamment un effet calmant et promoteur de sommeil. Ainsi, de multiples conseils nutritionnels à destination du grand public prônent l'ingestion de lait comme un moyen de lutter contre l'insomnie. Cette croyance a reçu l'appui d'un certain nombre d'études. Il y a plus de 60 ans, il a été montré chez des adultes que la consommation d'un repas à base de cornflakes et de lait induit une tendance plus importante vers un sommeil ininterrompu (79). Grâce à l'électroencéphalographie, d'autres chercheurs ont montré que le sommeil était amélioré (plus long et moins interrompu) chez des personnes âgées prenant un repas de lait et de céréales à l'heure du coucher, et que l'action du lait était plus efficace avec une administration sur plusieurs jours (11). C'est toutefois chez le nourrisson que ces effets apparaissent les plus marqués.

Les recherches qui ont été menées pour expliquer ce phénomène ont avant tout porté sur les protéines du lait, les seules protéines synthétisées par les mammifères pour nourrir leurs petits. Autrefois uniquement considérées comme la source des acides aminés nécessaires à la synthèse protéique et à la croissance, les études les plus récentes ont montré qu'elles

pouvaient occuper des rôles plus ciblés. L'impact positif du lait sur le sommeil a ainsi été associé à ses fractions protéiques :

- Il pourrait venir de l'apport protéino-énergétique qu'elles constituent, et dont nous avons déjà parlé dans la Deuxième Partie.
- Il pourrait aussi venir d'une amélioration du ratio entre le tryptophane (Trp) et les autres acides aminés à chaîne longue dans le sang, qui favoriserait le passage du Trp vers le cerveau, donc la synthèse de sérotonine (12, 119). Dans ce cadre, les fractions protéiques du lait plus riches en tryptophane (protéines du lactosérum et surtout α -lactalbumine) semblent avoir un effet très significatif sur le sommeil, notamment en phase de récupération (99). Par contre les protéines totales du lait, relativement équilibrées en acides aminés, ne peuvent a priori pas favoriser spécifiquement le sommeil de cette façon.
- Enfin, certaines protéines du lait et des peptides à activité biologique qu'elles libèrent après digestion ont montré qu'ils pouvaient agir de manière spécifique sur l'organisme. Cette piste pour un rôle spécifique du lait sur le système nerveux central et le sommeil a été envisagée.

3.1.4 Les protéines du lait, sources potentielles de modulateurs de sommeil

Les protéines de lait peuvent présenter des propriétés fonctionnelles très variées sur l'organisme qui les ingère (145, 44). Ainsi, la lactoferrine, protéine présente dans le lait et notamment dans le colostrum, joue vraisemblablement un rôle important dans l'absorption du fer, dans la protection contre les infections gastro-intestinales chez le nourrisson (86), et, tout récemment démontrée, une activité de stimulation de la croissance osseuse (15). De plus, de nombreux peptides à activité biologique issus de la dégradation des protéines de lait dans l'intestin présentent des effets biologiques spécifiques (91), comme par exemple, une activité opiacée (54, 94, 144), immuno-modulatrice (49), ou encore anti-hypertensive (93).

Parmi les peptides à activité biologique contenus dans les protéines de lait, seuls les peptides du lait à activité agoniste des opiacés, majoritairement issus de la caséine (comme les β -casomorphines), sont susceptibles d'avoir des effets positifs sur le sommeil. Cependant, ces peptides ne semblent pas être absorbés en quantité significative chez l'adulte. Leur action se

limite donc probablement à une action sur les récepteurs du tube digestif, avec une influence locale sur les sécrétions gastriques, la motilité intestinale, et les réponses hormonales à la prise alimentaire (95, 143). Aucun effet direct sur le sommeil n'a été étudié ni révélé.

Le problème est différent chez le nouveau né dont le tube digestif semble capable d'absorber des peptides de taille beaucoup plus large que le tube digestif de l'adulte. Certaines études ont ainsi pu montrer que des peptides à activité opiacée produits lors de la digestion de la caséine pénètrent dans le sang et peuvent même agir sur le système nerveux central, le comportement et le sommeil, avant d'être détruits (142, 146).

Le type de peptide produit et absorbé après ingestion de protéines du lait dépend du processus digestif, c'est-à-dire de la digestion et vidange gastriques, et de la digestion et de l'absorption intestinales. Ce processus digestif est différent d'une espèce à l'autre et, à l'intérieur de la même espèce, il varie en fonction de divers paramètres, tels que l'âge ou l'état nutritionnel. Chez l'homme, la digestion est différente chez le nouveau-né et chez l'adulte. Ainsi, il a été montré que l'activité de la pepsine au niveau de l'estomac, importante chez l'adulte, est limitée chez le nouveau-né (55), chez qui la digestion est réalisée principalement par des enzymes présents dans le duodénum, notamment par la trypsine (85). De ce fait, les peptides libérés après ingestion de lait pourraient présenter des profils sensiblement différents chez le nourrisson et chez le sujet adulte, expliquant au moins en partie l'effet somnogénique plus intense du lait sur le premier.

Ces données ont amené à rechercher dans les hydrolysats tryptiques des protéines de lait des peptides susceptibles d'être porteurs d'une action calmante et somnogénique. Dans cette démarche, il a été mis en évidence qu'un hydrolysat tryptique de la caséine α_{s1} bovine contenant un décapeptide particulier (α_{s1} -casein (f91-100) ou peptide casozépine) présente des propriétés anxiolytiques originales (98).

3.2 Le produit de l'hydrolyse trypsique de la caséine α_{s1} bovine, à activité anxiolytique : un facteur alimentaire susceptible d'influencer la régulation du sommeil

Nous avons expliqué précédemment pourquoi la recherche de peptides à activité biologique susceptibles de porter la responsabilité des potentiels effets calmants et somnogéniques du lait a conduit les chercheurs à s'intéresser aux résidus de l'hydrolyse trypsique des protéines de lait, et notamment de la caséine α_{s1} bovine. Ici, nous exposons quelles sont les études qui ont été préalablement menées sur cet hydrolysate et en quoi elles ont pu guider et motiver nos propres travaux.

3.2.1 Un hydrolysate trypsique de la caséine α_{s1} bovine, le lactium, présente une activité anxiolytique originale

Des études *in vitro* ont démontré que la fraction peptidique (91-100) libérée lors de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} bovine, possède une importante affinité pour le site d'action des benzodiazépines sur le récepteur GABA-A (98). Le peptide correspondant à la fraction (91-100), a été baptisé peptide casozépine (voir Annexe 5). Or, la neurotransmission GABAergique est le principal système d'inhibition de l'activité des neurones, notamment des système glutaminergique et noradrenergique, et a été identifiée en tant que telle comme l'un des principaux systèmes modulateurs de l'éveil, de la réponse au stress, et de l'anxiété au niveau central. Précisons que l'anxiété est définie sur le plan physiologique par un maintien de l'état d'alerte de l'organisme, avec notamment une hyperactivité des systèmes de réponse au stress, et ce même en dehors de l'application réelle du stress (57). L'amélioration de la transmission GABAergique, notamment par l'utilisation de benzodiazépines ou de barbituriques, est ainsi utilisée pour exercer une action anxiolytique. En effet, ces molécules, en se fixant sur le récepteur GABA-A, potentialisent l'hyperpolarisation du neurone postsynaptique induite par le GABA (flux entrant de Cl^-) (6, 88). A l'inverse, des composés responsables d'une réduction du fonctionnement des récepteurs-canaux ioniques GABA-A,

tels que les dérivés de beta-carboline (28, 41), produisent des effets physiologiques tels que l'anxiété et des convulsions. C'est pourquoi, au vu de l'affinité du peptide casozépine pour le site d'action des benzodiazépines sur le récepteur GABA-A, une action de l'hydrolysat qui le contient et de ce peptide sur l'anxiété a été envisagée et étudiée en premier lieu.

Des études *in vivo* chez le rat ont ainsi mis en évidence que l'injection intraveineuse de l'hydrolysat total ou du peptide casozépine induit un effet anxiolytique lors de tests comportementaux d'anxiété, tels que le test d'enfouissement défensif conditionné ou le test du labyrinthe en croix surélevé, ainsi qu'une inhibition des crises d'épilepsie provoquées par le pentylentetrazole, ce qui semble confirmer une action similaire à celle des benzodiazépines sur la transmission GABAergique (98). Fait remarquable pour un produit issu d'une protéine alimentaire, la simple ingestion de l'hydrolysat total chez le rat (à 15 mg/kg par rat et par jour), mais aussi chez l'homme, a été démontrée capable d'induire à elle seule un effet anxiolytique significatif (96).

Il est très fortement suspecté que cette action post ingestion soit exercée par le peptide casozépine ou l'une de ses fractions, comme l'indiquent certains résultats non publiés jusqu'à présent. Il est également fort probable que cette action soit au moins en partie liée à une activité sur le récepteur GABA-A. Cependant, les études publiées à l'heure actuelle ne permettent pas de conclure sur ces points, ni sur celui, tout aussi important pour comprendre le phénomène, de l'absorption sous forme intacte du peptide casozépine après l'administration par voie orale du peptide lui-même ou de l'hydrolysat total. Outre l'identification des mécanismes et voies d'action *in-vivo* après ingestion, il semble également nécessaire de valider sa fonctionnalité chez l'homme dans les conditions d'une alimentation normale. Ce sont les critères d'élection requis pour pouvoir utiliser cet hydrolysat trypsique de la caséine α_{s1} bovine pour ses propriétés particulières dans l'alimentation humaine.

Nonobstant, nous pouvons tirer de ces études déjà réalisées d'importantes conclusions pour nos propres travaux. Les études montrent que cet hydrolysat trypsique de la caséine α_{s1} bovine est susceptible d'avoir un impact positif sur l'anxiété après son ingestion. Le peptide casozépine fait quant à lui figure de bon candidat au titre de peptide alimentaire à activité biologique responsable de l'action de l'hydrolysat sur le système nerveux central. Il pourrait notamment agir, après son ingestion et son absorption, comme un ligand exogène sur le récepteur GABA-A, au niveau central, pour réguler l'anxiété.

Aujourd'hui, l'hydrolysate trypsique de la caséine α_{s1} bovine, qui contient le peptide casozépine à hauteur de 2 à 2,5 % du poids protéique total, est produit par l'entreprise Ingredia sous le nom de lactium (voir Annexe 4). Il est d'ores et déjà commercialisé dans de nombreux pays sur la base de ses propriétés anxiolytiques. Il peut être intégré à la formule de compléments alimentaires (humain, animal) mais aussi de certains aliments spécifiques (lait, chocolat, lait en poudre, etc.). Toutefois, le lactium n'a pas encore reçu l'agrément des agences d'expertise et des autorités réglementaires françaises et européennes, plus difficiles à convaincre que d'autres, pour ses allégations commerciales exprimant un bénéfice sur la santé, l'anxiété ou la gestion du stress. Seul un « début d'allégation » est en passe d'être reconnu en France : la possibilité d'une action du lactium sur les effets tensionnels liés au stress, notamment chez la femme stressée (voir le dernier avis du 1^{er} avril 2005 rendu par l'Afssa en Annexe 4). Les caractéristiques techniques et nutritionnelles du lactium ainsi que des données toxicologiques, sont présentées en Annexe 4.

3.2.2 Le lactium: un potentiel modulateur de la régulation du sommeil par voie alimentaire

Au vu des indications sur les propriétés originales de l'hydrolysate trypsique de la caséine α_{s1} bovine, que nous appellerons désormais par son nom commercial, lactium, et des résultats montrant l'effet anxiolytique de son ingestion, il est ainsi possible d'envisager qu'il porte, au moins en partie, une responsabilité dans la réputation de l'effet calmant et somnogénique du lait.

Plus précisément, l'action potentielle du peptide casozépine sur les récepteurs GABAergiques, mais aussi les multiples mécanismes neurophysiologiques et physiologiques qui lient la réponse au stress à l'organisation des cycles veille-sommeil, font du lactium un possible facteur alimentaire agissant sur la régulation du sommeil.

En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, l'amélioration de la transmission GABAergique est également l'une des principales pistes étudiée pour essayer d'augmenter l'efficacité du système anti-éveil responsable du sommeil. Certaines benzodiazépines sont d'ailleurs actuellement fréquemment employées pour leur effet hypnotique. De plus, parmi les facteurs externes et internes capables de perturber la régulation du sommeil, l'état de stress (152, 153), l'anxiété et la dépression (3, 4), comptent parmi les

plus puissants. Ils sont souvent associés à une suractivation chronique de la réponse neurophysiologique et physiologique au stimulus stressant, qui entraîne une suractivation des systèmes responsables du maintien de l'éveil. Chez l'homme, stress et perturbations de la régulation du sommeil sont souvent reliées (51, 75). Les individus stressés peuvent avoir du mal à s'endormir, ou encore à rester endormis pendant la nuit. A l'inverse, un sommeil insuffisant ou des réveils fréquents liés à des problèmes physiologiques ou au rythme de travail peuvent être stressants, et perturber gravement l'équilibre psychologique (1, 8, 74). Chez le rat, il a déjà été montré que le stress chronique induit une réduction marquée de la quantité de sommeil (72).

Pourtant, malgré les effets qu'il semble avoir sur l'état de la réponse au stress, aucune étude ne s'est encore intéressée aux effets du lactium sur le sommeil. Dans nos travaux, nous avons donc pris le parti de nous y intéresser de plus près, en considérant bien l'apport alimentaire du lactium, c'est à dire de l'hydrolysate total, dont l'effet après ingestion sur l'anxiété est bien établi, et en laissant de côté le problème de l'identification ou de la confirmation de la molécule active. Nous nous sommes ainsi concentrés sur l'étude de ses effets potentiels sur la régulation du sommeil et des voies d'action mises en œuvre.

Outre l'enjeu que représente la découverte d'un moyen d'agir favorablement sur le sommeil par l'alimentation, ces travaux peuvent également permettre de mieux comprendre les interactions entre stress et sommeil.

3.2.3 Les études réalisées

3.2.3.1 Caractérisation de l'influence de l'ingestion du lactium sur le sommeil

Dans un premier temps, le but de notre travail a été de répondre à la question de l'existence d'un effet de l'apport alimentaire du lactium sur le sommeil, puis de caractériser sa nature et les conditions dans lesquelles il peut être mis en évidence. Nous avons travaillé sur le modèle animal du rat mâle Wistar.

3.2.3.1.1 La construction du modèle expérimental

Nous avons tout d'abord supposé que, tout comme les molécules anxiolytiques et sédatives de type benzodiazépines, le lactium pourrait exercer à forte dose un effet hypnotique ou tout au moins avoir un impact sur la composition du sommeil en SOL et SP. Au cours d'une étude préliminaire, nous avons donc apporté le lactium au début de la période d'activité des animaux (au début de la nuit), et ceci à une dose 10 fois supérieure à celle permettant d'obtenir un effet anxiolytique (soit, 150 mg/kg par rat et par jour). Cette étude, qui ne nous a pas permis de constater d'effets significatifs du lactium sur le sommeil, ni à court ni à long terme, nous a permis d'écarter l'hypothèse d'une action hypnotique à forte dose.

Nous avons alors émis le postulat que si le lactium a un effet sur le sommeil, alors cet effet doit s'exercer selon des mécanismes proches de l'effet anxiolytique, et s'observera le mieux dans les mêmes conditions. Nous sommes donc partis d'un modèle très proche de celui sur lequel l'effet anxiolytique a été mis en évidence, en étudiant chez le rat les conséquences d'un apport alimentaire de lactium, à la même dose que celle qui avait donné la meilleure réponse sur l'anxiété (15 mg/kg par rat et par jour), dans un contexte d'alimentation standard d'entretien apporté ad libitum. L'effet sur l'anxiété ayant été mis en évidence à court terme (à peu près une heure après l'ingestion, chez l'animal comme chez l'homme), nous avons aussi suivi l'évolution du sommeil à court terme après l'ingestion. Nous avons ainsi choisi d'apporter le lactium au début de la période diurne du cycle jour-nuit (pour le rat, la période diurne du cycle jour-nuit est celle où il concentre la majorité de son temps de sommeil, soit l'équivalent de la nuit chez l'homme).

Enfin, comme l'effet anxiolytique du lactium a été observé chez les animaux après induction de conditions stressantes (les conditions dans lesquelles sont pratiquées les tests comportementaux d'anxiété), et comme, d'autre part, la réponse semble être plus importante chez les individus en situation de stress comportemental, il nous est apparu intéressant d'étudier son effet sur le sommeil chez des animaux en conditions normales, mais également chez des animaux stressés. Pour cela, nous avons décidé d'employer un modèle expérimental de stress chronique classiquement utilisé pour induire l'anxiété chez l'animal : le stress environnemental modéré chronique, constitué de perturbations peu intenses mais multiples de divers paramètres environnementaux (luminosité, bruit, inclinaison de la cage, etc...).

3.2.3.1.2 Les hypothèses en jeu

Nous avons distingué deux hypothèses de fond sur la question de l'influence du lactium sur le sommeil dans notre modèle expérimental : la première, que le lactium exerce une action directe sur l'organisation du sommeil, sa composition et sa durée ; la deuxième, que le lactium n'influence la régulation du sommeil que de manière indirecte, par le biais de ses propriétés anxiolytiques. On peut imaginer à titre d'exemple que l'apport alimentaire de lactium n'aura d'influence sur le sommeil qu'en situation de stress, en exerçant un effet anxiolytique qui limitera les conséquences du stress sur l'organisme et sur le sommeil.

Nous avons donc cherché à répondre aux questions suivantes. Peut-on observer un effet positif ou négatif du lactium sur le sommeil des animaux ? Si oui, peut-on caractériser cet effet sur plusieurs jours ou est-il transitoire ? Cet effet est-il indépendant ou non de l'effet anxiolytique ? Dans quelle mesure l'effet sur le sommeil et sur l'anxiété sont-ils liés ?

3.2.3.2 Etude des voies d'action du lactium

Dans un deuxième temps, notre travail a eu pour but d'interroger les voies d'action mises en œuvre dans les influences comportementales du lactium que nous avons observées. En particulier, nous avons cherché à identifier les voies impliquées dans la transmission du signal (issu de l'ingestion du lactium) vers le système nerveux central, notamment par l'étude de l'éventuelle implication du nerf vague dans cette transmission et dans la réalisation des effets observés.

3.3 Première phase de travail : étude de l'effet d'une supplémentation au lactium sur le sommeil d'animaux en conditions normales ou stressés. Effet direct ou effet indirect lié à son effet anxiolytique ?

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans la revue Peptides en 2005 (voir Article 3 à la fin de la Partie).

3.3.1 Résumé de l'étude

3.3.1.1 Description du modèle expérimental

Chaque groupe de rats utilisé a tout d'abord été habitué à un cycle jour-nuit inversé artificiellement avec début de la période de jour, à 18h. Ils ont été nourris à satiété avec un régime d'entretien standard sous forme de croquettes. Ils ont également été habitués à prendre par voie orale, tous les jours à 18h, une dose de 0.3 ml du véhicule (Fortimel, produit de forte appétence mais peu calorique) dans lequel serait plus tard mélangé le lactium. De cette manière, pendant la période de supplémentation, le traitement que constituait soit le lactium, soit le placebo, a pu être administré à chaque rat par voie orale et à la dose voulue. Cela a été répété chaque jour de la période de supplémentation à 18h00, c'est à dire juste avant le début de la phase lumineuse du cycle jour-nuit. Pendant cette période, nous avons maintenu les animaux soit dans des conditions normales, soit dans des conditions de stress. Dans ce dernier cas, nous les avons soumis à un modèle expérimental de stress chronique par l'application de différents stimuli de stress environnementaux modérés, peu intenses mais répétés pendant toute la période de traitement. Ce modèle, qui est connu pour entraîner chez le rat des répercussions semblables à celles du stress chez l'homme, est en outre susceptible de provoquer des perturbations du sommeil (72).

Dans ces différentes conditions, nous avons suivi l'influence du traitement (ingestion du lactium) sur la quantité de sommeil total, mais aussi sur la quantité de sommeil lent et de sommeil paradoxal. Pour ce faire, nous avons utilisé une procédure d'étude du sommeil par l'acquisition puis le traitement du signal EEG (voir Annexe 2), qui a en grande partie été mise en place et validée au laboratoire à l'occasion de nos propres travaux. Cette procédure inclut notamment une analyse semi-automatique du signal EEG qui permet à la fois d'accélérer et d'homogénéiser la discrimination des différents stades de la vigilance tels que l'éveil, le SOL et le SP. L'enregistrement et l'analyse des stades de vigilance ont toujours été réalisés sur 16 heures à partir de 18h (début de la phase de repos et heure du traitement) jusqu'à 10h le lendemain, dans le but de couvrir la plus grande partie du sommeil journalier.

L'étude du sommeil nous a montré que nous avons bien réussi, par l'application de notre modèle expérimental de stress chronique, à établir un modèle de perturbations du sommeil induites par le stress. En effet, indépendamment du traitement, on observe une forte réduction de la durée du sommeil, et ce aussi bien sur le sommeil lent que sur le sommeil paradoxal. Cependant, il est à noter qu'en raison d'un probable processus d'habituation des animaux, les valeurs de sommeil reviennent progressivement à la normale, dès le deuxième jour de stress.

3.3.1.2 Existence d'un effet de la supplémentation au lactium sur le sommeil

Le premier résultat que nous avons obtenu est celui de l'absence d'effet du traitement sur les quantités de sommeil total, de SOL ou de SP en conditions normales. Il semble donc clair qu'en conditions normales, lorsque le sommeil n'est pas perturbé, le lactium n'exerce aucun effet sur le sommeil, sa durée totale ou sa composition.

Les résultats sont très différents pour les animaux soumis à notre modèle expérimental de stress chronique. Nous avons observé un effet très significatif de la supplémentation au lactium sur les perturbations de sommeil induites par le stress, pendant les deux premiers jours du traitement. L'ingestion du lactium réduit la perte de sommeil induite par le stress, et ce aussi bien pour le sommeil lent que pour le sommeil paradoxal (qui augmente même légèrement). Il exerce donc un effet globalement protecteur vis à vis des perturbations induites par le stress.

Notre modèle ne permettant pas d'installer des perturbations du sommeil liées au stress sur plus de deux jours, nous n'avons pas pu déterminer si l'effet protecteur de l'ingestion du lactium sur le sommeil pouvait se prolonger au-delà.

Ces résultats ayant mis en évidence un effet du lactium uniquement sur les perturbations du sommeil associées au stress, il semble bien que l'effet observé soit un effet indirect consécutif à l'action anxiolytique du traitement, et non un effet somnogénique direct. Nous avons voulu le vérifier.

3.3.1.3 L'effet sommeil du lactium chez les animaux en situation de stress est il bien lié à son effet anxiolytique ?

L'accumulation de conditions stressantes est connue pour entraîner une suractivation du système nerveux central, notamment des systèmes de l'éveil, et peut se traduire à la fois par de l'anxiété et des troubles du sommeil. L'hypothèse selon laquelle l'effet du traitement sur le sommeil est la conséquence d'un effet du traitement sur l'état de stress des animaux est donc plausible. Il existe alors deux possibilités pour expliquer l'effet du lactium sur le sommeil : 1) soit cet effet est une conséquence secondaire d'un effet global du lactium sur l'anxiété (par exemple par une baisse générale de l'hyperactivité des systèmes de réponse au stress), les perturbations du sommeil étant des conséquences secondaires de l'anxiété induite par le stress ; ou bien 2) soit il est l'expression d'une protection spécifique des mécanismes de régulation du sommeil, sans que cela ait un impact sur la réponse globale au stress.

Nous avons donc cherché si l'on pouvait vérifier, dans notre modèle, un effet du traitement sur l'anxiété des animaux et quelles étaient les voies de la réponse au stress qui étaient affectées.

Pour cela, nous avons d'abord essayé de caractériser, au moyen d'un test comportemental très classique (97), le test en « openfield » (voir Annexe 5), l'effet des deux premiers jours de la procédure de stress chronique, et l'effet du traitement, sur les paramètres comportementaux propres à l'anxiété. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence d'effet significatif du traitement, ni même de la procédure de stress, sur ces paramètres. Il est cependant possible que le dispositif de test en « open-field », que nous avons préalablement validé pour caractériser l'influence d'un stress aigu sur le comportement, ne soit pas assez discriminant

pour révéler des altérations comportementales dans des conditions de stress chronique et modéré.

Nous avons ensuite décidé d'aller analyser l'impact de la procédure de stress chronique et du traitement sur certains paramètres physiologiques sanguins de la réponse au stress (58), tels que le taux de corticostérone plasmatique (marqueur spécifique de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénales, une des deux grandes branches du système de la réponse au stress) et la glycémie (marqueur global du système de la réponse au stress, dont la deuxième de ses branches : la suractivation du système noradrénergique central et du système nerveux sympathique). Nous avons donc, tout au long de la procédure des deux jours d'application des conditions de stress chronique, prélevé le sang de rats munis d'un cathéter (voir Annexe 6) pour analyser l'effet du traitement sur l'évolution des concentrations de ces marqueurs. Cette étude n'a pas non plus permis de mettre en évidence de différences majeures liées aux conditions de stress ou au traitement. Le seul effet visible est celui d'une baisse de la glycémie chez le groupe placebo au cours du premier jour de stress qui semble évitée chez le groupe traité au lactium.

Comme cela fut le cas lors du test en « open-field », nous avons constaté que les conditions de stress modéré (faible intensité et répétition aléatoire dans le temps), que nous avons choisies d'appliquer dans notre modèle expérimental, sont difficiles à caractériser par les paramètres d'étude classiques du stress. Toutefois, ces résultats semblent indiquer que la très forte perturbation du sommeil malgré tout induite par la procédure de stress est plus probablement liée à une stimulation transitoire mais répétée du système noradrénergique (qui pourrait bien entraîner la chute de la glycémie observée) qu'à une hyperactivité de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénales (étant donné que nous n'observons pas de conséquences significatives sur la sécrétion de corticostérone).

3.3.2 Conclusions sur la nature de l'effet du lactium sur le sommeil

3.3.2.1 Pas d'effet sédatif ou hypnotique lié à l'ingestion du lactium dans notre modèle

Dans notre modèle, nous avons pu constater que l'ingestion du lactium ne semble pas exercer d'effet sédatif ou hypnotique propre, puisque ni en conditions normales, ni en conditions de stress chronique, il n'apparaît augmenter le temps de sommeil au delà de la valeur de référence. Pour nous en assurer, il faudrait étudier l'influence de la dose de lactium apportée aux animaux, et notamment ce qui ce passerait si nous l'augmentions. En effet, il ne peut être exclu que pour un rat, la dose de 15 mg/kg par jour ne permette d'observer qu'un effet anxiolytique, mais qu'une influence plus spécifique sur le sommeil puisse être observée pour des doses plus élevées, comme c'est le cas, par exemple, pour certaines benzodiazépines. Toutefois, les indications que nous avons eu dans nos études préliminaires ainsi que les retours des études d'évaluation de la toxicité pour des fortes doses ne semblent pas faire état de cette caractéristique.

3.3.2.2 Effet protecteur de l'ingestion du lactium sur les pertes de sommeil induites par le stress

En revanche, nous avons montré, grâce à ce modèle, que le lactium semble pouvoir protéger des perturbations du sommeil induites par le stress. Etant donné l'absence d'effets sur le sommeil en conditions normales, ceci semble bien être une composante des propriétés anti-stress du lactium, au même titre que ses propriétés anxiolytiques. L'effet protecteur, qui s'exerce à court terme sur le temps de sommeil journalier suivant le traitement, concerne aussi bien le sommeil lent que le sommeil paradoxal.

A l'avenir, il faudrait quelque peu modifier notre modèle en faisant varier d'avantage les types de stress ou en augmentant l'intensité des stimulus stressants, afin de faire durer plus longtemps les troubles induits sur le sommeil, et voir si l'effet protecteur de l'ingestion du lactium continue à s'exercer à moyen ou long terme. Il serait également intéressant de voir si un traitement préalable pendant une durée de plusieurs jours permet de potentialiser ou non l'effet protecteur du lactium sur les troubles du sommeil.

Toutefois, conformément à ce que nous avons supposé, ces résultats nous montrent bien que dans certaines conditions, le lactium constitue bien un produit potentiellement susceptible de moduler la régulation du sommeil par voie alimentaire.

3.3.2.3 Des limites et des zones d'ombre pour expliquer les mécanismes par lesquels le lactium agit sur le sommeil

Les zones d'ombre qui persistent pour expliquer l'effet protecteur du lactium sur le sommeil sont de deux ordres.

3.3.2.3.1 Lien entre effet sommeil et effet anxiolytique : des questions restent en suspens

Les premières zones d'ombre sont celles qui ont trait aux conséquences de l'ingestion du lactium sur l'anxiété et sur le système de la réponse au stress : l'effet sur le sommeil en conditions de stress environnemental est-il une conséquence de l'effet anxiolytique ou bien est-il l'expression d'une action plus spécifique sur le système nerveux central ? Les résultats que nous obtenons ne nous donnent que de faibles indices de variations du système de réponse au stress dans nos conditions expérimentales, moins intenses que ce que nous attendions. Il apparaît ainsi peu probable que notre protocole ait permis d'entraîner une importante induction du système de réponse au stress chez les animaux bien que la durée du sommeil ait été diminuée. Il nous est ainsi difficile de conclure sur la question du lien entre l'effet sommeil et l'effet anxiolytique du traitement.

Par exemple nous ne constatons aucun effet lié aux conditions de stress chronique ou au traitement sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénales (HHS). L'effet du lactium qui a été caractérisé par ailleurs chez l'homme et qui apparaissait lié à une baisse de l'activité de l'axe HHS (96) ne semble donc pas entrer en jeu ici. Pour conclure sur ce point, il faudrait toutefois envisager d'appliquer à notre modèle un stress plus fort, davantage propice à entraîner une réponse de l'axe HHS.

En revanche, comme l'application de notre procédure de stress modéré chronique semble entraîner une chute de la glycémie, et que celle-ci n'est pas corrélée à une variation de la concentration plasmatique de corticostérone, nous avons supposé qu'elle pouvait traduire l'augmentation de l'activité du système noradrenergique central et du système nerveux

sympathique en réponse aux stimuli de stress. Or, sur ce point, le traitement semble exercer un effet puisqu'il permet de maintenir la glycémie au niveau des valeurs de référence.

Il est très regrettable de n'avoir pas pu aller plus loin sur cette hypothèse. Il faudrait envisager de suivre des paramètres physiologiques plus spécifiques que la glycémie de la voie du système de la réponse au stress que constitue la suractivation du système noradrenergique et du système nerveux sympathique. Dans un premier temps, il serait ainsi très intéressant d'effectuer des dosages de l'adrénaline et noradrénaline plasmatique, et de suivre leur évolution en fonction de la procédure d'application du stress et du traitement. Si cela était vérifié, nous pourrions alors avancer que l'effet de l'ingestion du lactium sur les troubles du sommeil s'exerce par la modulation précoce de l'hyperactivité adrénergique induite par le stress. C'est également par cette voie que l'on pourrait expliquer, sur d'autres modèles, la présence d'un effet anxiolytique. Cette hypothèse, qui a le mérite d'être cohérente avec l'hypothèse d'une action du lactium par une activité du peptide casozépine sur la transmission GABAergique, bien connue pour moduler le système d'activation adrénergique, reste cependant à démontrer.

3.3.2.3.2 Mode d'action du lactium : la grande inconnue

La deuxième catégorie de limites est celle des multiples incertitudes et inconnues en ce qui concerne le mode d'action de cet hydrolysate, apporté par voie alimentaire, sur le système nerveux central. Un principe actif potentiel, le peptide casozépine, a bien sûr été identifié, mais il existe peu de certitudes à son sujet. Sa capacité à induire le même effet que le lactium sur le sommeil reste en outre à démontrer. Il peut également très bien exister dans le lactium d'autres principes actifs potentiels, susceptibles d'agir sur le système nerveux central, comme certains peptides à activité opiacée déjà connus pour leur activité de ligands sélectifs des récepteurs δ (94, 95). Une autre inconnue très importante, en dehors de l'identité du ou des fragment(s) actifs de l'hydrolysate et de leur(s) cible(s) est celle de leur mécanisme d'action.

Partons du postulat que les principes actifs potentiels du lactium exercent leurs effets au niveau du système nerveux central, et éliminons pour l'instant l'hypothèse d'un site d'action intermédiaire, situé autre part dans l'organisme. Il existe alors deux possibilités : soit ils atteignent leur cible par voie sanguine, soit ils l'atteignent par voie nerveuse.

La première option implique qu'ils soient absorbés lors de la digestion et passent la barrière intestinale pour se retrouver dans la circulation sanguine, puis qu'ils échappent aux nombreuses peptidases sanguines pour pouvoir arriver jusqu'aux récepteurs situés dans le cerveau. Cette hypothèse est très improbable : jusqu'à présent, les recherches ont toujours indiqué que les peptides plus grands que des tripeptides ne peuvent pas passer l'endothélium digestif de l'adulte en quantité significative (69). En ce qui concerne le lactium trypsique de la caséine α_{s1} bovine ou le peptide casozépine, aucun résultat sur les cinétiques d'absorption n'a jusqu'à maintenant permis de prouver qu'ils bénéficiaient d'un mode d'absorption privilégié. Cependant, on ne peut rejeter totalement ce premier mécanisme. On sait que la perméabilité intestinale n'est pas quelque chose de totalement figé : l'intestin du nouveau né est beaucoup plus perméable, et il a déjà été mis en évidence chez eux que des peptides à activité tels que les β -casomorphines (134, 146) peuvent être absorbés et exercer des effets comportementaux. En outre, quelques études ont montré la présence de peptides à activité biologique dans le sang de rats adultes ou d'humains après leur ingestion (13, 43, 144). Il n'est donc pas impossible qu'un taux d'absorption non négligeable puisse se produire, d'autant que certaines études ont mis en évidence des augmentations de perméabilité de la barrière hémato-intestinale sous diverses conditions de stress (53, 135). On ne peut donc exclure l'hypothèse que quelques molécules actives puissent tout de même passer la barrière intestinale et se retrouver en petit nombre au contact des récepteurs centraux.

La deuxième possibilité est que les fragments actifs du lactium exercent leur action au niveau central par voie nerveuse. L'effet pourrait être alors induit par l'activation de récepteurs sur des fibres nerveuses sympathiques ou parasympathiques sous-épithéliales. Ce mécanisme présente l'avantage sur le précédent que les peptides n'ont pas besoin d'être absorbés car ils pourraient agir directement sur des récepteurs spécifiques au niveau de la membrane des cellules endothéliales ou entéroendocrines qui composent la muqueuse intestinale, celles-ci servant ensuite de relais dans la transmission du signal aux fibres nerveuses. On sait déjà que le nerf vague joue un rôle dans la détection chimique des macronutriments présents dans le tube digestif, et dans la transmission de cette information au niveau central avec entre autres conséquences, la modulation du comportement alimentaire (111). Dans ce contexte, il est donc tentant d'envisager que le nerf vague puisse posséder d'autres rôles plus spécifiques comme celui, à partir de la détection de molécules particulières dans l'intestin, de transmettre un signal permettant de moduler d'autres fonctions, telles que la réponse au stress et le sommeil. Nous avons voulu tester cette hypothèse dans la deuxième phase de notre travail.

3.4 Deuxième phase de travail : étude complémentaire sur les mécanismes d'action du lactium. Implication du nerf vague dans l'effet anxiolytique et protecteur du sommeil ?

3.4.1 Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, le lactium pris par voie orale semble pouvoir exercer une activité anxiolytique et également un effet protecteur sur les perturbations de sommeil liées au stress. Il s'agit donc visiblement d'une action sur le système nerveux central. Cependant, la compréhension des mécanismes mis en œuvre est encore très incomplète. Comme il semble peu probable que l'éventuelle substance active du lactium passe en quantités suffisantes dans la circulation sanguine pour atteindre directement des récepteurs centraux, nous avons fait l'hypothèse que l'action du peptide était plus probablement relayée par le nerf vague, à partir d'un mécanisme encore inconnu de détection locale, dans la lumière du tube digestif, de la présence du peptide casozépine ou d'une autre substance active du lactium. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une médiation vagale de cet effet.

Nous avons fait l'hypothèse que le nerf vague, et plus précisément les afférences chémoréceptrices du nerf vague participent aux effets comportementaux du lactium et nous avons cherché à le vérifier.

3.4.2 Principe

Les neurones afférents du nerf vague se divisent en deux catégories anatomiquement et fonctionnellement distinctes : des fibres de petit diamètre dites fibres de type C qui sont amyélinisées et possèdent par conséquent une vitesse de conduction de l'ordre de 1,4m/s, et des fibres dites de type A, myélinisées et présentant des vitesses de conduction pouvant atteindre 14m/s. Parmi les afférences vagales, les fibres amyélinisées seraient responsables de la transmission des informations relatives à la détection chimique des nutriments (27, 108,

109, 111, 112, 126). Ainsi, dans le cas d'une transmission de l'information relative à la présence d'un principe actif peptidique, le transfert de l'information devrait vraisemblablement être assuré par des afférences vagues de type C.

Les fibres de type C expriment des récepteurs spécifiques de la capsaïcine. Cette propriété physiologique ouvre des possibilités méthodologiques intéressantes. Un excès de capsaïcine conduit, en effet, à la destruction spécifique par excitotoxicité des neurones sensibles à la capsaïcine. Ce type de traitement permet donc de supprimer spécifiquement la sensibilité viscérale chimique. Cette opération est appelée déafférentiation sélective.

3.4.3 Déroulement de l'étude

3.4.3.1 Animaux

40 rats mâle (Wistar (Harlan)) pesant 250 g au début de l'expérience ont été utilisés pour cette étude. Les rats étaient hébergés en cages individuelles dans une pièce à température contrôlée. Les rats étaient soumis à un cycle jour-nuit, avec début de la phase lumineuse à 9h00.

3.4.3.2 Traitement à la capsaïcine

20 rats (groupe capsaïcine) ont été traités avec des injections successives de doses croissantes de capsaïcine (90% grade, Sigma Chemical, St Louis, MO). La solution de capsaïcine a été obtenue en dissolvant la poudre de capsaïcine dans une solution véhicule à base de Tween 80 (10%), de DMSO (10%) dans une solution de NaCl 0.9% (80%). Une série de 3 injections sous-cutanées (sous la peau du cou) ont été réalisées sur une période de 24h. Les rats ainsi traités ont reçu une première dose de capsaïcine (25 mg/kg), puis deux autres doses de solution de capsaïcine (50 mg/kg), toutes les injections étant espacées de 12h et réalisées sous anesthésie par inhalation d'halothane. Dix min avant chaque anesthésie, les rats recevaient le traitement préventif d'une injection de sulfate d'atropine (15 mg/ml, 0.2 ml, IP). La réussite de la déafférentiation peut être validée, d'une part, par la vasodilatation cutanée, d'autre part par la disparition du réflexe chimique cornéen (81). Les 20 rats du groupe témoin ont subi un traitement similaire, et ont reçu l'injection du véhicule dans les mêmes conditions que les rats traités.

3.4.3.3 Suivi des traitements et abandon de l'étude

A la suite des injections, il a été constaté une mortalité extrêmement élevée des rats au cours du traitement à la capsaïcine. En effet, seuls 20% des rats ont survécu pour recevoir une troisième injection de capsaïcine, à laquelle ils semblaient alors résister. En dehors de la mortalité des animaux, les réactions que ceux-ci présentaient après les injections de capsaïcine révélaient un très important problème de douleur pour ces animaux. Nous avons donc immédiatement décidé d'arrêter l'étude pour des raisons d'éthique et de bien-être animal évidentes. Les animaux qui avaient survécu aux injections de capsaïcine ont été euthanasiés le plus rapidement possible.

L'absence de mortalité liée au traitement chez les rats témoins nous a permis d'éliminer l'hypothèse d'un problème lié au véhicule utilisé, à l'injection ou à l'anesthésie. Après avoir comparé notre protocole à celui d'autres études publiées et pris renseignements auprès de laboratoires utilisant cette technique pour comprendre l'origine du problème, la seule réponse qui a pu être apportée était celle d'un manque de résistance à la capsaïcine des rats obtenus chez le fournisseur. Cette réponse, peu convaincante, nous a en tous cas conduit, en accord avec nos partenaires, à abandonner l'étude de l'implication du nerf vague dans l'effet lié au lactium par cette méthode de déafférentiation vagale sélective. Nous en sommes donc restés là sur ce point.

3.5 Conclusions et Perspectives

Jusqu'à aujourd'hui, très peu d'études ont pu démontrer l'effet de peptides dérivés de l'alimentation et administrés par voie orale sur l'organisme adulte. Elles sont encore plus rares à leur reconnaître un impact sur le système nerveux central et par voie de conséquence un quelconque effet comportemental. Notre travail révèle pour la première fois un tel type d'effet comportemental en montrant que le lactium est capable d'empêcher la diminution de la durée du sommeil en réponse à un stress chronique modéré. Ce résultat pose cependant des questions fondamentales qui constituent de très intéressantes pistes de recherche.

D'une part la nature de l'effet du lactium pose encore question : sur quoi agit-il et comment cela permet-il de modifier les mécanismes de régulation du sommeil ? On le voit, cette question revient également à s'intéresser aux multiples interactions entre la régulation du sommeil et la régulation de la réponse au stress. Dans cette optique, le modèle expérimental de perturbations du sommeil induites par le stress que nous avons créé constitue d'ailleurs en lui-même un outil de travail très intéressant.

D'autre part, la question des mécanismes et voies d'action par lesquels le lactium agit reste ouverte. Il semble ainsi nécessaire de poursuivre les expériences visant à déterminer les mécanismes d'action systémiques ou nerveux par lesquels le lactium, et les substances actives d'origine peptidiques qu'il contient, peuvent exercer leur action. Le modèle que nous avons créé peut être utilisé à cette fin, mais d'autres modèles dans lesquels le lactium a montré l'induction d'un effet significatifs (comme différents tests d'anxiété) peuvent être utilisés. Dans un premier temps, nous pourrions envisager de valider l'hypothèse d'une action du peptide casozépine pur et de la comparer quantitativement à l'action du lactium. Cette étude pourrait permettre d'identifier clairement si le principe actif contenu dans le lactium est bien celui que l'on soupçonne. Dans un deuxième temps, nous pourrions tester l'hypothèse de l'implication du nerf vague en analysant les résultats obtenus avec l'ingestion du lactium ou du peptide casozépine pur, chez des animaux ayant subi une opération chirurgicale de vagotomie subdiaphragmatique qui, si elle demande une opération chirurgicale un peu lourde, semble finalement être mieux supportée par les animaux que les injections de capsaïcine. En parallèle, il serait intéressant de tester l'hypothèse d'une action directe du peptide casozépine

sur les récepteurs GABA-A centraux en analysant la persistance de l'effet après injection d'un inhibiteur des benzodiazépines tel que le flumazénil. Dans notre modèle expérimental, l'étude de l'évolution de la perméabilité de l'endothélium intestinal pourrait également permettre d'ouvrir de nouvelles perspectives sur les mécanismes par lesquels ce produit, mais aussi d'autres peptides à activité biologique issus de l'alimentation pourraient agir de manière privilégiée en situation de stress.

Enfin, comme l'ingestion du lactium semble capable de rétablir un sommeil dans lequel les durées de SOL et de SP sont proches de l'état normal quand il est altéré par le stress, la possibilité de son utilisation pour des objectifs thérapeutiques chez l'homme, notamment dans le cas d'insomnies liées au stress et à l'anxiété, apparaît très prometteuse. Cependant, envisager l'utilisation du lactium ou d'un éventuel principe actif dans le cadre d'un traitement thérapeutique, ainsi que déterminer les conditions et les limites dans lesquels il peut être efficace sur une régulation aussi complexe que celle du sommeil, constitue en soi une autre piste de recherche encore inexplorée.

Article 2 : Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease, Section IV: Body's Nervous System, Chapter 17: Opioid Peptides

17 Opioid Peptides

*Daniel Tomé, Benjamin Guesdon,
and Lisa Pichon*

CONTENTS

17.1 Opioids.....	367
17.1.1 The Mammalian Opioidergic System: Opioid Receptors and Endogenous Ligands.....	367
17.1.2 Exogenous Opioid Agonist and Antagonists	369
17.1.3 Functional Significance of Nutraceutical Opioid Peptides	372
References	373

17.1 OPIOIDS

The existence of opioid receptors, suspected for quite a long time, was simultaneously demonstrated in the mammalian organism in 1973 by three groups (1–3). Shortly thereafter, Kosterlitz’s group presented evidence of the presence of endogenous ligands for these receptors in mammals (4). When opioid binding sites were first demonstrated, it was thought that opioid receptors represented a homogeneous group. Since that time, a lot of information has been collected on opioid receptors and their ligands both in mammals and in lower organisms. It was realized that there are, in fact, multiple opioid peptides, each of which could have its own receptor. This review is focused on exorphins — exogenous opioid peptides that are derived from food protein and could share several physiological roles in the organism.

17.1.1 THE MAMMALIAN OPIOIDERGIC SYSTEM: OPIOID RECEPTORS AND ENDOGENOUS LIGANDS

The mammalian opioidergic system consists of opioid receptors and their endogenous ligands — endogenous opioid peptides. Depending on their location, their physiological significance appears to be related to a considerable number of neuroendocrine regulatory functions.

Opioids receptors are most abundant in the central nervous system (5–7) but have also been localized in many peripheral tissues of the mammalian organism (8). Opioid receptors belong to the big family of G-protein-coupled receptors.

They consist of both a recognition site, to which the ligand binds itself, and an effector responsible for translating the binding into intracellular biochemical events that lead to a biological response. Effector systems activated or blocked upon opioid receptor–G-protein interaction are adenylyl cyclase, Ca²⁺ channels, K⁺ channels, or phosphoinositol turnover. Opioid receptor binding is saturable and of high affinity and displays stereo-specificity. The first definitive pharmacological evidence for multiple opioid receptors was published by Martin and colleagues (9,10). There are several receptor types, μ -, δ -, and κ -opioid receptors (μ - for morphine, δ - for deferens, and κ - for ketocyclazocine), which again can be divided into subtypes, that is, μ_1 - μ_2 receptors and so on. Further receptors, named the ϵ -opioid receptor (11) and the iota-opioid receptor (12) (ϵ - for SFK 100047, N-allyl-normetazocine, and iota for ileum because that is where it was found), have also been reported to occur. Whereas these opioid receptor types and subtypes have been well known for quite some time, yet another member of the opioid receptor family (ORL1, LC132, and so on) has recently been demonstrated by several groups (13,14). This receptor, in contrast to μ -, δ -, and κ -receptors, does not mediate typical opioids but rather has antioioid effects. Other receptors found in very specific areas — rat brain, murine neuroblastoma cells (lambda-receptor and zeta-receptor) — have been demonstrated.

AQ1

Soon after the first demonstration of opioid receptors in the organism, the first endogenous ligands of these receptors were also identified. These “endogenous opiates,” as they were named immediately after their detection, turned out to be peptides. During the following two decades, many of these “opioid peptides” were identified. Originating from only three separate precursor molecules, proenkephalin (PENK), prodynorphin (PDYN), and proopiomelanocortin (POMC), they are named enkephalins, dynorphins, and endorphins, respectively (15). The common structural feature among opioid peptides is the presence of a tyrosine residue at the amino terminal end (except α -casein opioids) and the presence of another aromatic residue, for example, phenylalanine or tyrosine, in the third or fourth position. This is an important structural motif that fits into the binding site of opioid receptors. The negative potential, localized in the vicinity of the phenolic hydroxyl group of tyrosine, seems to be essential for opioid activity. Removal of the tyrosine residue results in total absence of bioactivity (16). Although it is still not clear how these different endogenous peptides are matched with the multiple subtypes of opioid receptors, they seem to be localized within separate neuronal systems: met- and leu- enkephalinergic, dynorphinergic, and β -endorphinergic neurons. These opioids are synthesized in many neuronal systems and often have synaptic interaction with other neurotransmitters (acetylcholine, epinephrine, norepinephrine, GABA, substance P, serotonin). Although most of them bind to more than one type of opioid receptor, certain selectivities are obvious, for example, selectivities of dynorphins for κ -receptors, or enkephalins for δ -receptors, or of endorphins not only for μ - or δ - but also for ϵ -receptors (17).

What can be deduced about the physiological or pathophysiological functions of opioid systems? On the one hand, there are well-defined maps of the distribution of opioid peptidergic systems and multiple receptor types; and on the other

hand, there are numerous pharmacological studies investigating the functional consequences of administering diverse opiate agonists or antagonists. The task of integrating these two areas of work is difficult because of striking discrepancies in the anatomical distribution of opioid neuronal systems and receptor types; as well, there are considerable uncertainties in relating the pharmacological effects of agonists or antagonists (or opioid peptides coming from digestion of food protein, see below), acting on one or more particular receptor types to the potential actions of specific opioid neuronal systems that generally have a poorly defined relationship to these receptors. To make matters even more confusing, it appears that opioid precursors are differentially processed in different opioid neuronal systems (18–20). Even for peptides with relatively high selectivity for a particular receptor type, it is likely that “cross-over” to other opioid receptor types occurs if there is a relative paucity of the “preferred” receptor type in a given brain region (21). To add further complexity, there is evidence of differences among species in the processing of opioid peptides and in the relative abundance of different opioid receptors types (22).

AQ2

There is a plethora of studies on the physiological and behavioral effects of administering different opioid peptides or nonpeptidergic opiate agonists or antagonists (23). However, it has still been difficult to draw firm conclusions regarding the functional roles of different opioid receptor types in any neuronal system. Particularly interesting candidates for the functional roles of endogenous opioids would be immunological significance, control of gastrointestinal functions, all kinds of central nervous functions such as stress adaptation, and the control of reproductive mechanisms. Concerning nervous functions, the relatively large concentrations of opioid peptides and their receptors in limbic structures involved in mood regulation has given rise to the notion that opioid peptidergic systems may play a role in the pathophysiology of mental illness and in the activity of psychotropic drugs. Clinically, there is some — although still rather tenuous — evidence that opioid peptides may relieve symptoms in depressed patients and that naloxone may do so in manic patients. The antidepressive action of electroconvulsive treatment may involve the release of endogenous opioid peptides.

17.1.2 EXOGENOUS OPIOID AGONIST AND ANTAGONISTS

Opioid receptors can interact with their endogenous ligands as well as with exogenous opioid agonists and antagonists (24). Two types of exogenous agonists and antagonists can be identified in view of their chemical structure : alkaloids and peptides.

Well-known opioid agonist alkaloids are opiates such as morphine, which are widely used for numbing most severe pain syndromes or for anesthetic purposes. Morphine and opiates of similar structure, traditionally extracted from plants or artificially synthesized, can also be biosynthesized in the mammalian organism. Interestingly, a compound whose chemical, pharmacological, and immunological properties were identical to those of morphine has been demonstrated in bovine and human milk (25). Opioid antagonists most frequently used by pharmacologists

and clinicians are the well-known synthetic alkaloids naloxone (26) and naltrexone (27). These opioid antagonists have been indispensable tools in opioid research (28). Alkaloid opioids can generally penetrate the blood barrier and therefore can be administered peripherally *in vivo*. They are also less subjected to metabolism than are peptides.

AQ3

But other kinds of exogenous opioid peptides were discovered and hence Teschemacher proposed to divide the opioid peptides into two groups, the first for the so-called typical opioid peptides, which derive from the three endogenous precursor molecules, and the second for the atypical opioid peptides comprising all others. Separation of “typical” and “atypical” opioid peptides is based on the following differences: “typical” opioid peptides all have the same N-terminal amino acid sequence Tyr-Gly-Gly-Phe; in contrast, “atypical” opioid peptides are derived from a variety of parent proteins; only a Tyr residue is obligatory for their N-terminal amino acid sequence (29) and, in further contrast to “typical” opioid peptides, N-terminal extensions of the sequence occur beyond the Tyr residue. The main data existing on these exogenous opioid peptides essentially concern “food-derived” opioid peptides, which are “atypical” opioids or antagonist opioids. They are called exorphins. These last peptides can originate from food protein digestion: whereas little is known about the presence and the efficiency of “typical” opioid peptides in this matter, a number of naturally occurring proteins have been shown to contain fragments with opioid activity. Some of these peptide fragments have been demonstrated to be released from their precursors under *in vivo* and *in vitro* conditions; other fragments have only been synthesized. The digestion of these parental proteins can result in the production of opioid peptides in the gastrointestinal tract. The main food-derived opioid peptides studied are the milk-protein-derived opioid peptides.

Milk proteins are potential sources of opioid agonistic and antagonistic peptides. They are inactive within the sequence of the precursor milk proteins, but they can be released and thus activated by enzymatic proteolysis, for example, during gastrointestinal digestion or during food processing. In fact, all typical milk proteins, α -casein, β -casein, κ -casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and lactoferrin (lactoferrin is not typical in a strict sense), have been shown to contain fragments which — either in natural form or modified to negligible or considerable extent — behave like opioid receptor ligands under *in vitro* or *in vivo* conditions. (29–31). They have been named α -casein exorphins or casoxin D (α -casein); β -casomorphins or β -casorphin (β -casein); casoxin or casoxin A, B, or C (κ -casein); α -lactorphins (α -lactalbumin); β -lactorphin (β -lactoglobulin); or lactoferroxins (lactoferrin). Most of them are selective for μ -opioid receptors, but some of them also have affinity for δ - or κ -receptors. Most of them are agonists, but antagonists such as casoxins and lactoferroxins also occur. It has been shown that relatively high amounts of bioactive peptides could potentially be produced during the ingestion of 1 g of each of the major casein and whey protein components. Some of these opioids are biologically highly potent. Therefore, even nutritionally insignificant amounts of liberated peptides might be sufficient to exert

TABLE 17.1
Examples of Opioid Peptides Derived from Bovine Milk Proteins

Bioactive Peptide	Sequence ^a	Precursor Protein	Theoretical Yield of Bioactive Peptide Obtainable from 1 g Precursor Protein (mg)
Opioid Agonists			
β -casomorphin-7	YPFPGPI	β -casein (f60–66)	33.0
β -casomorphin-5	YPFPG	β -casein (f60–64)	24.2
α s1-casein-exorphin	RYLGYLE	α s1-casein (f90–96)	38.7
α -lactorphin	YGLF	α -lactalbumin (f50–53)	35.2
β -lactorphin	YLLF	β -lactoglobuline (f102–105)	30.2
Serorphin	YGFNA	Serum albumin (f399–404)	10.5
Opioid Antagonists			
Casoxin A	YPSYGLNY	κ -casein (f35–42)	51.4
Casoxin B	YPYY	κ -casein (f58–61)	31.8
Casoxin C	YIPIQYVLSR	κ -casein (f25–34)	65.8

^aThe one letter amino acid code is used.

Source: H. Meisel, R.J. FitzGerald. *Br. J. Nutr.*, 84 (Suppl 1), S27–S31, 2000. With permission.

physiological effects (Table 17.1). Five opioid peptides showing selectivity for delta-receptor were also isolated from the enzymatic digest of wheat gluten. Their structures were Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr, Gly-Tyr-Tyr-Pro, Tyr-Gly-GlyTrp-Leu, Tyr-Gly-Gly-Trp, and Tyr-Pro-Ile-Ser-Leu, which were named gluten exorphins A5, A4, B5, B4, and C, respectively (32,33). A few studies report that other opioid peptide agonists or antagonists have been found in other food-derived peptides such as peptides derived from blood (34), soy (35), bovine mitochondrial cytochrome and spinach rubisco (36).

In addition to the possible liberation of bioactive peptides during intestinal proteolysis, such peptides may already be generated during the manufacture of several milk products and thus be ingested as food components. For example, partially hydrolyzed milk proteins used for hypoallergenic infant formulas and for clinical applications in enteral nutrition consist exclusively of peptides. Furthermore, it has been demonstrated that a number of caseolytic bacterial species used in the production of some types of cheese and other milk products can produce casomorphins. β -casomorphins have been produced by genetic engineering techniques followed by enzymatic or chemical cleavage of the microbial fusion protein to liberate the required peptide. These recombinant β -casomorphins are intended for oral administration in order to increase animal performance, for example, weight gain or milk yield. As yet, no meaningful application in human nutrition has been described.

AQ4

17.1.3 FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF NUTRACEUTICAL OPIOID PEPTIDES

We have seen that peptides with morphine-like activities, called exorphins, can be isolated from some food proteins. So, nutraceutical opioid peptides could theoretically interact with subepithelial opioid receptors or specific luminal binding sites in the intestinal tract. Furthermore, they may be absorbed and then reach the endogenous opioid receptors. Thus, it might be possible that those atypical opioid peptides that can be found in many foods could also participate in the general opioid regulations. But do these peptides have physiological or even pathophysiological significance? In order for exorphins to function as opioid peptides in the central nervous system *in vivo* they must: (a) survive degradation by intestinal proteases, (b) be absorbed without degradation into the blood stream, (c) cross the blood-brain barrier and thereby reach central opiate receptors, and (d) interact as opiates with their receptors.

The main data existing on this issue concern the milk-derived opioid peptides that appear to very likely have a functional role. Milk is known to contain many bioactive compounds (37), and the well-known nutritive and reproductive significance of milk constituents appears to match nutritive and reproductive functions, wherein certain endogenous opioid systems appear to be involved. The information collected so far about a functional role, however, varies considerably for the various milk-protein-derived opioid peptide groups. There is a growing body of information indicating that milk proteins and their derivatives by no means just serve as food but instead represent messengers with essential functions for their receivers and even their donors. Milk-protein derivatives able to interact with opioid receptors thus fit into this conception, and various physiological or pathophysiological functions have been ascribed to these peptides, in particular to the best-studied group, the β -casomorphins.

Results indicating the liberation of β -casomorphins from β -casein under *in vitro* (38,39) and *in vivo* (40) conditions have been obtained from several studies. Evidence has been obtained for the liberation of β -casomorphins from β -casein into the gastrointestinal lumen of mammals after intake of milk. Peptides were found in the small intestine contents of adult humans following intake of cow's milk and were identified by radioimmunological and chromatographical methods as β -casomorphins (39). Moreover, β -casomorphin-11 has been identified and chemically characterized in the duodenal chyme of Göttingen minipigs after they had been fed with bovine casein (40). It is claimed that β -casomorphins rapidly degrade once they enter the blood stream. However, the presence of β -casomorphin-7 immunoreactive material has been demonstrated in the plasma of newborn calves (41) or puppies (42) following their first milk intake. This material revealed a similar molar mass as β -casomorphin-11 and thus has been considered a β -casomorphin precursor, from which β -casomorphins could be released to elicit effects at any site in the newborn organism. Depending on the situation, the presence of β -casomorphins in the neonate's central nervous system could gain pathophysiological significance: recently, a role for β -casomorphins in sudden infant death syndrome has been proposed (43,44). According to current studies,

the absorption of peptides larger than di- or tripeptides is usually highly reduced in adults, but it could be enhanced in some specific situations such as in the neonate or during stress or aggression (45,46).

Thus, only the neonatal intestine appears to be permeable to food-derived opioid peptides such as casomorphins; in adult systems, the intestinal brush-border membrane seems to be the main target site for the physiological effects of food-derived opioid peptides. Particularly, as nutrients postulated to modulate gastrointestinal functions, β -casomorphins might fit into the concept of "food hormones." More likely, β -casomorphins interact with endogenous opioid systems in the gastrointestinal wall, in neonates as well as in adult milk consumers. Orally administered milk-protein-derived opioid peptides have been demonstrated to influence postprandial metabolism by stimulating secretion of insulin and somatostatin (47,48), modulate intestinal transport of amino acids (49), prolong gastrointestinal transit time, and exert antidiarrheal action (50). Evidence has accumulated that the enhancement of net water and electrolyte absorption by β -casomorphins in the small intestine is a major component of their antidiarrheal action, which could be mediated via subepithelial opioid receptors or through specific luminal binding sites at the brush-border membrane (49,51). β -casomorphins may also affect the human mucosal immune system, possibly via opiate receptors in lamina propria lymphocytes (52). Modulation of social behaviour (53,54) and analgesic effects (55,56) were observed following intracerebral administration of opioid peptides with agonistic activity, for example, β -casomorphins, to experimental animals, but opioid casein fragments have not been detected in the plasma of adult mammals following oral administration.

REFERENCES

1. E.J. Simon, J.M. Hiller, I. Edelman. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70(7): 1947–1949, 1973.
2. C.B. Pert, S.H. Snyder. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, 179(77): 1011–1014, 1973.
3. L. Terenius. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta. Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*, 33(5): 377–384, 1973.
4. H.W. Kosterlitz, J. Hughes. Some thoughts on the significance of enkephalin, the endogenous ligand. *Life Sci.*, 17(1): 91–96, 1975.
5. A. Mansour, R.C. Thompson, H. Akil, S.J. Watson. Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *J. Chem. Neuroanat.*, 6(6): 351–362, 1993.
6. F. Meng, G.X. Xie, R.C. Thompson, A. Mansour, A. Goldstein, S.J. Watson, H. Akil. Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(21): 9954–9958, 1993.
7. R.C. Thompson, A. Mansour, H. Akil, S.J. Watson. Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. *Neuron*, 11(5): 903–913, 1993.

8. G. Wittert, P. Hope, D. Pyle. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 218(3): 877–881, 1996.
- AQ5**
9. P.E. Gilbert, W.R. Martin. The effect of morphine
10. W.R. Martin, C.G. Eades, J.A. Thompson, R.E. Huppler, P.E. Gilbert. The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the non-dependent and the morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 197: 517–532, 1976.
11. M. Wüster, R. Schulz, A. Herz. Specificity of opioids towards the mu, delta and epsilon-opiate receptors. *Neurosci. Lett.*, 15: 193–198, 1978.
12. T. Oka. Enkephalin receptor in the rabbit ileum. *Br. J. Pharmacol.*, 68: 195–198, 1980.
13. C. Mollereau, M. Parmentier, P. Mailleux, J.L. Butour, C. Moisand, P. Chalon, D. Caput, G. Vassart, J.C. Meunier. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.*, 341(1): 33–38, 1994.
14. M. Satoh, M. Minami. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol. Ther.*, 68(3): 343–364, 1995.
15. V. Höllt. Multiple endogenous opioid peptides. *Trends Neurosci.*, 6: 24–26, 1983.
16. K.J. Chang, A. Lillian, E. Hazum, P. Cuatrecasas, J.K. Chang. Morphiceptin (NH₄-tyr-pro-phe-pro-COHN₂): a potent and specific agonist for morphine (μ) receptors. *Science*, 212(4490): 75–77, 1981.
- AQ6**
17. S.J. Paterson, L.E. Robson, H.W. Kosterlitz. Classification of opioid receptors. *Br. Med. Bull.*, 39(1): 31–36, 1983.
18. E. Weber, C.J. Evans, J.D. Barchas. Predominance of the amino-terminal beta-peptide fragment of dinorphin in rat brain regions. *Nature*, 299: 77–79, 1982.
19. B.R. Seizinger, K. Bovermann, D. Maysinger, V. Hollt, A. Herz. Differential effects of acute and chronic ethanol treatment on particular opioid peptide systems in discrete regions of rat brain and pituitary. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18(Suppl 1): 361–369, 1983.
20. J.D. White, C.M. Gall, J.F. McKelvy. Pro-enkephalin is processed in a projection-specific manner in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7099–7103, 1986.
21. E.A. Young, J.M. Walker, M.E. Lewis, R.A. Houghten, J.H. Woods, H. Akil. [3H]Dynorphin A binding and selectivity of pro-dynorphin peptides in rat, guinea-pig and monkey brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 121: 355–365, 1986.
22. S. Moon Edley, S.L. Hall, M. Herkenham, C.B. Pert. Evolution of striatal opiate receptors. *Brain Res.*, 249: 184–188, 1982.
23. G.A. Olson, R.D. Olson, A.J. Kastin. Endogenous opiates: 1988. *Peptides* 10(6): 1253–1280, 1989.
24. H. Teschemacher, G. Koch, V. Brantl. Milk protein derived atypical opioid peptides and related compounds with opioid antagonistic activity. In: V. Brantl, H. Teschemacher (Eds.) *β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments*. Weinheim: VCH, 1994, 3–17.
25. E. Hazum, J.J. Sabatka, K.J. Chang, D.A. Brent, J.W. Findlay, P. Cuatrecasas. Morphine in cow and human milk: could dietary morphine constitute a ligand for specific morphine (μ) receptors? *Science*, 213(4511): 1010–1012, 1981.
26. J. Sawynok, C. Pinsky, F.S. LaBella. On the specificity of naloxone as an opiate antagonist. *Life Sci.*, 25(19): 1621–1632, 1979.
27. M.S. Gold, C.A. Dackis, A.L. Pottash, H.H. Sternbach, W.J. Annetto, D. Martin, M.P. Dackis. Naltrexone, opiate addiction, and endorphins. *Med. Res. Rev.*, 2(3): 211–246, 1982.

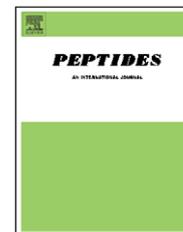
28. D.M. Zimmerman, J.D. Leander. Selective opioid receptor agonists and antagonists: research tools and potential therapeutic agents. *J. Med. Chem.*, 33(3): 895–902, 1990.
29. H. Teschemacher, G. Koch, V. Brantl. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers*, 43(2): 99–117, 1997.
30. H. Meisel. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*, 43(2): 119–128, 1997.
31. H. Meisel, R.J. FitzGerald. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br. J. Nutr.*, 84(Suppl 1): S27–S31, 2000.
32. S. Fukudome, M. Yoshikawa. Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS Lett.*, 296(1): 107–111, 1992.
33. S. Fukudome, M. Yoshikawa. Gluten exorphin C. A novel opioid peptide derived from wheat gluten. *FEBS Lett.*, 316(1): 17–19, 1993.
34. C. Liebmann, U. Schrader, V. Brantl. Opioid receptor affinities of the blood-derived tetrapeptides hemorphin and cytochrophin. *Eur. J. Pharmacol.*, 166(3): 523–526, 1989.
35. J. Pupovac, G.H. Anderson. Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats. *J. Nutr.*, 132(9): 2775–2780, 2002.
36. M. Yoshikawa, M. Takahashi, S. Yang. Delta opioid peptides derived from plant proteins. *Curr. Pharm. Des.*, 9(16): 1325–1330, 2003.
37. D. Schams, H. Karg. Hormones in milk. *Ann. NY Acad. Sci.*, 464: 75–86, 1986.
38. P. Petrilli, D. Picone, C. Caporale, F. Addeo, S. Auricchio, G. Marino. Does casomorphin have a functional role? *FEBS Lett.*, 169(1): 53–56, 1984.
39. J. Svedberg, J. de Haas, G. Leimenstoll, F. Paul, H. Teschemacher. Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in *in vitro* digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides*, 6(5): 825–830, 1985.
40. H. Meisel. Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from *in vivo* digests of casein. *FEBS Lett.*, 196(2): 223–227, 1986.
41. M. Umbach, H. Teschemacher, K. Praetorius, R. Hirschhauser, H. Bostedt. Demonstration of a β -casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regul. Pept.*, 12(3): 223–230, 1985.
42. M. Singh, C.L. Rosen, K.J. Chang, G.G. Haddad. Plasma β -casomorphin-7 immunoreactive peptide increases after milk intake in newborn but not in adult dogs. *Pediatr. Res.*, 26(1): 34–38, 1989.
43. J. Hedner, T. Hedner. β -Casomorphins induce apnea and irregular breathing in adult rats and newborn rabbits. *Life Sci.*, 41(20): 2303–2312, 1987.
44. K. Ramabadran, B.E. Moore. Sudden infant death syndrome and opioid peptides from milk. *Am. J. Dis. Child.*, 142(1): 12–13, 1988.
45. J.B. Meddings, M.G. Swain. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology*, 119(4): 1019–1028, 2000.
46. J. Groot, P. Bijlsma, A. Van Kalkerren, A. Kiliaan, P. Saunders, M. Perdue. Stress-induced decrease of the intestinal barrier function. The role of muscarinic receptor activation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 915: 237–246, 2000.
47. V. Schusdziarra, R. Schick, A. de la Fuente, A. Holland, V. Brantl, E.F. Pfeiffer. Effect of β -casomorphins on somatostatin release in dogs. *Endocrinology*, 112(6): 1948–1951, 1983.

48. V. Schusdziarra, A. Schick, A. de la Fuente, J. Specht, M. Klier, V. Brantl, E.F. Pfeiffer. Effect of β -casomorphins and analogs on insulin release in dogs. *Endocrinology*, 112(3): 885–889, 1983.
49. M. Brandsch, P. Brust, K. Neubert, A. Ermisch. β -casomorphins — chemical signals of intestinal transport systems. In: V. Brantl, H. Teschemacher (Eds.). *β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments*. Weinheim: VCH, 1994, 207–219.
50. H. Daniel, M. Vohwinkel, G. Rehner. Effect of casein and beta-casomorphins on gastrointestinal motility in rats. *J. Nutr.*, 120(3): 252–257, 1990.
51. D. Tome, A.M. Dumontier, M. Hautefeuille, J.F. Desjeux. Opiate activity and transepithelial passage of intact β -casomorphins in rabbit ileum. *Am. J. Physiol.*, 253(6 Pt 1): G737–G744, 1987.
52. Y. Elitsur, G.D. Luk. β -Casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clin. Exp. Immunol.*, 85(3): 493–497, 1991.
53. J. Panksepp, L. Normansell, S. Sivi, J. Rossi III, A.J. Zolovick. Casomorphins reduce separation distress in chicks. *Peptides*, 5(4): 829–831, 1984.
54. E. Paroli. Opioid peptides from food (the exorphins). *World Rev. Nutr. Diet*, 55: 58–97, 1988.
55. K.J. Chang, P. Cuatrecasas, E.T. Wei, J.K. Chang. Analgesic activity of intracerebroventricular administration of morphiceptin and β -casomorphins: correlation with the morphine (micro) receptor binding affinity. *Life Sci.*, 30(18): 1547–1551, 1982.
56. H. Matthies, H. Stark, B. Hartrodt, H.L. Ruethrich, H.T. Spieler, A. Barth, K. Neubert. Derivatives of β -casomorphins with high analgesic potency. *Peptides*, 5(3): 463–470, 1984.

Article 3: A tryptic hydrolysate from bovine milk α_{S1} -casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress

available at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

A tryptic hydrolysate from bovine milk α_{S1} -casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress

Benjamin Guesdon^{a,*}, Michaël Messaoudi^b, Catherine Lefranc-Millot^c,
Gilles Fromentin^a, Daniel Tomé^a, Patrick C. Even^a

^aUMR INRA 914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France

^bETAP-Applied Ethology, 13 rue du Bois de la Champelle, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^cINGREDIA, 51-53 Avenue F. Lobbédez, 62033 Arras, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2005

Received in revised form

2 October 2005

Accepted 4 October 2005

Keywords:

Sleep

Stress

α_{S1} -Casein hydrolysate

Corticosterone

ABSTRACT

The putative effects of a tryptic bovine α_{S1} -casein hydrolysate on stress-induced sleep disorders were investigated and their possible link with typical blood stress parameters such as plasma corticosterone concentrations and glycaemia was assessed. Rats were subjected to chronic stress in the form of environmental disturbances, while receiving an oral administration of the α_{S1} -casein hydrolysate (CH). Chronic stress significantly reduced sleep duration in control rats during the first 2 days of the stress period, but stress-induced sleep disturbance was prevented in CH-treated rats. Indeed, CH administration allowed the maintenance of slow wave sleep (SWS) duration and even a slight increase in paradoxical sleep (PS) duration in treated rats. Results on plasma corticosterone concentrations and on glycemia values were inconclusive with respect to the implication of the HPA axis in this study. However, the protective effect of the α_{S1} -casein hydrolysate on sleep during exposure to our chronic mild stress conditions may be mediated by modulation of the central adrenergic response.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Sleep disorders represent an important risk to health and recent studies have concluded that a sleep debt can facilitate the development of chronic metabolic disorders such as obesity, diabetes, and hypertension [36]. Environmental conditions can compromise sleep quality, but other factors including chronic stress [42,43], depression [2], shift work [18] abnormal dietary behavior (anorexia nervosa, obesity) [21], and malnutrition [10] are also associated with sleep disorders. Stressed individuals may find it difficult to fall asleep or remain asleep during the night. Conversely, insufficient sleep or frequent awakenings due to physiological problems or the demands of work may be stressful and affect mood and performance [1,4]. The pharmacological treatment of chronic

insomnia with standard hypnotics and sedative antidepressants is widely employed, but is not always fully efficient in restoring sleep. Poorer sleep quality with more awakenings, impaired or suppressed REM sleep is often reported during such treatment [31,45].

Cow's milk has long been considered a tranquilizing beverage with sleep-inducing properties. Sixty years ago, it was reported that adults consuming a meal of cornflakes and milk exhibited a stronger tendency toward uninterrupted sleep [20]. Using electroencephalography, other researchers found that sleep was significantly improved (longer and less broken) in older people fed a milk and cereal meal at bedtime, and that the action of milk was more effective with serial administration [6]. A positive impact on sleep has been associated with some milk protein fractions. This may

* Corresponding author. Tel.: +33 1 44 08 86 43; fax: +33 1 44 08 18 25.

E-mail address: guesdon@inapg.fr (B. Guesdon).

0196-9781/\$ – see front matter © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2005.10.001

originate from an energy-induced feeling of drowsiness [5,9], but also from an improvement in the ratio between tryptophan (Trp) and the pool of large neutral amino-acids (LNAA) in the blood, favoring the brain uptake of Trp, a precursor for serotonin synthesis that plays an important role in controlling sleep [7,30]. In addition, numerous bioactive peptides have been identified in milk proteins and may be released after enzymatic digestion in the gastrointestinal tract [23]. These include opioid and opioid antagonist peptides originating from milk proteins which very probably have a functional role by interacting with the endogenous opioid system [39]. They are good candidates for molecular players in the believed sedative effect of milk, but in many cases, there is still no evidence that they are released and activated under *in vivo* conditions. Findings that suggest a functional role for milk-derived opioid peptides as exogenous regulators in adult consumers have only been reported for the β -casomorphin group which indeed seems to participate in controlling various gastrointestinal functions [24,39].

More recently, while investigating whether popular views as to the sedative and calming properties of milk could be confirmed by the determination of bioactive peptides, it was discovered that a tryptic hydrolysate of bovine α_{S1} -casein, and a decapeptide it contains (α_{S1} -casein (f91–100) or α -casozepine), displayed an anxiolytic-like profile in the conditioned defensive burying test and the elevated plus-maze following intravenous administration in rats [26]. Moreover, based on changes to blood pressure and cortisol levels measured in human subjects experiencing successive mental and physical stress situations, clinical study results clearly suggest the anti-stress properties of this hydrolysate following its oral administration [25]. Thus, in view of the acknowledged deleterious link between stress, anxiety and sleep, we hypothesized that this α_{S1} -casein hydrolysate might also be implicated in the assumed hypnotic properties of milk, preventing or reducing the effects of stressful environmental conditions on sleep. In order to test this hypothesis, we investigated whether the oral intake of α_{S1} -casein hydrolysate would reduce stress-induced sleep disorders. For this purpose, we subjected adult male rats to eight days of chronic mild stress [17] and measured the duration of total sleep (TS), slow wave sleep (SWS) and paradoxical sleep (PS) during this period. In addition, in order to investigate how far sleep changes were related to changes in the activity of the stress system, two physiological, stress-related blood parameters, plasma glucose and corticosterone concentrations, were monitored.

2. Materials and methods

2.1. Test product and animals

Bovine α_{S1} -casein tryptic hydrolysate (lactiumTM) which will be referred to as CH in this article, was supplied by Ingredia (Arras, France). The control substance consisted of total bovine milk proteins. These two products were mixed with an appetitive liquid vehicle product (Fortimel, Nutricia, France) so that they could be administered orally in the rats. During all our experiments, both CH and control rats were

treated daily at 18:00 h by oral administration (15 mg/kg). The experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609 EEC), on the care and use of laboratory animals.

Male Wistar rats (Harlan, France), weighing 240–260 g at their arrival in our facility, were kept under standard conditions of temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and under a reversed 12 h light–dark cycle (lights on at 18:00 h). They were housed in individual cylindrical Plexiglas cages with an opening at the top to enable electroencephalographic recordings [28] and blood sampling. Standard food pellets (AO4, SAFE) and water were available *ad libitum* throughout the experimental period. The rats were handled twice a day by the same experimenter and particular care was taken to limit any kinds of external stress (variations in light, noise or odor). The animals were allowed to adapt to these conditions and to the sleep recording procedure for at least three weeks before the beginning of the experiment. They were also accustomed to the oral administration of 0.3 ml of a vehicle, each day at 18:00 h.

2.2. Implantation of EEG electrodes

After adaptation to the laboratory conditions the rats were implanted with cortical electrodes for EEG recordings. They were anaesthetized with a mixture of ketamine (75 mg/kg, Imalgène 1000) and xylazine (1 mg/kg, 1% Rompun) and placed on a stereotactic frame. Two silver wire (Phymep) EEG electrodes soldered onto a female connector (male SMC base for coaxial connectors) were fixed in place. The cortical electrode, which terminated with a 0.5 mm diameter sphere, was inserted via a hole in the skull until it came into contact with the dura mater. This electrode was positioned 3 mm lateral to the sagittal suture and 4 mm anterior to the bregma. The second electrode, used as an earth electrode, was positioned subcutaneously. Four jewellery screws were then fixed lateral to the skull and served to anchor the electrodes and connector with dental cement (Dentalon Plus, Kulzer-Heraeus). No muscle electrodes were used because, as shown by Danguir, the derivations employed ensured a clear distinction between the three main vigilance stages: wakefulness (W), slow wave sleep (SWS), and paradoxical sleep (PS) [9,27].

2.3. Implantation of a jugular catheter

Animals were anaesthetized with a mixture of ketamine (75 mg/kg, Imalgène 1000) and xylazine (1 mg/kg, 1% Rompun) and a 70 mm long catheter (602–135 Silastic Brand from Dow Corning, Medical Products, Midland, MI, USA) was inserted into the right external jugular vein some 5 mm before it dives under the clavicle [28] and then pushed down the vena cava. The catheter was not introduced using a hard guide, but filled with physiologic saline and pushed gently back and forth until it found its way into the vena cava. The catheter was then secured to the vein and passed subcutaneously along the shoulder and the neck to reach the skull, where it was attached with screws and dental acrylic (Dentalon plus from Heraeus Kulzer, Dormagen, Germany) and then filled with viscous 30% polyvinyl pyrrolidone (Prolabo) to prevent occlusion by blood.

2.4. Experimental designs

2.4.1. First experiment

The rats were implanted with electrodes for EEG recordings and accustomed to the recording procedure. The surgical procedure induced a transient decline in body weight, but preoperative weight was recovered within 3 days. After at least 1 week of recovery, basal sleep was recorded over two consecutive days. The rats were then separated into three groups ($n = 8$ in each group). In the first one, the rats were treated with the α_{S1} -casein tryptic hydrolysate (CH stressed group) while in the second one, the rats received the control substance (control stressed group). In these two groups, the treatment was given per os for 8 days, at the same time as the rats were subjected to chronic mild stress. The third group was used to test the impact of CH treatment on sleep under normal conditions (CH-unstressed group).

EEG recordings were performed during 16 h, from 6 pm (lights on) to 10 a.m., at days 1, 2, 4 and 8 of the treatment period. The recording period thus included the entire light period, during which the rats use to develop most of their sleeping time. Furthermore, our main goal was to focus on the sleep response to ingestion of CH and we could anticipate that most of the effect would occur between 1 and 12 h after ingestion.

2.4.2. Second experiment

The same experimental design was applied to a second group of rats ($n = 6$ in each group) chronically implanted with a jugular catheter for remote blood sampling. They were allowed to recover for at least a week before the start of the mild stress period. The animals were habituated to handling during daily inspections of their catheters. Blood (100 μ l) was collected at 11:00, 15:00, 17:30, 19:00 and 21:30 h on three consecutive days: the day before and then the first 2 days of the mild stress period, via the jugular catheter. During blood collection, the catheters were continuously connected to a syringe filled with heparinized saline solution (100 IU/ml) with polyethylene tubing. Rats were injected with 100 μ l of a solution of 9% NaCl and 6% citrate after each collection. Glucose levels were determined immediately on whole blood using a Glucotrend 2 (AccuChek system, Roche, limit of sensitivity: 0.6 mmol/l). Blood samples were mixed with an EDTA-Trasyol (Bayer AG, Leverkusen, Germany) solution (25%), centrifuged at $3000 \times g$ (4 °C) for 15 min and frozen until analysis. Plasma corticosterone levels were determined using a commercially available radioimmunoassay kit (MP Biomedicals, Orangeburg, NY).

2.4.3. Mild stress procedure

Rats were subjected to disturbances of environmental parameters during an 8-day procedure when we randomly combined various environmental stressors such as sonorous disturbances (approximately 85 dB, produced by an untuned radio), light-dark cycle disturbances (ten 5 min long episodes during a 24-h period) and a different tilt to the cage every 12 h (approximately 30° from upright).

2.5. Sleep recordings and scoring

A flexible electrical wire was screwed to the skull connector by means of a female SMC-plus for coaxial connectors and

plugged into an electrical swivel connector (Air precision, Le Plessis-Robinson, France) in order to transmit the EEG signal to an amplifying system (10 000 \times) (Exp-EEG1, extracellular amplifier for EEG measurement, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary). The amplified signal was then transmitted to a data acquisition board (DAS 1800, Keithley Instruments, Palaiseau, France) plugged into a personal computer. Data was acquired from eight rats simultaneously over a period of 16 h, from 18:00 to 10:00 h the next day, under the control of a PC program written in the laboratory using ASYST V4.1 (Keithley Instruments). The amplified signals were digitized at a frequency of 100 Hz, filtered below 1 Hz and above 40 Hz and saved on the hard disk at 10 s intervals. All measurements of wakefulness (W), slow wave sleep (SWS) and paradoxical sleep (PS) were made by visual inspection of the graphic replay of data files on a computer screen by two "blind" independent observers, with the help of a semi-automatic analysis program. Briefly, the observers visually discriminated between 20 and 30 characteristic 10 s periods for W, SWS, and PS, from which the computer program defined the specific power spectra of W, SWS and PS episodes. Sleep stages were then computed automatically by the program by comparing the power spectrum for each 10 s period with the recorded specific power spectra (identity $\sim 5\%$). The observers completed their sleep pattern analysis by defining visually the 10 s sleep episodes for which the power spectrum differed by more than 5% from the typical power spectrum (~ 5 –8% of episodes). The assignment of sleep stages followed standard criteria. With respect to EEG patterns, SWS episodes of less than 20 s within a W episode were not distinguished from wakefulness and vice versa, W episodes of less than 20 s within a period of SWS were not distinguished from SWS (performed automatically by the analytical program). For each 16-h period, analysis of the sleep-wake cycle provided EEG recordings of the time spent in wakefulness, SWS and PS.

2.6. Statistical data analysis

Data are reported as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Paired data analysis (Student's *t*-test for paired data) was performed on EEG, blood glucose and plasma corticosterone values. Moreover, when time effect was considered, differences between groups were determined by a mixed procedure (Proc mixed, SAS version 6.11, model chosen according to BIC parameters) using group, time and group \times time effects. The level of significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Short-term effects of mild stress and CH on sleep parameters

Variations in sleep durations (total sleep, SWS and PS) between baseline and the first 2 days of the mild stress period during the first experiment are shown in Fig. 1. The mild stress period induced a dramatic fall in total sleep duration in control stressed animals. This reduction was significant as early as the first day (-11%) and further increased to -20% on the second day. More precisely, this reduction resulted from a decrease in

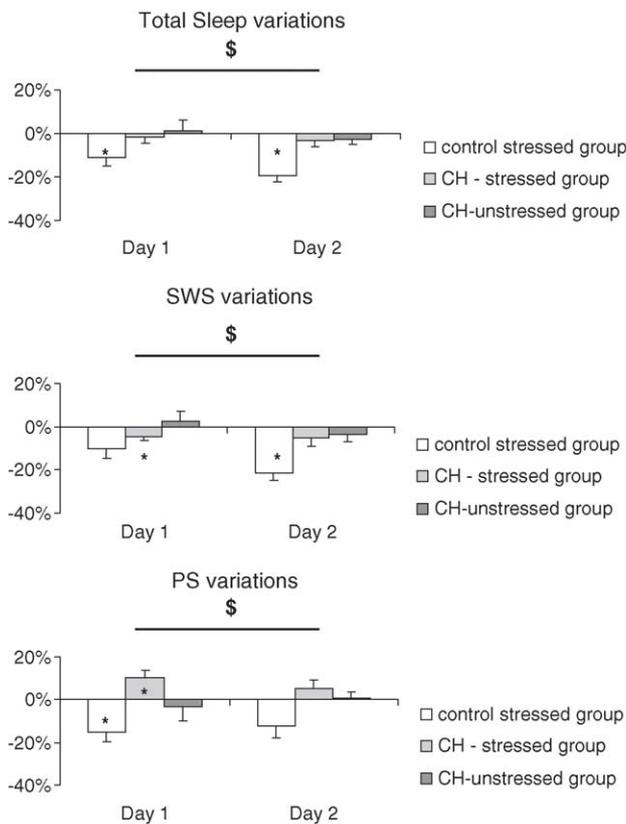


Fig. 1 – Differences in sleep patterns between baseline and the first two days of treatment in the control stressed, CH-stressed and CH-unstressed groups. *Data significantly different from 0; \$Significant between-group differences at $P < 0.05$.

both SWS (–10% on day 1, –22% on day 2) and PS (–15% on day 1, –12% on day 2, NS). In the CH-stressed group, the deleterious action of stress on sleep was not observed to such an extent. Sleep decreased by only 2% during day 1 (NS) and by 4% during day 2 (NS). The results obtained regarding sleep components in the CH-stressed group further demonstrated that the slight decrease in SWS was only significant during day 1 and that there was even a surprising increase in PS over these first 2 days (significant at day 1). Between-group comparisons showed that the reduction in total sleep duration observed in the control stressed group was greater than that observed in the CH-stressed group (group $P = 0.002$, time $P = 0.0003$, group \times time $P = 0.0087$), with significantly lower SWS (group $P = 0.0141$, time $P = 0.0005$, group \times time $P = 0.0295$) and PS (group $P = 0.001$, time $P = 0.6515$, group \times time $P = 0.0047$) durations. Moreover, Fig. 1 shows that CH treatment did not affect sleep in unstressed rats, indicating that the resistance to stress of the CH-treated rats is not due to a sedative effect of the CH treatment per se.

3.2. Short-term effects of mild stress and CH on blood parameters

Plasma corticosterone and blood glucose levels determined in the second experiment at baseline and during the first 2 days of the mild stress period are presented in Figs. 2 and 3.

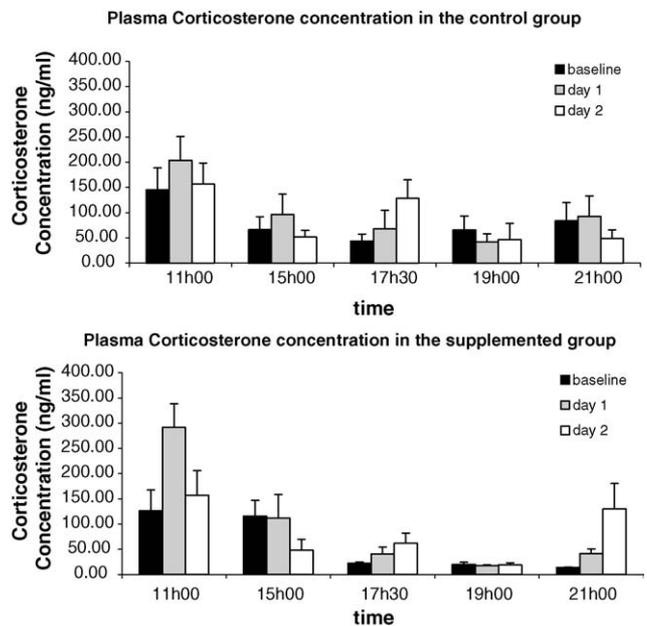


Fig. 2 – Plasma corticosterone levels (ng/ml) at baseline and during the first 2 days of mild stress: (a) control group and (b) CH group.

No significant differences in corticosterone concentrations between baseline and the first 2 days of mild stress were observed in both the control and CH groups. Indeed, no significant time effect could be identified besides the usual

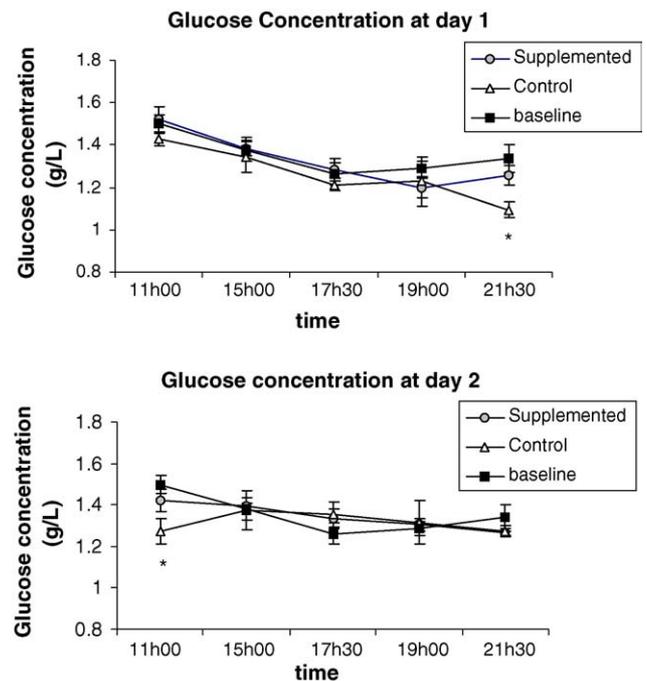


Fig. 3 – Plasma glucose levels (g/l) at baseline and during the first 2 days of mild stress: (a) first day and (b) second day. *Significant intragroup differences from baseline ($P < 0.05$).

circadian variations of plasma corticosterone. Between-group differences were not significant neither.

Blood glucose levels in the control group were significantly lower than baseline after 18:00:h during the first day of mild stress, whereas no significant changes were observed in the CH group. At the beginning of the second day, these levels were still reduced in the control group but thereafter progressively caught up to no longer differ from baseline. No between-group differences were found.

3.3. Long-term effects on sleep parameters

The amounts of total sleep, slow wave sleep and paradoxical sleep during the entire mild stress period are shown in Fig. 4. First of all, these data confirm a significant decrease in total sleep duration in the control group, mostly due to a significant shortening in the duration of SWS during day 2 of the mild stress procedure. They also confirm the preservation of sleep in CH treated rats. Moreover, despite pursuit of the mild stress procedure, sleep gradually recovered in the control group and was no longer significantly affected after 4 days.

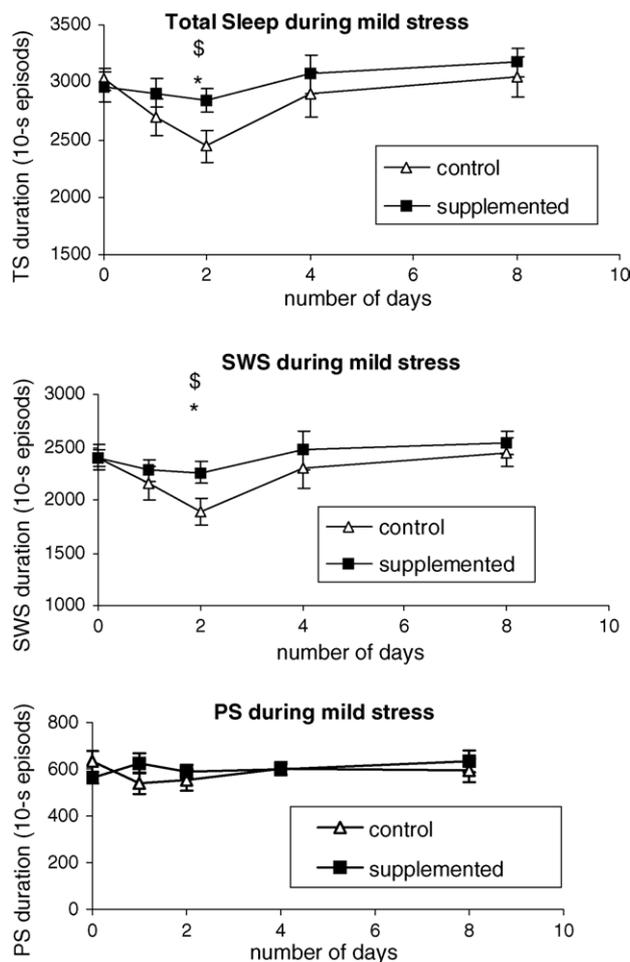


Fig. 4 – Evolution of sleep patterns during the mild stress procedure in control and CH-treated groups. Significant intragroup differences from baseline; \$Significant between-group differences at $P < 0.05$.

4. Discussion

The aim of our study was to establish a model of stress-induced sleep disturbances in order to test the ability of the bovine α_{S1} -casein tryptic hydrolysate (CH) to antagonize sleep disorders. In humans, stress and sleep disturbances are often related [12,19]. In rats, it has already been shown that chronic stress induces a marked sleep reduction [17]. However, this phenomenon is transient. Effectively, it was shown that sleep during the light hours was decreased throughout the stress period, while sleep during the dark hours increased within the first day of stress consequently daily sleep had returned to pre-stress levels by the third day of stress. In accordance with these results, our procedure disturbed sleep composition in control stressed rats as early as the first day of the chronic mild stress procedure, with reductions in both SWS and PS. Sleep disturbances were further enhanced during the second day, but began to decrease on day three and after day 4, no difference with the pre-stress period persist. However, it was not possible to state whether these findings reflected adaptation by rats to mild stress over time or whether they were indicative of sleep organization adaptation throughout the day, in order to respect sleep homeostasis despite stressful events. As expected, we therefore obtained an interesting model of stress-induced sleep impairment during the first 2 days of our chronic mild stress procedure.

The main finding of this study was the protective effect of oral CH administration with respect to sleep duration. Indeed, total sleep duration in CH-treated rats was not reduced by the stress procedure and was significantly higher than in control animals. In addition, we observed that CH did not affect sleep in unstressed rats, but prevented sleep disturbance in stressed rats. Consequently, it can be said that this effect is a component of the anxiolytic properties of CH, with sleep-disorders being considered as anxiety-related disorders, rather than a sedative effect by itself. This protective effect resulted from two phenomena: first, the maintenance of slow wave sleep, and second, a slight increase in paradoxical sleep. As expected, the total sleep, SWS and PS time course (data not shown) clearly indicated that the effects of CH developed between 1 and ~10 h after ingestion. These data should first of all be acknowledged as a single, rare result showing the specific behavioral impact of an ingested hydrolysate. Above all, the sleep promoting or sleep protecting effect of the bovine α_{S1} -casein tryptic hydrolysate tested under chronic stress conditions provides a possible explanation for the assumed properties of milk, as well as offering a potential use of this hydrolysate in the management of human stress and sleep disorders, which is not surprising in view of the suggested anxiolytic-like activity of this substance.

During the second part of the study, we investigated the effect of CH administration on the stress system by monitoring plasma levels of corticosterone, a marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis mactivity, and blood glucose level, which is currently considered as a stress-sensitive parameter, during the early days of the stress procedure. We did not observe any significant change to plasma corticosterone levels in response to the mild stress procedure. Indeed, previous studies on sleep-stress interactions had highlighted the key role of both components of the stress system: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system.

lamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic system. While both are down-regulated during sleep [34,44], it has been shown that their activity relates positively to the degree of objective sleep disturbance [43]. On the other hand, experimental sleep disruption (frequent awakenings) is associated with a significant rise in plasma cortisol levels in humans [35]. However, caution should be exercised when interpreting these results. Although chronic stress and poor sleep have been associated with high corticosterone levels in some studies [16,41], no impact is observed in others [37]. Results seem to depend on the rat strain [3] and have been inconclusive with the Wistar strain. Moreover, the mild nature of stressors may also contribute to the weakness of the HPA axis response. Some investigators have demonstrated a correlation between stressor intensity and corticosterone levels [14,29]. It is therefore possible that the low susceptibility to stress of Wistar rats and the marked inter- and intra-individual response variability interacted with the low intensity of the stressors associated in our paradigm to prevent the occurrence of any significant variations in corticosterone levels. Nonetheless, we observed an interesting and significant reduction in plasma glucose levels in control-stressed animals but not in CH-treated-stressed animals during the first day of the chronic stress procedure, suggesting that glycaemia may be a more sensitive marker of the stress system activation than plasma corticosterone. As a result, we hypothesize that our mild stress conditions probably induced stress system responses and sleep impairments through a slight but repeated central and sympathetic adrenergic activation rather than through activation of the HPA axis. Therefore, the model we used should be considered as a model of stress-induced anxiety, and anxiety-induced insomnia. In this model, CH effects could be mediated by modulation of intensity and duration of the adrenergic activation, for instance through the opiate or gabaergic systems.

The precise mechanisms underlying the effects of α_{S1} -casein tryptic hydrolysate on stress-induced sleep disturbances still need to be determined. Target sites, precise active fragment(s) of the hydrolysate and pathways mediating this action must be elucidated. When the hydrolysate is orally administered, some fragments that may be resistant to digestion and absorption processes could be candidates as bioactive components. Some bioactive peptides (such as atypical opioid peptides) have been shown to be encrypted in bovine α_{S1} -casein and are considered as good candidates. They have been shown to be δ -selective receptors ligands [22,24] and could as such be candidates for a central nervous function like stress adaptation, but evidences still lack regarding the release or functional role of these peptides in vivo [38]. On the other hand, as mentioned in the general introduction, a peptide called α -casozepine has been identified in the hydrolysate and shown to exhibit affinity for the GABA_A receptor as well as anxiolytic activity following intravenous administration [26]. The effects of α_{S1} -casein tryptic hydrolysate CH thus may be due to this active decapeptide, which needs to be explored in a further study so as to clarify the possible functional role of this peptide in vivo following oral administration.

Bioactive and intact peptides may enter peripheral blood and exert systemic effects, or may exert local effects in the

gastrointestinal tract. To be addressed, this question requires to assay bioactive candidates or various other potential fragments in the blood, which remains a complex and unsolved problem at present. Until now, evidences suggest that peptides larger than tripeptides cannot pass through the adult digestive endothelium in significant amounts. Duodenal digestion involves the cleavage of numerous peptide linkages by pancreatic endopeptidases and exopeptidases. The neonatal intestine clearly appears to be more permeable to bioactive peptides, as has been shown with β -casomorphins [32,40], but in adults the intestinal mucosa acts as an efficient barrier between luminal contents and the systemic circulation [15]. However, bioactive peptides were found in the blood of adults rats or humans after ingestion [8,11], and some studies have reported enhanced permeability of the intestinal barrier under various stress conditions [13,33]. These results, originally directed to explain the pathogen and toxin sensitivity of stressed subjects, may provide an explanation for the stress-induced effect of the hydrolysate: active molecules may not be able to pass through the intestinal barrier and reach their target in sufficient amounts unless stressful conditions are met. As a consequence, they could survive enzymatic attack in the plasma and act, even in small amounts, at any potential site of action in the organism. In addition to a potential systemic or even central direct action, the effect on adult rats could be further mediated via subepithelial receptors or specific luminal binding sites in the brush border membrane. In that prospect, it could be very interesting to investigate the role of the vagus nerve, which is a possible relay for signal transfer at a central level.

5. Conclusions

To date, few studies have demonstrated an effect of orally administered food-derived peptides on an adult organism, and as far as we know, none has recognized such a global behavioral effect of an orally administered peptide. This study highlights for the first time the sleep promoting effect of bovine α_{S1} -casein tryptic hydrolysate treatment during chronic stress, a result which may open new perspectives on the mechanisms by which food-derived bioactive peptides act under stress.

Acknowledgement

The authors would like to thank Nadine Jeanguyot for technical assistance.

REFERENCES

- [1] Armitage R, Hoffmann RF. Sleep EEG, depression and gender. *Sleep Med Rev* 2001;5:237-46.
- [2] Benca RM. Mood disorders. In: Kryger T, Dement WC, editors. *Principles and practice of sleep medicine*. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p. 1140-57.
- [3] Bielajew C, Konkle AT, Merali Z. The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats. I.

- Biochemical and physiological analyses. *Behav Brain Res* 2002;136:583-92.
- [4] Bonnet MH. Performance and sleepiness as a function of frequency and placement of sleep disruption. *Psychophysiology* 1986;23:263-71.
- [5] Borbely AA. Sleep in the rat during food deprivation and subsequent restitution of food. *Brain Res* 1977;124:457-71.
- [6] Brezinova V, Oswald I. Sleep after a bedtime beverage. *Br Med J* 1972;2:431-3.
- [7] Butte NF, Jensen CL, Moon JK, Glaze DG, Frost Jr JD. Sleep organization and energy expenditure of breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res* 1992;32:514-9.
- [8] Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, et al. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 1998;80:155-65.
- [9] Danguir J, Nicolaidis S. Intravenous infusions of nutrients and sleep in the rat: an ischymetric sleep regulation hypothesis. *Am J Physiol* 1980;238:E307-12.
- [10] Datta S, Patterson EH, Vincitore M, Tonkiss J, Morgane PJ, Galler JR. Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep/wake behavior as adults. *J Sleep Res* 2000;9:71-9.
- [11] Fosset S, Fromentin G, Gietzen DW, Dubarry M, Huneau JF, Antoine JM, et al. Peptide fragments released from Phe-caseinomacropeptide in vivo in the rat. *Peptides* 2002;23:1773-81.
- [12] Gillin JC, Borbely AA. Sleep: a neurobiological window on affective disorders. *Trends Neurosci* 1985;8:537-42.
- [13] Groot J, Bijlsma P, Van Kalkeren A, Kiliaan A, Saunders P, Perdue M. Stress-induced decrease of the intestinal barrier function. The role of muscarinic receptor activation. *Ann NY Acad Sci* 2000;915:237-46.
- [14] Hennessy MB, Heybach JP, Vernikos J, Levine S. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. *Physiol Behav* 1979;22:821-5.
- [15] Humphrey MJ, Ringrose PS. Peptides and related drugs: a review of their absorption, metabolism, and excretion. *Drug Metab Rev* 1986;17:283-310.
- [16] Kant GJ, Leu JR, Anderson SM, Mougey EH. Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav* 1987;40:775-9.
- [17] Kant GJ, Pastel RH, Bauman RA, Meininger GR, Maughan KR, Robinson III TN, et al. Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiol Behav* 1995;57:359-65.
- [18] Kuhn G. Circadian rhythm, shift work, and emergency medicine. *Ann Emerg Med* 2001;37:88-98.
- [19] Kupfer D. Interaction of EEG sleep, antidepressants, and affective disease. *J Clin Psychiatry* 1982;43:30-6.
- [20] Laird DA, Drexel H. Experimenting with food and sleep. I. Effects of varying types of foods in offsetting sleep disturbances caused by hunger pangs and gastric distress-children and adults. *J Am Diet Assoc* 1934;10:89-94.
- [21] Lauer CJ, Krieg JC. Sleep in eating disorders. *Sleep Med Rev* 2004;8:109-18.
- [22] Meisel H. Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from in vivo digests of casein. *FEBS Lett* 1986;196:223-7.
- [23] Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 1997;43:119-28.
- [24] Meisel H, FitzGerald RJ. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br J Nutr* 2000;84(Suppl 1): S27-31.
- [25] Messaoudi M, Lefranc-Millot C, Desor D, Demagny B, Bourdon L. Effects of a tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-casein on hemodynamic responses in healthy human volunteers facing successive mental and physical stress situations. *Eur J Nutr* 2005;44:128-32.
- [26] Miclo L, Perrin E, Driou A, Papadopoulos V, Boujrad N, Vanderesse R, et al. Characterization of alpha-casozepine, a tryptic peptide from bovine alpha(s1)-casein with benzodiazepine-like activity. *Faseb J* 2001;15:1780-2.
- [27] Minet-Ringuet J, Le Ruyet PM, Tome D, Even PC. A tryptophan-rich protein diet efficiently restores sleep after food deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 2004;152:335-40.
- [28] Nicolaidis S, Rowland N, Meile MJ, Marfaing-Jallat P, Pesez A. A flexible technique for long term infusions in unrestrained rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1974;2:131-6.
- [29] Odio MR, Maickel RP. Comparative biochemical responses of rats to different stressful stimuli. *Physiol Behav* 1985;34:595-9.
- [30] Sarwar G, Botting HG. Liquid concentrates are lower in bioavailable tryptophan than powdered infant formulas, and tryptophan supplementation of formulas increases brain tryptophan and serotonin in rats. *J Nutr* 1999;129:1692-7.
- [31] Sateia MJ, Nowell PD. Insomnia. *Lancet* 2004;364:1959-73.
- [32] Singh M, Rosen CL, Chang KJ, Haddad GG. Plasma beta-casomorphin-7 immunoreactive peptide increases after milk intake in newborn but not in adult dogs. *Pediatr Res* 1989;26:34-8.
- [33] Soderholm JD, Perdue MH. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G7-G13.
- [34] Somers VK, Dyken ME, Mark AL, Abboud FM. Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *N Engl J Med* 1993;328:303-7.
- [35] Spath-Schwalbe E, Gofferje M, Kern W, Born J, Fehm HL. Sleep disruption alters nocturnal ACTH and cortisol secretory patterns. *Biol Psychiatry* 1991;29:575-84.
- [36] Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 1999;354:1435-9.
- [37] Stout SC, Mortas P, Owens MJ, Nemeroff CB, Moreau J. Increased corticotropin-releasing factor concentrations in the bed nucleus of the stria terminalis of anhedonic rats. *Eur J Pharmacol* 2000;401:39-46.
- [38] Teschemacher H, Koch G. Opioids in the milk. *Endocr Regul* 1991;25:147-50.
- [39] Teschemacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 1997;43:99-117.
- [40] Umbach M, Teschemacher H, Praetorius K, Hirschhauser R, Bestedt H. Demonstration of a beta-casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regul Pept* 1985;12:223-30.
- [41] Uresin Y, Erbas B, Ozek M, Ozkok E, Gurol AO. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2004;5:93-6.
- [42] Vgontzas AN, Chrousos GP. Sleep, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and cytokines: multiple interactions and disturbances in sleep disorders. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2002;31:15-36.
- [43] Vgontzas AN, Tsigos C, Bixler EO, Stratakis CA, Zachman K, Kales A, et al. Chronic insomnia and activity of the stress system: a preliminary study. *J Psychosom Res* 1998; 45:21-31.
- [44] Weitzman ED, Zimmerman JC, Czeisler CA, Ronda J. Cortisol secretion is inhibited during sleep in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:352-8.
- [45] Winokur A, Gary KA, Rodner S, Rae-Red C, Fernando AT, Szuba MP. Depression, sleep physiology, and antidepressant drugs. *Depress Anxiety* 2001;14:19-28.

Conclusion générale

Contextualisation des résultats : les apports de nos travaux à la recherche sur les troubles du sommeil

L'homme est le seul animal qui prend sur son temps de sommeil pour se reproduire.

Cavanna

Le sommeil est une fonction complexe et primordiale pour l'organisme. Cependant, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction générale, les pathologies du sommeil et les restrictions dont il fait l'objet, volontaires ou non, sont extrêmement répandues au sein de la population. Elles participent vraisemblablement à des cercles vicieux où les déséquilibres s'entraînent les uns les autres, pour aboutir à un ensemble de répercussions physiques et psychiques néfastes pour l'individu. Aujourd'hui, autant par désinformation que par manque de moyens de diagnostic et de traitements adaptés, les troubles et le manque de sommeil ne sont pas suffisamment déclarés ni pris en charge dans la population (68). Deux voies d'action complémentaires permettent d'espérer avancer dans la solution de ce problème. En tout premier lieu, il est capital de réhabiliter le rôle et l'importance du sommeil pour l'organisme et d'en faire un véritable enjeu de santé publique (informer le public, le personnel de santé, mais aussi obtenir des pouvoirs publics une législation ad hoc). Il est en effet particulièrement inquiétant que dans nos sociétés industrialisées, où les troubles du sommeil et l'obésité prennent des proportions d'épidémies, le sommeil soit encore considéré comme une perte de temps, ou quelque chose qu'on peut limiter, à l'instar d'autres activités non rentables et non productrices de capitaux à court terme. La deuxième priorité est de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques pour combattre les problèmes de sommeil et leurs conséquences pour l'organisme.

Qu'apportent nos propres travaux dans ce contexte ?

Nous espérons avoir assez insisté sur l'importance du sommeil pour l'organisme, en soulignant ses interactions avec le métabolisme énergétique et la régulation pondérale, ainsi qu'avec les mécanismes de la réponse au stress. Il est toutefois évident que nos travaux sur

l'influence de l'alimentation dans la régulation du sommeil s'inscrivent avant tout dans la deuxième voie d'action : ils tendent à ouvrir des pistes vers une possible utilisation de l'alimentation et même de certains facteurs alimentaires, pour combattre les troubles du sommeil, et les pathologies qui lui sont associées (métaboliques ou psychiques).

Dans la première partie, notre travail a permis de montrer que des variations brutales de l'apport protéino-énergétique entraînent des modifications quantitatives mais aussi qualitatives du sommeil et de sa répartition en SOL et SP. Même si d'autres travaux sont nécessaires pour les confirmer, ces résultats sont cohérents avec le postulat d'un rôle différentiel du SOL et du SP, modulés par des signaux internes liés au statut métabolique et à l'alimentation, dans la régulation du métabolisme périphérique. Nos travaux, qui invitent donc à de nouvelles recherches pour éclairer l'implication du sommeil dans le métabolisme énergétique et protéique, n'ouvrent que peu de perspectives cliniques directes dans leur stade actuel d'avancement, si ce n'est de souligner la nécessité de considérer les troubles du sommeil, les troubles métaboliques et les troubles de l'alimentation de manière globale, et de montrer que l'apport protéino-énergétique peut non seulement influencer sur la durée de sommeil mais également sur sa répartition en SOL et SP. Par ailleurs, ils ouvrent une piste de recherche importante vers la compréhension de l'association délétère qui semble exister entre les troubles de sommeil et les troubles métaboliques.

Dans la deuxième partie, les résultats sur l'effet de la supplémentation au lactium suggèrent un rôle bénéfique de ce produit administré par voie orale sur les perturbations de sommeil induites par le stress. Ils permettent donc, entre autre, d'ouvrir une nouvelle piste de recherche sur une éventuelle application thérapeutique de ce facteur alimentaire dans la correction des problèmes de la régulation du sommeil, notamment de ceux qui comme l'insomnie, sont liés à l'anxiété et à la dépression. Il est important de signaler que beaucoup reste à faire pour comprendre à la fois les mécanismes d'action (substance active, cibles, voies d'action), la nature exacte de l'effet (avec ses effets secondaires possibles) et ses potentialités en conditions réelles, y compris par rapport aux traitements pharmaceutiques déjà existants. Pour l'heure, les résultats obtenus nous invitent simplement à considérer le lactium comme une piste de recherche intéressante pour un traitement alternatif aux traitements pharmaceutiques, et qui plus est, susceptible de restaurer un sommeil équilibré en SOL et SP.

Cependant, pas plus que les traitements pharmaceutiques l'alimentation ne constitue une solution suffisante au problème de santé publique que sont les troubles du sommeil. Ici

comme ailleurs, s'atteler à des actions curatives hasardeuses et coûteuses pour la collectivité sans s'appliquer à éviter la maladie, c'est d'abord favoriser le mal. Jusqu'à présent, les traitements pharmaceutiques disponibles se sont d'ailleurs révélés insatisfaisants (coûteux, souvent inefficaces, et surtout potentiellement riches en effets secondaires), et lorsqu'on connaît les incertitudes qui subsistent encore face à la complexité de l'organisation et de la régulation du sommeil, on peut douter de l'arrivée immédiate de la solution thérapeutique idéale sur le marché. La première voie d'action, absolument nécessaire, est donc bien celle d'une réhabilitation de la place du sommeil dans notre quotidien.

Les aliments fonctionnels et les nutraceutiques : nécessité d'un encadrement scientifique et politique

*Si le fameux cochon se contentait de sommeiller dans notre cœur,
mais il rêve !*

Gilbert Cesbron

Il a été question dans cette thèse d'aliments fonctionnels. Une grande partie du travail effectué a en effet été d'étudier l'action d'un produit alimentaire contenant au moins un principe actif, le lactium, sur la régulation du sommeil. Nous en sommes venus à envisager la possibilité d'utiliser ce produit, en vue de résoudre, au moins en partie, les problèmes de régulation du sommeil (et notamment les insomnies) liés au stress. Bien sûr, il est réjouissant, dans notre cas, de voir que nos résultats permettent d'ouvrir une piste de recherche pour une application du lactium dans les troubles du sommeil associés aux pathologies telles que l'anxiété, la dépression ou plus généralement, au stress. Nous sommes de plus convaincus que l'entreprise Ingredia saura pousser la recherche dans cette voie et lever les incertitudes qui subsistent à l'issue de nos études, avant d'utiliser les potentialités offertes par son produit pour corriger les troubles du sommeil chez l'homme. Nous saisissons cependant ici l'occasion de rappeler, en relation avec l'actualité récente dans le domaine des aliments fonctionnels, qu'il existe d'importants défis à résoudre pour que le lien entre alimentation et santé, qui soulève un grand intérêt de la part des consommateurs, soit plus efficacement géré.

Logique commerciale et nutrition-santé

Devant les attentes grandissantes de la population en matière de santé et la prise de conscience par les individus que l'alimentation est un moyen d'agir favorablement sur leur organisme, les industriels de l'agroalimentaire ont rapidement emboîté le pas aux scientifiques en proposant sur le marché de nombreux produits intégrant ces préoccupations nouvelles et accompagnés d'allégations santé. De quoi se réjouir de la convergence des intérêts scientifiques et

économiques pour progresser en adéquation avec une nouvelle et légitime attente sociale en matière de santé publique ? Peut-être, mais cela nécessite d'abord de sérieux réajustements réglementaires, notamment en ce qui concerne la communication à destination du consommateur. Avant tout, il paraît primordial de ne pas laisser la logique commerciale trouver son chemin, seule, face à une législation mal préparée à gérer l'apparition de ces nouveaux produits. Ne pas accompagner leur développement et leur promotion par des guides de bonnes pratiques, c'est s'exposer à des dérives contre-productives pour l'intérêt et la crédibilité des aliments fonctionnels sur le marché. Lorsque, à titre d'exemple, de grands groupes de l'agroalimentaire s'associent en France et ailleurs à des mutuelles de santé pour proposer un remboursement sur la présentation des preuves d'achat de tel ou tel produit enrichi en stérols végétaux, il ne s'agit plus de combattre le mauvais cholestérol, mais bien d'élargir la « cible » des consommateurs au delà des populations qui pourraient y trouver un intérêt nutritionnel spécifique. Que faire face à un tel essor du marketing lié à la nutrition-santé ? Peut-on se contenter de dire que si ça ne fait pas de bien, ça ne fait pas de mal non plus ?

Des effets pervers parfois plus tangibles que les effets réels...

Sans parler de l'inévitable source d'allégations fantasmées ou/et peu éprouvées scientifiquement qui en découle, et qui est tant bien que mal circonscrite, en France au moins, par la législation et les autorités réglementaires, cette nouvelle forme de communication sur la santé, si elle est mal encadrée, peut générer des effets pervers plus profonds. Parmi les plus néfastes : la confusion du consommateur non-expert devant la profusion et les contradictions des messages sanitaires liés aux produits alimentaires ; la situation de quasi monopole dans laquelle se retrouve, de facto, la communication en matière de nutrition-santé des groupes industriels ; et l'instauration de peurs et d'attentes qui n'ont pas lieu d'être pour la très grande majorité des gens. Créer le besoin artificiellement est le but du marketing, certes... une bonne partie de notre économie en dépend, peut-être... L'amélioration de la santé et du bien-être par l'alimentation reste cependant un objectif de santé public majeur pour lequel la concertation entre les différents acteurs (scientifiques, industriels, autorités, et associations de consommateurs) et la cohérence des actions menées ne doivent pas passer en retrait par rapport aux intérêts privés.

Il est ainsi capital de ne pas perdre de vue qu'une bonne santé s'acquiert et s'entretient avant tout par la pratique régulière de l'exercice physique et par une alimentation équilibrée qui ne saurait être remplacée par les bienfaits attendus de tel ou tel aliment spécifique. Si l'apparition des aliments fonctionnels renforce le cercle vicieux qui incite les consommateurs à se fourvoyer davantage dans une alimentation et un mode de vie nuisible à leur santé tout en leur donnant bonne conscience, alors ces produits ne constituent en aucune façon une amélioration et les bénéfices escomptés en terme de « prévention santé » ne sont que chimère.

Quant aux produits dont, effectivement, l'action est reconnue positive pour certaines pathologies, il est tout aussi préoccupant qu'ils puissent être en vente libre en grande surface et que leur consommation ne soit soumise à aucun contrôle, quand la question du suivi et de l'évaluation de l'innocuité des nouveaux aliments mis sur le marché est si délicate à traiter. Pour rester sur le même exemple, celui des aliments enrichis en phytostérols, il est ainsi très gênant que les offensives marketing poussent, en dehors de tout contrôle médical, certains à consommer des produits dont ils n'ont pas besoin et d'autres à se satisfaire de la consommation d'un produit qui risque d'être insuffisant pour eux et d'éviter ainsi l'usage de médicaments qui leur seraient indispensables. Ces produits, qui ont obtenu une allégation santé uniquement pour une catégorie de personnes, les sujets objectivement hypercholestérolémiques, et qui sont même déconseillés pour d'autres (les femmes enceintes et allaitantes ainsi que le jeune enfant) n'étaient pas voués à être consommés de façon préventive (63). Que devient de plus le rapport bénéfice/risque attendu quand on sait qu'il existe un risque de cumul au delà de l'apport recommandé et que les effets à long terme d'un apport élevé de phytostérols sont mal connus.

Un cadre légal en construction

Beaucoup d'universitaires, d'organismes scientifiques et d'autorités travaillent activement de par le monde pour établir la base scientifique légale des allégations de santé. Toute structure régulatrice devra protéger les consommateurs de revendications fausses et induisant en erreur, ainsi que satisfaire les besoins de l'industrie pour innover dans le développement, la commercialisation et la promotion de tels produits. Afin que les aliments fonctionnels livrent leurs bénéfices santé potentiels, les consommateurs doivent pouvoir comprendre clairement les critères scientifiques sur lesquels reposent les effets sanitaires et les allégations. Deux

aspects du développement des aliments fonctionnels doivent donc être attentivement contrôlés : d'une part, la justification scientifique de leurs propriétés dans le contexte de l'alimentation globale, d'autre part la communication et la présentation des allégations de santé. Ce sont les conditions nécessaires pour faire des aliments fonctionnels le vecteur, et non le parasite, d'une véritable éducation nutritionnelle à destination des consommateurs, seule démarche dans le domaine de l'alimentation à présenter dès aujourd'hui un intérêt de grande ampleur pour la santé publique et la lutte contre les maladies chroniques.

Références bibliographiques

1. **Armitage R and Hoffmann RF.** Sleep EEG, depression and gender. *Sleep Med Rev* 5: 237-246, 2001.
2. **Aserinsky E and Kleitman N.** Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118: 273-274, 1953.
3. **Benca RM.** Consequences of insomnia and its therapies. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 10: 33-38, 2001.
4. **Benca RM.** Mood disorders. In: *Principles and practice of sleep medicine* (3rd ed ed.), edited by Kryger MHR, T.; Dement, W.C. Philadelphia: WB Saunders, 2000, p. 1140-1157.
5. **Benoit O and Forêt J.** *Le sommeil humain: bases expérimentales, physiologiques et physiopathologiques.* Paris: Masson, 1995.
6. **Biggio G, Concas A, Corda MG, Giorgi O, Sanna E, and Serra M.** GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacol Ther* 48: 121-142, 1990.
7. **Bolster DR, Kubica N, Crozier SJ, Williamson DL, Farrell PA, Kimball SR, and Jefferson LS.** Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. *J Physiol* 553: 213-220, 2003.
8. **Bonnet MH.** Performance and sleepiness as a function of frequency and placement of sleep disruption. *Psychophysiology* 23: 263-271, 1986.
9. **Borbely AA.** The S-deficiency hypothesis of depression and the two-process model of sleep regulation. *Pharmacopsychiatry* 20: 23-29, 1987.
10. **Borbely AA.** Sleep in the rat during food deprivation and subsequent restitution of food. *Brain Res* 124: 457-471, 1977.
11. **Brezinova V and Oswald I.** Sleep after a bedtime beverage. *Br Med J* 2: 431-433, 1972.

12. **Butte NF, Jensen CL, Moon JK, Glaze DG, and Frost JD, Jr.** Sleep organization and energy expenditure of breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res* 32: 514-519, 1992.
13. **Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jolles P, and Fiat AM.** Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80: 155-165, 1998.
14. **Challet E, Turek FW, Laute M, and Van Reeth O.** Sleep deprivation decreases phase-shift responses of circadian rhythms to light in the mouse: role of serotonergic and metabolic signals. *Brain Res* 909: 81-91, 2001.
15. **Cornish J, Callon KE, Naot D, Palmano KP, Banovic T, Bava U, Watson M, Lin JM, Tong PC, Chen Q, Chan VA, Reid HE, Fazzalari N, Baker HM, Baker EN, Haggarty NW, Grey AB, and Reid IR.** Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology* 145: 4366-4374, 2004.
16. **Costa-Miserachs D, Portell-Cortes I, Torras-Garcia M, and Morgado-Bernal I.** Automated sleep staging in rat with a standard spreadsheet. *J Neurosci Methods* 130: 93-101, 2003.
17. **Danguir J.** Cafeteria diet promotes sleep in rats. *Appetite* 8: 49-53, 1987.
18. **Danguir J.** Nutrition, métabolisme et sommeil. *Cah Nutri Diet*: XIX-X, 1984.
19. **Danguir J.** Sleep deficits in rats with hereditary diabetes insipidus. *Nature* 304: 163-164, 1983.
20. **Danguir J and Nicolaidis S.** Dependence of sleep on nutrients' availability. *Physiol Behav* 22: 735-740, 1979.
21. **Danguir J and Nicolaidis S.** Intravenous infusions of nutrients and sleep in the rat: an ischymetric sleep regulation hypothesis. *Am J Physiol* 238: E307-312, 1980.
22. **Danguir J and Nicolaidis S.** Sleep and feeding patterns in the ventromedial hypothalamic lesioned rat. *Physiol Behav* 21: 769-777, 1978.

23. **Datta S, Patterson EH, Vincitore M, Tonkiss J, Morgane PJ, and Galler JR.** Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep/wake behavior as adults. *J Sleep Res* 9: 71-79, 2000.
24. **de Lecea L and Sutcliffe JG.** The hypocretins and sleep. *Febs J* 272: 5675-5688, 2005.
25. **Dewasmes G, Cohen-Adad F, Koubi H, and Le Maho Y.** Sleep changes in long-term fasting geese in relation to lipid and protein metabolism. *Am J Physiol* 247: R663-671, 1984.
26. **Dewasmes G, Duchamp C, and Minaire Y.** Sleep changes in fasting rats. *Physiol Behav* 46: 179-184, 1989.
27. **Dixon KD, Williams FE, Wiggins RL, Pavelka J, Lucente J, Bellinger LL, and Gietzen DW.** Differential effects of selective vagotomy and tropisetron in aminoprivic feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R997-R1009, 2000.
28. **Dorow R, Horowski R, Paschelke G, and Amin M.** Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* 2: 98-99, 1983.
29. **Drucker-Colin R and Espejel RM.** Chronic administration of chloramphenicol, a protein synthesis inhibitor, selectively decreases REM sleep. *Behav Neural Biol* 29: 410-413, 1980.
30. **Drucker-Colin R, Zamora J, Bernal-Pedraza J, and Sosa B.** Modification of REM sleep and associated phasic activities by protein synthesis inhibitors. *Exp Neurol* 63: 458-467, 1979.
31. **Dulloo AG and Girardier L.** Adaptive changes in energy expenditure during refeeding following low-calorie intake: evidence for a specific metabolic component favoring fat storage. *Am J Clin Nutr* 52: 415-420, 1990.
32. **Dulloo AG and Girardier L.** Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse. *Metabolism* 41: 1336-1342, 1992.

33. **Even PC, Mokhtarian A, and Pele A.** Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals. *Neurosci Biobehav Rev* 18: 435-447, 1994.
34. **Everson CA.** Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1054-1063, 2005.
35. **Everson CA.** Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 69: 43-54, 1995.
36. **Everson CA, Bergmann BM, and Rechtschaffen A.** Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep* 12: 13-21, 1989.
37. **Everson CA and Crowley WR.** Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E1060-1070, 2004.
38. **Everson CA, Gilliland MA, Kushida CA, Pilcher JJ, Fang VS, Refetoff S, Bergmann BM, and Rechtschaffen A.** Sleep deprivation in the rat: IX. Recovery. *Sleep* 12: 60-67, 1989.
39. **Everson CA and Wehr TA.** Nutritional and metabolic adaptations to prolonged sleep deprivation in the rat. *Am J Physiol* 264: R376-387, 1993.
40. **Fernstrom JD.** Can nutrient supplements modify brain function? *Am J Clin Nutr* 71: 1669S-1675S, 2000.
41. **File SE, Lister RG, and Nutt DJ.** The anxiogenic action of benzodiazepine antagonists. *Neuropharmacology* 21: 1033-1037, 1982.
42. **Forbes WB, Tracy CA, Resnick O, and Morgane PJ.** Effect of protein malnutrition during development on sleep behavior of rats. *Exp Neurol* 57: 440-450, 1977.
43. **Fosset S, Fromentin G, Gietzen DW, Dubarry M, Huneau JF, Antoine JM, Lang V, Mathieu-Casseron F, and Tome D.** Peptide fragments released from Phe-caseinomacropeptide in vivo in the rat. *Peptides* 23: 1773-1781, 2002.

44. **Fox PF and Flynn A.** Biological properties of milk proteins. In: *Dietary Products in Human and Health nutrition*, edited by Serrano-Rios and al. Rotterdam: Balkema, 1994, p. 97-111.
45. **Francart AL, Davenne D, Francois T, Renaud A, Garnier A, and Magnin P.** [Influence of the Scandinavian dissociated diet regime on the structure of sleep in athletes]. *C R Seances Soc Biol Fil* 183: 467-473, 1989.
46. **Friedman MI.** Fuel partitioning and food intake. *Am J Clin Nutr* 67: 513S-518S, 1998.
47. **Gally JA and Edelman GM.** Neural reapportionment: an hypothesis to account for the function of sleep. *C R Biol* 327: 721-727, 2004.
48. **Garlick PJ, Millward DJ, James WP, and Waterlow JC.** The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 414: 71-84, 1975.
49. **Gattegno L, Migliore-Samour D, Saffar L, and Jolles P.** Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein. *Immunol Lett* 18: 27-31, 1988.
50. **Gerashchenko D, Kohls MD, Greco M, Waleh NS, Salin-Pascual R, Kilduff TS, Lappi DA, and Shiromani PJ.** Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *J Neurosci* 21: 7273-7283, 2001.
51. **Gillin JC and Borbely AA.** Sleep: a neurobiological window on affective disorders. *Trends in Neurosciences* 8: 537-542, 1985.
52. **Gronfier C and Brandenberger G.** Ultradian rhythms in pituitary and adrenal hormones: their relations to sleep. *Sleep Med Rev* 2: 17-29, 1998.
53. **Groot J, Bijlsma P, Van Kalker A, Kiliaan A, Saunders P, and Perdue M.** Stress-induced decrease of the intestinal barrier function. The role of muscarinic receptor activation. *Ann N Y Acad Sci* 915: 237-246, 2000.

54. **Guesdon B, Pichon L, and Tome D.** Opioid peptides. In: *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, edited by Mine Y and Shahidi F: Taylor & Francis, 2005, p. 365-376.
55. **Hamosh M.** Digestion in the newborn. *Clin Perinatol* 23: 191-209, 1996.
56. **Hansen MK, Kapas L, Fang J, and Krueger JM.** Cafeteria diet-induced sleep is blocked by subdiaphragmatic vagotomy in rats. *Am J Physiol* 274: R168-174, 1998.
57. <http://schwann.free.fr/anxiete.html>.
58. <http://schwann.free.fr/coursstress.html>.
59. [http://schwann.free.fr/cycle veille sommeil.htm](http://schwann.free.fr/cycle_veille_sommeil.htm).
60. [http://schwann.free.fr/fonction reve sommeil.htm](http://schwann.free.fr/fonction_reve_sommeil.htm).
61. [http://schwann.free.fr/sommeil eveil.htm](http://schwann.free.fr/sommeil_eveil.htm).
62. <http://sommeil.univ-lyon1.fr>.
63. <http://www.afssa.fr>.
64. <http://www.eufic.org>.
65. <http://www.euractiv.com>.
66. <http://www.food-info.net/fr/ff/intro.htm>.
67. <http://www.inaf.ulaval.ca/>.
68. <http://www.institut-sommeil-vigilance.com>.
69. **Humphrey MJ and Ringrose PS.** Peptides and related drugs: a review of their absorption, metabolism, and excretion. *Drug Metab Rev* 17: 283-310, 1986.
70. **Jacobs BL and McGinty DJ.** Effects of food deprivation on sleep and wakefulness in the rat. *Exp Neurol* 30: 212-222, 1971.
71. **Jouvet M.** [Phylogeny of sleep stages]. *Acta Psychiatr Belg* 94: 256-267, 1994.

72. **Kant GJ, Pastel RH, Bauman RA, Meininger GR, Maughan KR, Robinson TN, 3rd, Wright WL, and Covington PS.** Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiol Behav* 57: 359-365, 1995.
73. **Kelly FJ and Goldspink DF.** The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochem J* 208: 147-151, 1982.
74. **Kuhn G.** Circadian rhythm, shift work, and emergency medicine. *Ann Emerg Med* 37: 88-98, 2001.
75. **Kupfer D.** Interaction of EEG sleep, antidepressants, and affective disease. *J Clin Psychiatry* 43: 30-36, 1982.
76. **Kushida CA, Bergmann BM, and Rechtschaffen A.** Sleep deprivation in the rat: IV. Paradoxical sleep deprivation. *Sleep* 12: 22-30, 1989.
77. **Lacey JH, Crisp AH, Kalucy RS, Hartmann MK, and Chien CN.** Weight gain and the sleeping electroencephalogram: study of 10 patients with anorexia nervosa. *Br Med J* 4: 556-558, 1975.
78. **Lacey JH, Hawkins C, and Crisp AH.** Effects of dietary protein on sleep E.E.G. in normal subjects. *Adv Biosci* 21: 245-247, 1978.
79. **Laird DA and Drexel H.** Experimenting with food and sleep:I. Effects of varying types of foods in offsetting sleep disturbances caused by hunger pangs and gastric distress- children and adults. *J Am Diet Assoc* 10: 89-94, 1934.
80. **Lauer CJ and Krieg JC.** Sleep in eating disorders. *Sleep Med Rev* 8: 109-118, 2004.
81. **Ledda F, Amerini S, Filippi S, Mantelli L, Morbidelli L, Rubino A, and Ziche M.** Cardiovascular effects of capsaicin-sensitive neurons. *Cardioscience* 4: 1-7, 1993.
82. **Leger D.** Public health and insomnia: economic impact. *Sleep* 23 Suppl 3: S69-76, 2000.

83. **Leger D, Guilleminault C, Dreyfus JP, Delahaye C, and Paillard M.** Prevalence of insomnia in a survey of 12,778 adults in France. *J Sleep Res* 9: 35-42, 2000.
84. **Leger D, Levy E, and Paillard M.** The direct costs of insomnia in France. *Sleep* 22 Suppl 2: S394-401, 1999.
85. **Lindberg T, Borulf S, and Jakobsson I.** Digestion of milk proteins in infancy. *Acta Paediatr Scand Suppl* 351: 29-33, 1989.
86. **Lonnerdal B and Iyer S.** Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 15: 93-110, 1995.
87. **Lu J, Greco MA, Shiromani P, and Saper CB.** Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci* 20: 3830-3842, 2000.
88. **Luddens H and Korpi ER.** Biological function of GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity. *J Psychiatr Res* 29: 77-94, 1995.
89. **MacFadyen UM, Oswald I, and Lewis SA.** Starvation and human slow-wave sleep. *J Appl Physiol* 35: 391-394, 1973.
90. **Maquet P.** Sleep function(s) and cerebral metabolism. *Behav Brain Res* 69: 75-83, 1995.
91. **Maubois JL and Leonil L.** Peptides du lait à activité biologique. *Lait* 69: 245-269, 1989.
92. **McNurlan MA and Garlick PJ.** Influence of nutrient intake on protein turnover. *Diabetes Metab Rev* 5: 165-189, 1989.
93. **Meisel H.** Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43: 119-128, 1997.
94. **Meisel H.** Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from in vivo digests of casein. *FEBS Lett* 196: 223-227, 1986.
95. **Meisel H and FitzGerald RJ.** Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br J Nutr* 84 Suppl 1: S27-31, 2000.

96. **Messaoudi M, Lefranc-Millot C, Desor D, Demagny B, and Bourdon L.** Effects of a tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-casein on hemodynamic responses in healthy human volunteers facing successive mental and physical stress situations. *Eur J Nutr* 44: 128-132, 2005.
97. **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.
98. **Miclo L, Perrin E, Driou A, Papadopoulos V, Boujrad N, Vanderesse R, Boudier JF, Desor D, Linden G, and Gaillard JL.** Characterization of alpha-casozepine, a tryptic peptide from bovine alpha(s1)-casein with benzodiazepine-like activity. *Faseb J* 15: 1780-1782, 2001.
99. **Minet-Ringuet J, Le Ruyet PM, Tome D, and Even PC.** A tryptophan-rich protein diet efficiently restores sleep after food deprivation in the rat. *Behav Brain Res* 152: 335-340, 2004.
100. **Moorcroft WH.** The function of sleep. Comments on the symposium and an attempt at synthesis. *Behav Brain Res* 69: 207-210, 1995.
101. **Morita K, Kuwada A, Fujihara H, Morita Y, and Sei H.** Changes in the expression of steroid metabolism-related genes in rat adrenal glands during selective REM sleep deprivation. *Life Sci* 72: 1973-1982, 2003.
102. **Moruzzi G and Magoun HW.** Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurol* 1: 455-473, 1930.
103. **Nicolaidis S and Even PC.** The ischymetric control of feeding. *Int J Obes* 14 Suppl 3: 35-49; discussion 50-32, 1990.
104. **Nishino S, Ripley B, Overeem S, Nevsimalova S, Lammers GJ, Vankova J, Okun M, Rogers W, Brooks S, and Mignot E.** Low cerebrospinal fluid hypocretin (Orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy. *Ann Neurol* 50: 381-388, 2001.

105. **Nobili L, Baglietto MG, De Carli F, Savoini M, Schiavi G, Zanotto E, Ferrillo F, and De Negri M.** A quantified analysis of sleep electroencephalography in anorectic adolescents. *Biol Psychiatry* 45: 771-775, 1999.
106. **Obal F, Jr. and Krueger JM.** GHRH and sleep. *Sleep Med Rev* 8: 367-377, 2004.
107. **Orr WC, Shadid G, Harnish MJ, and Elsenbruch S.** Meal composition and its effect on postprandial sleepiness. *Physiol Behav* 62: 709-712, 1997.
108. **Phillips RJ and Powley TL.** Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake. *Am J Physiol* 271: R766-769, 1996.
109. **Raybould HE.** Capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK in inhibition of gastric motor function induced by intestinal nutrients. *Peptides* 12: 1279-1283, 1991.
110. **Raybould HE.** Does Your Gut Taste? Sensory Transduction in the Gastrointestinal Tract. *News Physiol Sci* 13: 275-280, 1998.
111. **Raybould HE.** Visceral perception: sensory transduction in visceral afferents and nutrients. *Gut* 51 Suppl 1: i11-14, 2002.
112. **Raybould HE, Holzer P, Reddy SN, Yang H, and Tache Y.** Capsaicin-sensitive vagal afferents contribute to gastric acid and vascular responses to intracisternal TRH analog. *Peptides* 11: 789-795, 1990.
113. **Rechtschaffen A and Siegel JM.** Sleep and Dreaming. In: *Principles of Neuroscience*, edited by Kandel ER, Schwartz JH and Jessel TM. New York: McGraw-Hill, 2000, p. 936-947.
114. **Reeves PG, Nielsen FH, and Fahey GC, Jr.** AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993.
115. **Robert C, Guilpin C, and Limoge A.** Automated sleep staging systems in rats. *J Neurosci Methods* 88: 111-122, 1999.

116. **Salin-Pascual R, Gerashchenko D, Greco M, Blanco-Centurion C, and Shiromani PJ.** Hypothalamic regulation of sleep. *Neuropsychopharmacology* 25: S21-27, 2001.
117. **Saper CB, Chou TC, and Scammell TE.** The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci* 24: 726-731, 2001.
118. **Saper CB, Scammell TE, and Lu J.** Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437: 1257-1263, 2005.
119. **Sarwar G and Botting HG.** Liquid concentrates are lower in bioavailable tryptophan than powdered infant formulas, and tryptophan supplementation of formulas increases brain tryptophan and serotonin in rats. *J Nutr* 129: 1692-1697, 1999.
120. **Sayegh R, Schiff I, Wurtman J, Spiers P, McDermott J, and Wurtman R.** The effect of a carbohydrate-rich beverage on mood, appetite, and cognitive function in women with premenstrual syndrome. *Obstet Gynecol* 86: 520-528, 1995.
121. **Schachter SC and Saper CB.** Vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 39: 677-686, 1998.
122. **Scheen AJ.** [Clinical study of the month. Does chronic sleep deprivation predispose to metabolic syndrome?]. *Rev Med Liege* 54: 898-900, 1999.
123. **Scheen AJ, Byrne MM, Plat L, Leproult R, and Van Cauter E.** Relationships between sleep quality and glucose regulation in normal humans. *Am J Physiol* 271: E261-270, 1996.
124. **Scheen AJ and Van Cauter E.** The roles of time of day and sleep quality in modulating glucose regulation: clinical implications. *Horm Res* 49: 191-201, 1998.
125. **Schuld A, Blum WF, Uhr M, Haack M, Kraus T, Holsboer F, and Pollmacher T.** Reduced leptin levels in human narcolepsy. *Neuroendocrinology* 72: 195-198, 2000.
126. **Schwartz GJ and Moran TH.** Duodenal nutrient exposure elicits nutrient-specific gut motility and vagal afferent signals in rat. *Am J Physiol* 274: R1236-1242, 1998.

127. **Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, and Baskin DG.** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671, 2000.
128. **Shemyakin A and Kapas L.** L-364,718, a cholecystokinin-A receptor antagonist, suppresses feeding-induced sleep in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1420-1426, 2001.
129. **Siegel JM.** Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 437: 1264-1271, 2005.
130. **Siegel JM.** The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science* 294: 1058-1063, 2001.
131. **Siegel JM.** Why we sleep. *Scientific American* 92-97, novembre 2003.
132. **Simon C, Weibel L, and Brandenberger G.** Altérations hormonales et métaboliques lors du travail en horaires décalés. *Cah Nutri Diet* 40: 154-160, 2005.
133. **Simonson DC and DeFronzo RA.** Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems. *Am J Physiol* 258: E399-412, 1990.
134. **Singh M, Rosen CL, Chang KJ, and Haddad GG.** Plasma beta-casomorphin-7 immunoreactive peptide increases after milk intake in newborn but not in adult dogs. *Pediatr Res* 26: 34-38, 1989.
135. **Soderholm JD and Perdue MH.** Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G7-G13, 2001.
136. **Spiegel K, Knutson K, Leproult R, Tasali E, and Van Cauter E.** Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *J Appl Physiol* 99: 2008-2019, 2005.
137. **Spiegel K, Leproult R, and Van Cauter E.** Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 354: 1435-1439, 1999.
138. **Spiegel K, Leproult R, and Van Cauter E.** [Impact of sleep debt on physiological rhythms]. *Rev Neurol (Paris)* 159: 6S11-20, 2003.

139. **Spiegel K, Tasali E, Penev P, and Van Cauter E.** Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med* 141: 846-850, 2004.
140. **Sutcliffe JG and de Lecea L.** The hypocretins: excitatory neuromodulatory peptides for multiple homeostatic systems, including sleep and feeding. *J Neurosci Res* 62: 161-168, 2000.
141. **Taheri S, Lin L, Austin D, Young T, and Mignot E.** Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med* 1: e62, 2004.
142. **Taira T, Hilakivi LA, Aalto J, and Hilakivi I.** Effect of beta-casomorphin on neonatal sleep in rats. *Peptides* 11: 1-4, 1990.
143. **Teschemacher H, Koch G, and Brantl V.** Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 43: 99-117, 1997.
144. **Tome D, Dumontier AM, Hautefeuille M, and Desjeux JF.** Opiate activity and transepithelial passage of intact beta-casomorphins in rabbit ileum. *Am J Physiol* 253: G737-744, 1987.
145. **Tome D and Ledoux N.** Nutritional and physiological role of milk protein components. *Bulletin of IDF* 336: 11-16, 1998.
146. **Umbach M, Teschemacher H, Praetorius K, Hirschhauser R, and Bostedt H.** Demonstration of a beta-casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regul Pept* 12: 223-230, 1985.
147. **Valatx JL.** [Mechanisms of dream-sleep-wakefulness cycle]. *Rev Prat* 46: 2404-2410, 1996.
148. **Valatx JL.** Régulation du cycle veille-sommeil. In: *Le sommeil humain*, edited by Benoit O and Forêt J: Masson, 1995, p. 25-37.
149. **Valatx JL.** Sommeils et Insomnies. In: *Pour La Science*, janvier 1998.

150. **Van Cauter E, Plat L, and Copinschi G.** Interrelations between sleep and the somatotrophic axis. *Sleep* 21: 553-566, 1998.
151. **Vgontzas AN, Bixler EO, Tan TL, Kantner D, Martin LF, and Kales A.** Obesity without sleep apnea is associated with daytime sleepiness. *Arch Intern Med* 158: 1333-1337, 1998.
152. **Vgontzas AN and Chrousos GP.** Sleep, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and cytokines: multiple interactions and disturbances in sleep disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 31: 15-36, 2002.
153. **Vgontzas AN, Tsigos C, Bixler EO, Stratakis CA, Zachman K, Kales A, Vela-Bueno A, and Chrousos GP.** Chronic insomnia and activity of the stress system: a preliminary study. *J Psychosom Res* 45: 21-31, 1998.
154. **Von Economo C.** Sleep as a problem of localization. *J Nerv Ment Dis* 71: 249-259, 1930.
155. **Wells AS, Read NW, Idzikowski C, and Jones J.** Effects of meals on objective and subjective measures of daytime sleepiness. *J Appl Physiol* 84: 507-515, 1998.
156. **Wurtman RJ and Wurtman JJ.** Carbohydrate craving, obesity and brain serotonin. *Appetite* 7 Suppl: 99-103, 1986.
157. **Wurtman RJ, Wurtman JJ, Regan MM, McDermott JM, Tsay RH, and Breu JJ.** Effects of normal meals rich in carbohydrates or proteins on plasma tryptophan and tyrosine ratios. *Am J Clin Nutr* 77: 128-132, 2003.
158. **Young SN, Chouinard G, and Annable L.** Tryptophan in the treatment of depression. *Adv Exp Med Biol* 133: 727-737, 1981.
159. **Zammit GK, Kolevzon A, Fauci M, Shindlecker R, and Ackerman S.** Postprandial sleep in healthy men. *Sleep* 18: 229-231, 1995.

Annexes

Annexe 1 : Composition et valeur énergétique des régimes alimentaires

Les régimes alimentaires normoprotéique (P14), hypoprotéique (P5) et hyperprotéique (P35) ont été préparés selon les recommandations de l'American Institute of Nutrition (AIN-93M) (114).

Ingrédients	P5		P14		P35	
	g/kg	kcal/kg	g/kg	kcal/kg	g/kg	kcal/kg
Protéines de lait total	50	187.4	140	524.6	340	1274.0
Amidon	680.5	2497.2	622.4	2288.3	449.5	1652.6
Saccharose	132.2	518.1	100.3	393.1	73.2	286.9
Huile de soja	40	376.6	40	378.1	40	378.1
Sels Minéraux	35	0.0	35	0.0	35	0.0
Vitamines	10	39.1	10	39.1	10	39.1
Cellulose	50	0.0	50	0.0	50	0.0
Choline	2.3	0.0	2.3	0.0	2.3	0.0
Total	1000	3618.4	1000	3623.3	1000	3630.8
Valeur énergétique (kJ/g)	15.1		15.2		15.2	

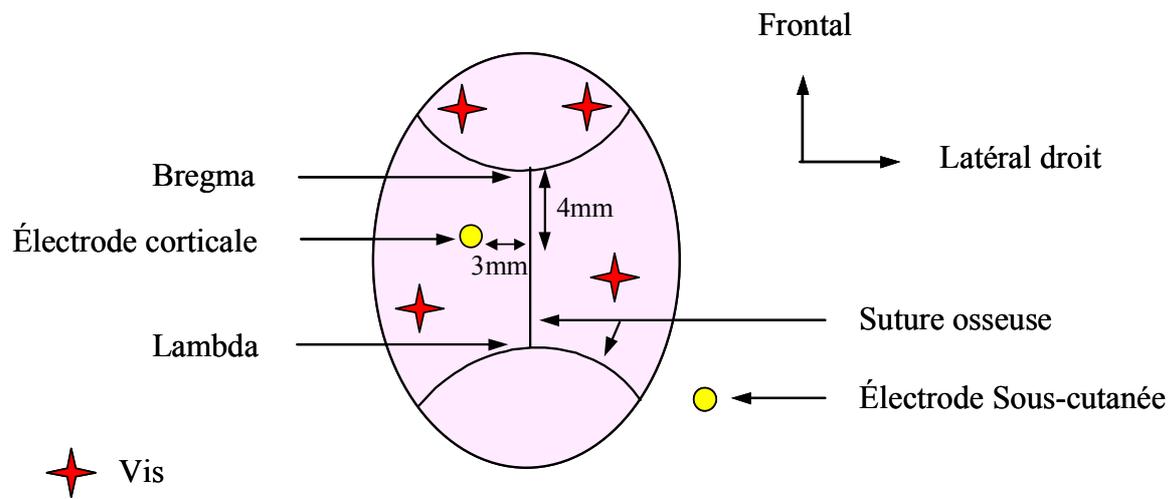


Figure A1 : Position des électrodes d'enregistrement du sommeil chez le rat
(vue du dessus du crâne)

Annexe 2 : Méthode d'étude du sommeil par analyse de l'électroencéphalogramme EEG

2.1 Procédure chirurgicale d'implantation d'une électrode corticale pour l'enregistrement du sommeil

2.1.1 Matériel

- Embase CI SMC 479872 (Radiospars)
- Fil d'argent (Phymep)
- Vis BN402 DIN84A (weber métaux)
- Dentalon®Plus, poudre 64702604 (laboratoire Kulzer, groupe heraeus)
- Dentalon, solvant 64702588 (laboratoire Kulzer, groupe heraeus)

2.1.2 Réalisation de l'électrode corticale

Cette électrode corticale, soudée au centre d'une embase femelle, est constituée d'un fil d'argent dont l'extrémité a été fondue pour former une boule d'argent de 0.5 mm de diamètre environ. L'électrode de référence est fabriquée de la même manière mais est soudée sur un pied de l'embase femelle.

2.1.3 Procédure opératoire

Les rats sont anesthésiés avec un mélange Kétamine (Imalgene 1000 ; 75mg/kg) et Xylazine (Rompun 1% ; 1mg/kg). La région crânienne est épilée puis le rat est placé sur un appareil stéréotaxique. Une incision longitudinale de 2 cm est réalisée et les os du crâne sont dégagés de façon à faire apparaître les sutures osseuses.

L'électrode corticale est ensuite posée sur la dure-mère 4 mm en arrière du bregma et 3 mm en latéral grâce à un trou de 0.6 mm de diamètre foré à l'aide d'une mini perceuse. Positionnée ainsi, elle pourra capter les signaux cérébraux transmis à la dure-mère par les structures sous jacentes, comme l'hippocampe (16). L'électrode de référence est posée sous la peau du cou. 4 vis de maintien (Weber métaux) vissées dans les os du crâne complètent le système (Figure A.1). De la résine dentaire autopolymérisable (Dentalon®Plus, laboratoire

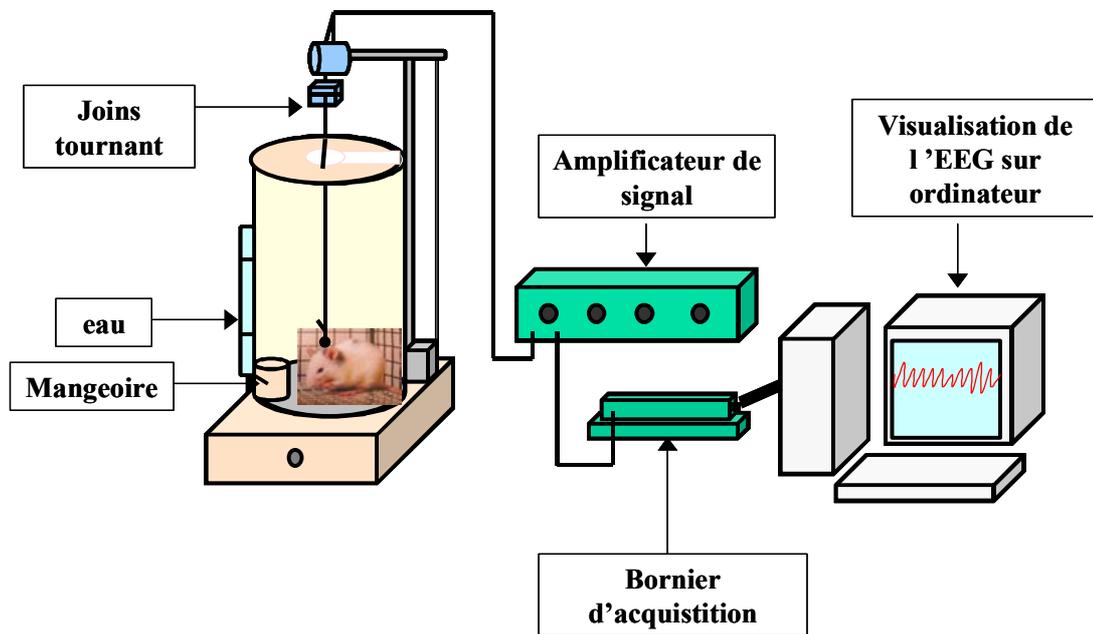


Figure A2 : Dispositif expérimental de l'enregistrement de l'EEG chez le rat

Kulzer, groupe heraeus) est finalement coulée sur l'ensemble. En prenant ancrage sur les vis de maintien la résine dentaire permet de fixer les électrodes et de maintenir le connecteur auquel elles sont soudées. Sur ce connecteur viendra ultérieurement se fixer un câble d'enregistrement du signal EEG.

Un traitement antibiotique est administré de manière à prévenir les risques d'infection.

2.2 Enregistrement et traitements des données

2.2.1 Dispositif expérimental

Chaque rat est connecté par un câble flexible à un joint tournant électrique (Air Précision, France) qui permet de suivre ses mouvements sans le gêner. Un second câble partant du joint tournant transmet le signal cortical à un amplificateur pour être amplifié 10.000 fois. Un amplificateur (Experimentia LTD, Hongrie) est relié à chaque cage. Cet amplificateur est programmé pour effectuer un premier filtrage ne prenant en compte que les ondes situées entre 0.53 et 30Hz. Tous les amplificateurs sont alors reliés à une carte d'acquisition 8 voies modèle DAS 1800 (Keithley Instrument, France). Celle-ci est connectée directement sur un ordinateur (Figure A.2).

L'acquisition du signal EEG se fait à l'aide d'un programme écrit en langage ASYST (Keithley Instruments, France) fonctionnant préférentiellement sous DOS. Ce programme écrit au laboratoire permet d'enregistrer les états de vigilances de 8 rats en même temps à une fréquence de 100 Hz. De plus, le programme assure des fonctions de filtrage des parasites. En effet, comme les ondes du sommeil se situent entre 3 et 35 Hz, les ondes inférieures à 3 Hz et les ondes supérieures à 35 Hz ne sont pas retenues par le programme.

2.2.2 Analyse des états : éveil, SOL, SP

Le traitement des enregistrements permet d'analyser chaque enregistrement indépendamment. Comme pour l'acquisition de donnée, tous les programmes ont été élaborés au laboratoire.

La discrimination des différents états se fait selon le type d'onde qui le compose et leurs amplitudes relatives : Les principales fenêtres d'ondes qui permettent de caractériser les stades de vigilance sont : les ondes delta (3-4.5 Hz) (caractéristiques du SOL et quasi inexistantes pendant le SP), les ondes thêta (5-9 Hz) présentes principalement pendant le SP, les ondes alpha et bêta (>9Hz) caractéristiques de l'éveil.

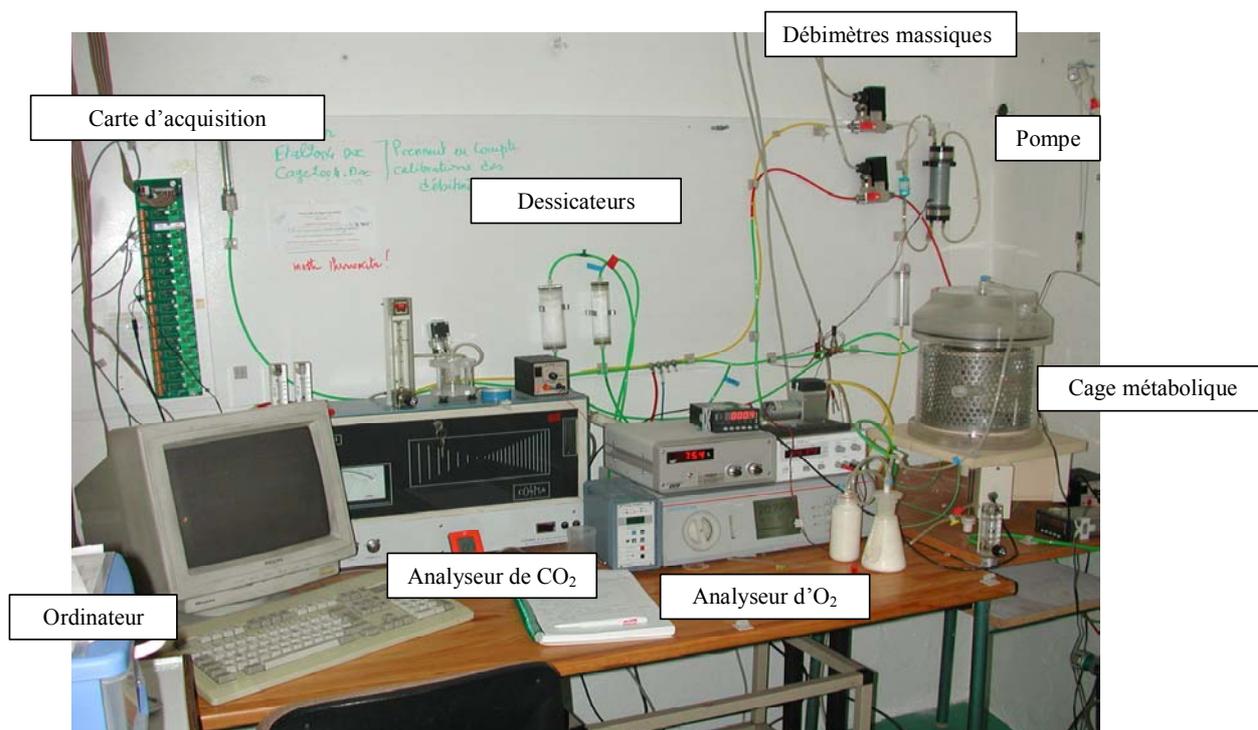


Figure A3 : Dispositif expérimental de la calorimétrie indirecte chez le rat

Annexe 3 : Evaluation de l'oxydation des substrats par la méthode de la calorimétrie indirecte

La calorimétrie indirecte est la méthode la plus couramment employée en laboratoire ou en milieu hospitalier afin de mesurer le métabolisme énergétique. Par cette technique, la dépense énergétique de l'organisme est mesurée par l'intermédiaire de l'enregistrement des consommations d'oxygène et des rejets de gaz carbonique associés à la décarboxylation oxydative des substrats énergétiques oxydés. Il existe en effet un rapport très stable entre la consommation d'oxygène et la production d'ATP quel que soit le substrat utilisé.

3.1 Dispositif expérimental

Le système de calorimétrie indirecte a été mis au point par Patrick Even (Figure A.3). Il se compose d'une cage métabolique qui loge l'animal et dans laquelle est aspiré de l'air frais. Après son passage à travers la cage, cet air est desséché et refoulé vers un débitmètre massique, puis prélevé par des analyseurs d'oxygène et de gaz carbonique. Les signaux émis par les différents appareils de mesure sont ensuite enregistrés à l'aide d'une carte d'acquisition de données reliée à un ordinateur qui enregistre les valeurs toutes les 10 secondes (33).

3.2 Métabolisme de fond et métabolisme de l'activité

Patrick Even et Stylianos Nicolaïdis ont défini une autre composante de la dépense énergétique, le métabolisme de fond (MF), qui représente la part d'énergie dépensée qui est destinée aux fonctions vitales même en période d'activité (33, 103). En effet, la cage repose sur 3 capteurs de force piezo-électriques permettant de quantifier l'activité motrice dans la cage. Grâce à cette mesure de l'activité spontanée des animaux, il est possible d'obtenir la part de l'énergie totale dépensée qui est allouée à l'activité physique de l'animal correspondant alors au métabolisme d'activité (MA) et de la différencier de celle participant aux fonctions vitales de l'organisme au même instant. Le programme informatique de filtrage du signal métabolique obtenu permet de recalculer le métabolisme débarrassé des variations

dues à l'activité locomotrice spontanée. Au final, le métabolisme total (MT) est en fait la somme du métabolisme de fond et du métabolisme lié à l'activité (MT=MF+MA). Lorsque l'animal est en période d'inactivité à jeun et à thermoneutralité, i.e. pour une température de 24-26°C, le MF est égale au métabolisme de base (MB).

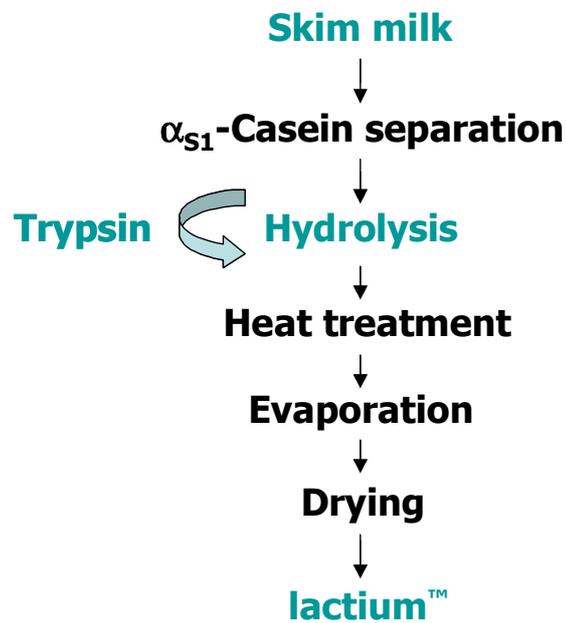
3.3 Oxydation des substrats

Les valeurs mesurées de consommation d'oxygène, VO_2 et des rejets de gaz carbonique, VCO_2 permettent de calculer un quotient respiratoire ($QR=VCO_2 / VO_2$), témoin des oxydations des substrats énergétiques à tout moment, que ce soit au repos, en période d'activité ou bien pendant la phase post-prandiale. En effet, d'après l'équation d'oxydation d'une molécule de glucose ($C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$), le QR est égal à 1. En revanche, pour une molécule d'acide gras, il y aura une consommation relative d'oxygène plus importante, et le rapport CO_2 rejeté sur O_2 consommé pourra descendre à 0.7. Le QR d'oxydation des protéines se situe quant à lui autour de 0.82. Ainsi le QR est un paramètre très important de la calorimétrie indirecte puisqu'il est spécifique de chaque type de substrat oxydé. Cependant, pour être plus précis, il est aussi nécessaire de calculer l'oxydation protéique afin de corriger les valeurs d'oxydation du glucose et des lipides données par les valeurs mesurées de VCO_2 et VO_2 . Les calculs d'oxydation des substrats sont réalisés grâce à des équations métaboliques décrites dans la littérature (133).

Annexe 4 : Informations complémentaires sur le lactium

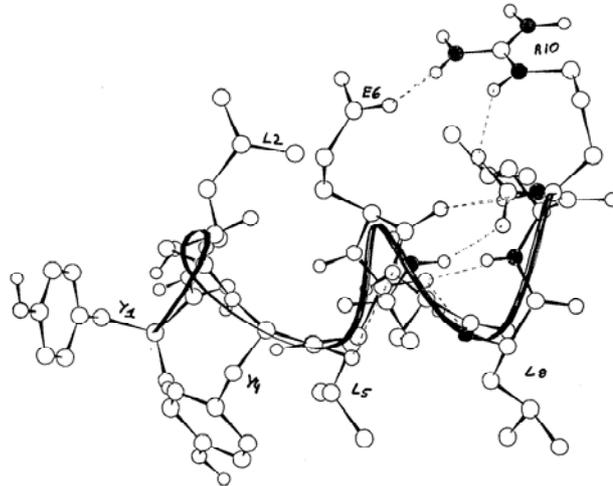
4.1 Procédé de fabrication du lactium, caractéristiques techniques et nutritionnelles et peptide casozépine

Le processus simplifié de fabrication du lactium est représenté ci dessous :



Représentation schématique du peptide casozépine :

α_{S1} -CN (f91-100)
Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg



Amphipathic helix

4.2 Informations toxicologiques et réglementaires



Stress management through nutrition

lactium™ in a few words

- 100% natural food grade ingredient: milk protein hydrolysate
 - Lactose < 0.5%, low risk of G.I. intolerance
 - Hydrolysate, low risk of allergy
- Clinically proven efficacy
- No side-effects
- Batch control
 - HPLC quantification of the bioactive peptide
 - *in vivo* activity in rats
- Not novel food
- GRAS and NDI status
- Labeling => milk protein hydrolysate in Europe
=> hydrolyzed casein in the US
- Patent ownership
 - Europe EP 0714910B1, Nov. 30, 1995
 - US Patent Number 5,846,939, Dec. 8, 1998
 - Japan 8.268903, Official Journal, Oct. 15, 1996



PRE-CLINICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES IN RATS: NO SIDE EFFECTS

- No **memory loss** (Social memory test)
- No **habituation** (CDB model)
- No **addiction** (Conditioned place preference test)
- No **sedation** (No weight increase)
- No **disinhibition** (CDB model and EPM)
- No **mutagenicity** (mammalian cell, Mouse Lymphoma Assay)
- No **behavioral toxicology** (150 mg/kg/day *p.o.* during all gestation): no change in gestating rats, no alteration in the development of their broods

11



PRE-CLINICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES: NO SIDE EFFECTS

- No **teratogenicity** (150 mg/kg/day *p.o.* during all pregnancy)
 - no general or visceral deformation in young rats
- No **acute toxicity** (*p.o.* administration, dose of 2000 mg/kg, efficient dose X 130) *OECD guideline N° 423 of December 17, 2001*
 - lactium™ was classified in the hazard Category 5 or unclassified with a LD50 higher than 2000 mg/kg.
- No **sub-acute toxicity** (*p.o.* administration, doses of 40, 200 and 1000 mg/kg/d during 28 days) *OECD guideline N° 407 of July 27, 1995*
 - no clinical, visceral or histological alteration
 - no observable toxic effects even at 1000 mg/kg/d.

No toxic effect observed with lactium™ in rats

12

4.3 Avis de l’Afssa du 1^{er} avril 2005 concernant le lactium

Maisons-Alfort, le 1^{er} avril 2005

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation d'allégations portant sur un hydrolysat trypsique de caséine bovine présenté en tant qu'ingrédient alimentaire

Par courrier reçu le 19 juillet 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 15 juillet 2004 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'évaluation d'allégations portant sur un hydrolysat trypsique de caséine bovine présenté en tant qu'ingrédient alimentaire.

En ce qui concerne l'historique du dossier, l'Afssa a été saisie en Juin 2000 pour évaluer l'allégation « contribue à réduire les effets du stress ».

Un avis en date du 19 avril 2001 concluait que l'hydrolysat trypsique de caséine bovine révélait :

- Des propriétés anxiolytiques certaines chez le rat sans entraîner d'effets secondaires ;
- Les études réalisées chez l'homme suggèrent que ces propriétés anxiolytiques se révèlent surtout lors d'administrations brèves et à dose élevée ;
- Compte tenu des éléments disponibles, l'allégation « contribue à réduire les effets du stress » revendiquée pour le produit n'était pas acceptable.

Suite à cet avis, le pétitionnaire a fourni un dossier complémentaire décrivant :

- Des études complémentaires menées chez le rat et chez l'homme ;
- L'évaluation des aliments vecteurs qui pourraient faire l'objet d'enrichissement par l'ingrédient ;
- Une synthèse de la bibliographie disponible sur l'adaptation physiologique au stress, les méthodes de mesure, les conséquences délétères d'un stress prolongé et les approches rationnelles de la gestion du stress ;
- La perception du terme « stress » par le public et les médias.

Un avis en date du 30 décembre 2002 concluait que les nouvelles études confirment les effets anxiolytiques du peptide chez le rat et son innocuité ; en revanche, l'étude clinique n'apportait pas de démonstration convaincante que des effets anxiolytiques pourraient exister chez l'homme, de plus les conditions dans lesquelles de tels effets pourraient se manifester n'étaient pas encore solidement établies. L'Afssa a estimé que les critères étudiés : effets sur les paramètres psychologiques et sur les performances réalisées lors des tests, ne correspondaient pas à ce que le consommateur est en droit d'attendre d'un produit censé contribuer à réduire les effets du stress. Par conséquent, compte-tenu des connaissances actuelles, des nouveaux éléments apportés par le nouveau dossier, des incertitudes concernant les conditions de son utilisation, l'allégation revendiquée pour l'ingrédient n'était pas acceptable.

Suite à cet avis, le pétitionnaire a envoyé un nouveau dossier présentant une nouvelle analyse statistique des résultats de l'essai clinique présentés dans le dossier précédent.

Un avis de l'Afssa en date du 25 août 2003 concluait que :

- la nouvelle analyse suggère que l'administration chronique de 150 mg/jour d'hydrolysat trypsique de caséine bovine pourrait modérer la réponse tensionnelle au stress, notamment chez les sujets qui y sont sensibles, sans induire d'effet hypo-tenseur ;

- toutefois, l'absence d'effets sur les paramètres psychologiques et sur les performances réalisées lors du test ne correspond pas à ce que le consommateur est en droit d'attendre d'un produit destiné à contribuer à réduire les effets du stress ;

En l'état du dossier, les allégations revendiquées pour l'hydrolysat demeuraient inacceptables. En revanche, une allégation restreinte précisant les effets tensionnels réellement détectés pourrait être envisageable mais sa formulation devrait être soumise à évaluation par l'Afssa et cette allégation, étant attachée exclusivement au peptide considéré, devrait être revalidée selon le vecteur employé.

Suite à l'avis de l'Afssa en date du 25 août 2003, le pétitionnaire soumet le présent dossier décrivant une nouvelle étude réalisée sur la base de questionnaires-consommateurs venant à l'appui d'une nouvelle demande d'allégations et tenant compte des remarques de ce dernier avis, à savoir :

- « peut modérer la réponse tensionnelle au stress »
- « contribue à modérer les effets tensionnels* liés au stress » *cardiovasculaires : augmentation de la pression artérielle ; digestifs : problèmes de transit ; émotionnels : démotivation ; intellectuels : défauts de concentration ; relationnels : associabilité.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Nutrition humaine », l'Afssa rend l'avis suivant :

Considérant que l'étude présentée dans le dossier porte sur l'évaluation de l'efficacité et de l'acceptabilité du produit auprès de 63 femmes se plaignant de symptômes liés au stress ; que l'objectif de cette étude était de déterminer plus particulièrement dans quelle mesure la perception des effets du stress était modifiée chez les sujets qui consommaient quotidiennement 150 mg/ j d'hydrolysat ; qu'elle a été réalisée chez des femmes présentant un trouble relatif au stress, à l'anxiété, au sommeil, à l'état de fatigue ; qu'elle s'est déroulée selon un protocole croisé contre placebo, en double insu ;

Considérant que l'efficacité du traitement était jugée à l'aide des réponses à un questionnaire qui portait sur 3 aspects potentiellement concernés par le stress : les aspects physique et physiologique, les aspects psychologiques et les aspects relationnels ; que chacun de ces aspects était décomposé en une ou plusieurs sphères, décrites à l'aide d'un ou plusieurs items ; que la méthode retenue par le pétitionnaire pour exploiter les données collectées repose sur l'analyse des effets du traitement sur le symptôme majeur (niveau d'inconfort maximal tel qu'il est perçu par le sujet) de chaque sujet, dans chaque sphère ; que le niveau de perception des symptômes décrits par les items était apprécié sur une échelle à 10 degrés ;

Considérant que les résultats de l'étude montrent un niveau d'acceptabilité élevé du produit ; que le niveau de perception du stress a nettement baissé dans le temps et ceci indépendamment du traitement ; que l'effet placebo est significatif et important, aussi bien après un traitement de 15 jours qu'après celui de 30 jours ; que cet effet placebo est marqué aussi bien chez l'ensemble des femmes que chez celles qui avaient les symptômes les plus marqués ;

Considérant qu'après un traitement de 15 jours, l'effet observé avec le produit est significativement plus important que celui du placebo sur les symptômes de la sphère cardio-vasculaire si l'on considère l'ensemble des femmes étudiées et sur les symptômes des sphères digestive, cardio-vasculaire et des autres aspects physiologiques si on ne considère que les femmes présentant les symptômes les plus intenses ;

Considérant qu'après un traitement de 30 jours, l'effet observé avec le produit est significativement plus important sur les symptômes des sphères digestive et intellectuelle si on considère l'ensemble des femmes étudiées et sur les sphères digestive, cardiovasculaire, intellectuelle, émotionnelle et sur la vie sociale si on ne considère que les femmes présentant les symptômes les plus intenses ;

Considérant que ces résultats montrent que, pour certaines sphères, la perception des effets du stress est significativement atténuée par le produit, surtout chez les femmes présentant les symptômes les plus intenses ; que cependant, compte-tenu des allégations revendiquées, l'étude est critiquable du point de vue méthodologique : (1) elle ne porte que sur une population bien déterminée, à savoir des femmes présentant au moins un trouble lié au stress ; (2) le nombre de sujets étudiés n'est pas assez élevé pour permettre de réaliser une bonne analyse statistique ; (3) la méthode d'analyse utilisée n'a pas été suffisamment justifiée et validée alors qu'elle est originale ;

Considérant par ailleurs que ce dossier de justifications scientifiques des allégations revendiquées présente des imprécisions, des lacunes et des incohérences ; que d'une part l'allégation est trop générale alors que les effets ont été observés uniquement dans une population particulière présentant des troubles spécifiques et que d'autre part sa formulation est ambiguë et les items utilisés ne correspondent pas nécessairement aux effets tensionnels tels qu'ils sont décrits dans l'allégation ;

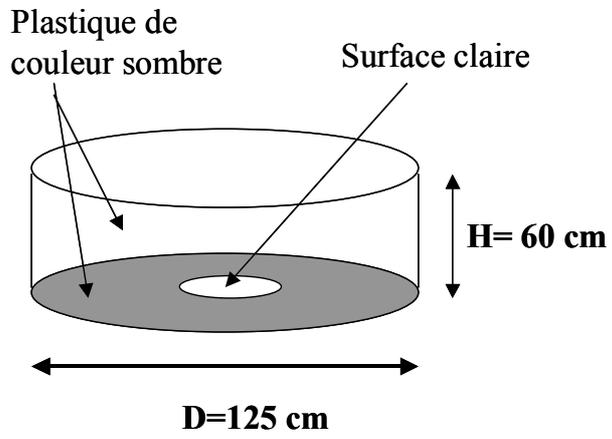
En conclusion, l'Afssa estime que :

- l'étude réalisée conforte le fait que l'administration chronique de 150 mg/jour d'hydrolysat trypsique de caséine bovine peut modérer la réponse tensionnelle au stress notamment chez les femmes qui y sont particulièrement sensibles ;
- toutefois, la démonstration des effets allégués n'est pas convaincante et les allégations telles qu'elles sont formulées ne sont pas recevables ;
- en revanche, une allégation précisant les effets réellement détectés et dans quelles conditions ils se manifestent pourrait être recevable ;

L'Afssa ajoute que, comme il était indiqué dans les avis précédents, le pétitionnaire aura à faire la preuve de l'efficacité du produit dans les conditions où ils souhaitent l'utiliser si celui-ci doit être apporté sous une autre forme que celle testée dans cette étude.

Martin HIRSCH

Vue de profil :



Vue en plongée :

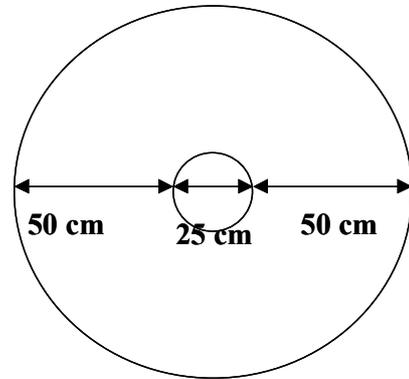


Figure A4 : schéma du dispositif de test en « open-field »

Annexe 5 : dispositif d'étude comportementale du stress, le test d'openfield

Le test d'openfield est couramment utilisé en pharmacologie, en combinaison avec d'autres dispositifs d'études comportementales, pour caractériser l'impact d'un stress et/ou de molécules anti-stress sur les animaux.

Dans le dispositif openfield, les principaux paramètres étudiés sont les déplacements horizontaux et verticaux (pour évaluer l'impact du protocole sur le comportement exploratoire des animaux, comme d'éventuels effets sédatifs) ainsi que des critères d'évaluation de la répulsion des animaux par rapport à la zone centrale, de couleur blanche (inhibition comportementale, fortement positivement corrélée à l'anxiété des animaux), tels que le temps de séjour ou le nombre de passages effectués dans cette zone (97).

Nous avons utilisé un dispositif de test de stress en openfield fait selon nos indications par Michel Belair, de l'INRA Jouy-en-Josas. Il s'agit d'une enceinte cylindrique en matière plastique sombre ouverte en haut, à fond également sombre avec une pastille claire (ou blanche) en plastique collée au centre (Figure A4). Tous les rats testés l'ont été entre 12h et 14h le jour où leur niveau d'anxiété a été évalué. Un par un, les rats ont été déposés au centre de l'enceinte cylindrique, au niveau de la zone claire et aversive, puis ils ont été laissés ainsi au calme pendant 5 minutes, au cours desquelles ils ont été filmés. Les différents critères comportementaux sont ensuite évalués « en aveugle » lors du visionnage des vidéos.

Annexe 6 : Procédure chirurgicale de cathérisation de la veine cave via la veine jugulaire

6.1 Matériel et réactif

- Chlorure de sodium à 0.9%
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) 26616297 (Prolabo)
- Tube silastic, 0.508 (D.I. mm)x 0.9398 (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 0.8 mm B72424 (Fisher Bioblock Scientific)
- Tube tygon, 0.76 (D.I.mm)x 2.29 (D.E.mm)x 0.76mm B72425 (Fisher 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)

6.2 Préparation des cathéters et des pièces de têtes

Le cathéter est fabriqué à l'aide de tubes silastic de 2 dimensions différentes. Les dimensions du cathéter sont telles que la partie antérieure du cathéter soit longue de 75mm et la partie postérieure de 115mm. Les pièces de tête (de longueur 1 cm) sont préparées à l'aide de tube technicon et de tube tygon emmanchés sur une aiguille recourbée (22G).

6.3 Protocole opératoire

Les rats sont anesthésiés avec un mélange Kétamine (Imalgene 1000 ; 75mg/kg) et Xylazine (Rompun 1% ; 1mg/kg). Les régions crâniennes et scapulaire droites 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. Le cathéter préalablement biseauté et rempli d'une solution de chlorure de sodium héparinée à 1% est introduit au niveau de la

veine jugulaire et poussé délicatement jusqu'à la veine cave inférieure. Il est ensuite fixé par deux ligatures au niveau de la veine jugulaire. La bonne mise en place du cathéter est vérifiée en aspirant le sang, puis en repoussant de la solution de chlorure de sodium héparinée dans le cathéter. La deuxième extrémité du cathéter est ensuite passée en sous-cutané puis ressortie au niveau de la tête. L'extrémité du cathéter est réajustée à la morphologie 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 à l'aide de ciment dentaire moulé autour de 4 vis préalablement posées. A la fin de l'opération, une dernière vérification du bon fonctionnement du cathéter a lieu comme précédemment puis un volume de 0.03mL de solution de PVP à 30% est repoussé dans le cathéter.

Un traitement antibiotique est administré de manière à prévenir les risques d'infection.

L'entretien régulier des cathéters est réalisé tous les 2 jours en aspirant le sang puis en repoussant 0.1mL de solution de chlorure de sodium héparinée et 0.03mL de solution de PVP de manière à éviter la formation de caillots sanguins.

Annexe 7 : Liste des abréviations

CCK : Cholécystokinine

EEG : électroencéphalogramme

GABA : Acide gamma-amino butyrique

GH : Growth hormone ou hormone de croissance

GH-RH : Growth hormone-releasing hormone

Gox :oxydations glucidiques

HH : Hypothalamo-hypophysaire (axe)

HHS : Hypothalamo-hypophysaire-surrénales (axe)

IGF-1 : Insulin growth factor-1

LH : Lateral hypothalamus

LNAAs : Large neutral aminoacids

Lox : oxydations lipidiques

PGO : Ponto-geniculate-occipital (activité)

PRL : prolactine

SOL : Sommeil à ondes lentes, stade de sommeil caractérisé par un électroencéphalogramme riche en ondes delta (= SWS ou slow wave sleep = Non-REM sleep ou Non-rapid eye movement sleep)

SP : Sommeil Paradoxal (= PS ou Paradoxical sleep = REM ou Rapid eye movement sleep)

Trp : Tryptophane

TSH : Thyrotropine

VIP : Vasoactive-intestinal peptide

VLPO : Ventro-lateral preoptic area

VMH : Ventro-medial hypothalamus