HAL
open science

Stress et prise alimentaire - Application à l'étude de l'effet anti-stress d'un extrait de levure chez le rat

Juliane Calvez

To cite this version:

Juliane Calvez. Stress et prise alimentaire - Application à l'étude de l'effet anti-stress d'un extrait de levure chez le rat. Alimentation et Nutrition. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0071 . pastel-00549011

HAL Id: pastel-00549011

https://pastel.hal.science/pastel-00549011

Submitted on 21 Dec 2010

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.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Nutrition Humaine

présentée et soutenue publiquement par

Juliane CALVEZ

le 3 novembre 2010

Stress et prise alimentaire

Application à l'étude de l'effet anti-stress d'un extrait de levure chez le rat

Directeur de thèse : **Daniel TOME**
Co-encadrement de la thèse : **Catherine CHAUMONTET et Gilles FROMENTIN**

Jury

M. Sergueï FETISSOV, Pr., Université de Rouen	Rapporteur
M. Pierre MORMEDE, DR, INRA	Rapporteur
Mme Nathalie BALLET, Dr., SI Lesaffre (LFA)	Examinateur
Mme Catherine CHAUMONTET, IR, INRA	Examinateur
Mme Christine DUVAUX-PONTER, Pr., AgroParisTech	Examinateur
M. Renaud DE BEAUREPAIRE, PU PH, CH Paul Giraud	Examinateur
M. Jan Pieter KONSMAN, CR, CNRS	Examinateur
M. Daniel TOME, Pr., AgroParisTech	Examinateur

AgroParisTech
UMR914 INRA-AgroParisTech Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire
16 rue Claude Bernard, 75231 Paris

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué dans l'unité mixte de recherche INRA/AgroParisTech de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, dans le cadre d'un contrat CIFRE financé par le groupe SI Lesaffre.

Je tiens tout d'abord à remercier Sergueï Fetissov et Pierre Mormède de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Christine Duvaux-Ponter, Jan Pieter Konsman et Renaud de Beaurepaire pour leur travail d'examinateur.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Daniel Tomé pour m'avoir conseillée et orientée au cours de mon cursus à l'AgroParisTech et pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant ces 3 ans.

Je remercie également le département Lesaffre Feed Additive de la société Lesaffre pour avoir porté ce projet et plus particulièrement Nathalie Ballet pour sa confiance, son soutien et ses conseils au cours du suivi de toutes les étapes de ce travail. Merci également à Laurent-Michel Bonnano de la société Biospringer, filiale du groupe Lesaffre produisant les extraits de levure, pour sa disponibilité. Je remercie aussi Lucie Catiau, co-doctorante CIFRE sur les extraits de levure, pour nos échanges aux cours de ces 3 ans de travaux parallèles.

J'adresse mes remerciements également à Gilles Fromentin et Catherine Chaumontet pour leur encadrement. Merci à Gilles d'avoir été disponible, de m'avoir conseillée et fait partager ses connaissances mais aussi pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de la thèse. Merci à Catherine pour sa grande disponibilité, ses encouragements et son aide technique et pratique dans toutes les étapes de ce travail. Merci aussi pour son soutien et ses conseils dans les moments difficiles. Je tiens ici à vous exprimer toute ma gratitude et vous dire que j'ai beaucoup appris et pris confiance en moi à vos côtés.

Je remercie aussi Amandine et Lynda qui ont réalisé leur stage avec moi et m'ont aidée dans les expérimentations. Merci également à Marianne Carrière pour m'avoir appris à utiliser le logiciel Observer.

Je remercie tout le personnel du laboratoire avec lequel j'ai pris énormément de plaisir à travailler. Merci en particulier à Véronique Mathé pour m'avoir aidée dans les dosages au

Luminex. Merci à Patrick Even pour m'avoir initiée aux mesures et à l'analyse des profils de prise alimentaire. Merci à Nicolas Darcel pour avoir relu mon manuscrit de thèse. Un grand merci aussi à Angélique pour son travail à l'animalerie et pour sa précieuse aide au cours des expérimentations. Je tiens également à remercier Julien, toujours d'accord pour m'aider avec les animaux. Merci aussi à tous les thésards et post-doc avec qui j'ai passé de très bons moments et qui ont toujours répondu présent pour rendre service. J'ai une pensée plus particulière pour Aurélie et Nadine qui ont été des voisines de bureau parfaites et pour Claire B et Claire F, sans qui la vie au labo aurait été moins chouette.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis pour leurs encouragements et leur soutien. Merci à mes grands parents qui m'ont donnée la possibilité de suivre de longues études. Merci à ma Maman, Marion, Lucas et ma Mamie qui sont toujours là pour moi, je le sais. Et merci à Aurélien.

RESUME

Le stress est une problématique actuelle importante aussi bien chez l'homme que chez l'animal et mettre en place des stratégies de lutte permettant de limiter ces effets parfois néfastes est crucial. En outre, l'exposition à un stress entraîne une modification du comportement alimentaire chez l'homme et chez le rongeur. Expérimentalement, cette modification est fonction de l'intensité et du type de stress employé mais aussi des régimes et aliments à disposition. Généralement, un stress moyen entraîne une diminution de la prise alimentaire chez le rat lorsqu'un régime standard est proposé. L'objectif de cette thèse est d'étudier l'effet anti-stress d'un extrait de levure grâce à différents modèles expérimentaux de stress chez le rat. Dans un premier temps, la modulation de la prise alimentaire induite par le stress et certains mécanismes à l'origine de celle-ci ont été étudiés afin d'évaluer, dans un deuxième temps, l'impact de l'administration de notre produit en utilisant l'inhibition de la prise alimentaire comme marqueur principal de stress.

Les modèles de stress utilisés sont les stress aigus de nage forcée, de contention et de défaite sociale ainsi que le stress chronique variable (SCV). Dans une première partie, nous avons montré que l'application aiguë d'un stress entraînait une diminution de la prise alimentaire. Grâce à l'utilisation de méthodes qualitatives d'évaluation de la prise alimentaire, nous avons mis en évidence que cette diminution de la prise alimentaire serait due à une augmentation du rassasiement. Ces mécanismes semblent être régulés par les neurones POMC de l'hypothalamus. De plus, nous avons étudié les effets du SCV sur la prise alimentaire et avons mis en évidence une inhibition de celle-ci qui semble s'expliquer par une augmentation chronique de l'expression de CRF, inhibiteur potentiel des neurones NPY orexigènes. Dans une deuxième partie, nous avons montré que l'extrait de levure étudié ne modifiait pas l'inhibition de la prise alimentaire liée au stress aigu ou chronique mais que son administration à long terme lors du SCV permettait de limiter l'hyperactivation de l'axe corticotrope, une modulation du système opioïdergique étant envisagée.

Ces résultats permettent d'avancer dans la compréhension des mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress. D'autres études sont à envisager avant d'émettre des conclusions concernant l'effet anti-stress de l'extrait de levure testé.

Mots clés : stress, prise alimentaire, rats, extrait de levure.

ABSTRACT

Stress is a contemporary important issue both in humans and animals and finding new ways to fight undesirable aspects of stress is crucial. Exposure to stress is known to alter feeding behavior in humans and rodents. Experimentally, modification of food intake induced by stress depends on the intensity or the type of stress paradigm used and also the diet or food available. Generally, stress causes a decrease of food intake in rats when only standard diet is available. Our objective was to study the effect of a yeast extract by way of different experimental rodent stress paradigms. First, modulations of feeding induced by stress and mechanisms underlying them were determined in male Wistar rats fed with standard diet. Then, the effect of the administration of a potentially anti-stress yeast extract was evaluated using food intake inhibition as the main stress marker.

Stress paradigms used were acute restraint (RS), forced swimming (FSS) and social defeat stress as well as chronic variable stress (CVS). We showed that acute FSS and RS induced a decrease of food intake. Through qualitative food intake assessment method, we found that decrease of feeding was due to an increase of satiation. Those mechanisms might be mediated by POMC hypothalamic neurons. Furthermore, we found that CVS induced a basal hyperactivation of the HPA axis and thus an enhanced hypothalamic CRF expression which caused a decrease of food intake probably through inhibitory effect of NPY orexigenic pathways. We used the different models of stress to test the anti-stress properties of a yeast extract on stress-induced food intake inhibition. We showed that the yeast extract had no effect on stress-induced food intake inhibition either in acute or chronic stress. However, chronic administration of the product during CVS slightly reduced the hyperactivation of the HPA axis maybe through mediation of opioid system.

Our results give further evidence concerning mechanisms underlying stress-induced food intake inhibition. Others studies are needed to conclude about the anti-stress effect of the yeast extract we tested.

Key words: stress, food intake, rats, yeast extract.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 1
RESUME 3
ABSTRACT 4
TABLE DES MATIÈRES 5
LISTE DES FIGURES 10
LISTE DES TABLEAUX 10
LISTE DES ABBREVIATIONS 14
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 17

INTRODUCTION GENERALE 19

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 25

A. LE STRESS 27
1. Définition du stress 27
1.1. L'histoire du concept de stress 27
1.2. Les notions à ne pas confondre avec le stress 29
1.2.1. Les stresseurs 30
1.2.2. L'anxiété et la peur 30
1.2.3. La dépression 30
2. Le rôle du stress, ses effets aigus et chroniques 31
2.1. Effets du stress à court terme : une réponse adaptative bénéfique 31
2.2. Effets de l'hyperactivation des systèmes de stress : les maladies de l'adaptation 33
3. Les mécanismes du stress 34
3.1. Principaux acteurs du stress 34
3.2. Axe corticotrope 35
3.2.1. Activation de l'axe corticotrope 35
3.2.2. Organisation fonctionnelle de l'activation de l'axe corticotrope 37
3.2.2.1. Stimulation du PVN de l'hypothalamus 37
3.2.2.2. De l'hypothalamus à l'hypophyse 39
3.2.2.3. De l'hypophyse à la corticosurrénale 41
3.2.3. Effets des différents acteurs de l'axe corticotrope 43
3.2.3.1. Le CRF 43
3.2.3.2. Les glucocorticoïdes 44
3.3. Axe sympathique 48
3.3.1. Activation du système LC/NA 48
3.3.2. Stimulation du système nerveux sympathique 49
3.3.3. Libération de catécholamines par les médullosurrénales 51
3.3.4. Terminaison de la réponse de l'axe sympathique 53
3.3.5. Effets périphériques et centraux des catécholamines 54
3.4. Modulation des systèmes de stress en cas de stress chronique 55
B. ETUDIER LE STRESS 56
1. Catégorisation des modèles expérimentaux de stress 56

1.1. Modèles de stress chez l'homme 57
1.2. Modèles de stress chez le rongeur 57
1.2.1. Stresseurs physiques 57
1.2.2. Stresseurs mixtes, psychologiques et physiques 58
1.2.3. Stresseurs psychologiques 58
1.2.4. Stresseurs sociaux 59
1.2.5. Intensité du stresseur 60
1.3. Modèles de stress chez les animaux d'élevage, exemple de la poule 60
2. Application du stresseur dans le temps 61
2.1. Application aiguë ou chronique 61
2.2. L'habituation au stress 61
2.3. Le phénomène de facilitation 62
3. Les marqueurs de stress 63
3.1. Principaux marqueurs de stress 63
3.2. Particularités de la poule, notion du picage 64
4. Les agents anti-stress 65
4.1. Médicaments anti-stress 65
4.2. Produits anti-stress issus de l'alimentation 66
C. STRESS ET COMPORTEMENT ALIMENTAIRE 66
1. Notions de contrôle du comportement alimentaire 67
1.1. Contrôle de la prise alimentaire à court terme : rôle du noyau du faisceau solitaire 68
1.2. Contrôle à moyen/long terme du comportement alimentaire : rôle de l'ARC 69
1.3. Au-delà du contrôle homéostatique de la prise alimentaire 71
2. Relations entre stress et prise alimentaire 72
2.1. Stress et prise alimentaire chez l'homme 72
2.2. Stress et prise alimentaire chez le rongeur 74
2.2.1. Effets du stress sur la prise alimentaire d'aliments standards 74
2.2.1.1. Effet de l'intensité et du type de stresseur 74
2.2.1.2. Effet du rythme circadien 76
2.2.2. Effet du type de régimes sur la modulation de la prise alimentaire induite par le stress 76
2.2.2.1. Modulation de la réponse de stress par le régime 76
2.2.2.2. Effets du stress sur la consommation d'aliments palatables 80
2.3. Stress et poids corporel 82
2.3.1. Chez l'homme 82
2.3.2. Chez le rongeur 83
3. Mécanismes impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids par le stress 84
3.1. Augmentation de la prise alimentaire suite à l'exposition à un stresseur de faible intensité 85
3.2. Diminution de la prise alimentaire induite par le stress 85
3.2.1. Le CRF 85
3.2.1.1. Le CRF : un neuropeptide anorexigène 85
3.2.1.2. Voies d'action de l'effet anorexigène du CRF 86
3.2.2. La noradrénaline centrale 87
3.2.3. Augmentation du glucose plasmatique 88
3.2.4. Interactions du système de stress avec des peptides impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire 88
3.2.5. Particularités du stress par injection de LPS 89
3.3. Diminution de la réponse de stress par l'ingestion d'aliments palatables 89

3.4. Rôles des glucocorticoïdes dans la stimulation de la prise alimentaire induite par le stress 90
3.4.1. Existence de 2 voies de contrôle de la prise alimentaire par les glucocorticoïdes 91
3.4.2. Mécanismes homéostatiques de contrôle de la prise alimentaire par les glucocorticoïdes 91
3.4.3. Mécanismes non homéostatiques impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire par les glucocorticoïdes 92
3.5. Stress et modulation du poids 94
3.5.1. Le stress induit à court terme une diminution du gain de poids 94
3.5.2. Stress chronique et élévation persistante de glucocorticoïdes 94
3.5.3. Implications dans l'obésité chez l'homme 95

II. TRAVAUX PERSONNELS 97

OBJECTIFS DES TRAVAUX PERSONNELS 99
A. ETUDE DE L'INHIBITION DE LA PRISE ALIMENTAIRE INDUITE PAR LE STRESS CHEZ LE RAT 100
1. Introduction 100
2. Matériels et méthodes 102
2.1. Animaux et régimes 102
2.2. Modèles de stress 103
2.2.1. Le stress de nage forcée 103
2.2.2. Le stress de contention 103
2.2.3. Le stress de défaite sociale 104
2.2.3.1. Entraînement et sélection des rats résidents 104
2.2.3.2. Le stress de défaite sociale 104
2.2.4. Le stress chronique variable 105
2.3. Protocoles expérimentaux 106
2.3.1. Etude des stress aigus de nage forcée et de contention 106
2.3.1.1. Validation des modèles de stress et effet du stress aigu sur la prise alimentaire et les neuropeptides impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress 106
2.3.1.2. Effet du stress aigu sur les profils de prise alimentaire et la séquence comportementale de satiété 107
2.3.2. Etude du stress aigu de défaite sociale 108
2.3.2. Etude du stress chronique variable 108
2.4. Variables étudiées 109
2.4.1. Niveau d'anxiété, test de l'open field 109
2.4.2. Variables plasmatiques 110
2.4.3. Paramètres hypothalamiques 110
2.4.4. Profils de prise alimentaire 111
2.4.5. Séquence comportementale de satiété 112
2.4.6. Poids et composition corporelle 113
2.5. Analyses statistiques 113
3. Résultats 114
3.1. Etude des stress aigus de nage forcée et de contention 114
3.1.1. Validation des modèles de stress de nage forcée et de contention 114
3.1.2. Mesures de la prise alimentaire et gain de poids 115
3.1.3. Paramètres impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress 117
3.1.4. Mesures des profils de prise alimentaire et analyses du comportement 117
3.2. Etude du stress aigu de défaite sociale 123
3.2.1. Validation du modèle de stress de défaite sociale 124

3.2.2. Mesures de la prise alimentaire et gain de poids 124
3.2.3. Paramètres impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress 125
3.3. Etude du stress chronique variable 125
3.3.1. Validation du modèle de stress chronique variable 125
3.3.2. Mesures de la prise alimentaire et gain de poids 127
3.3.3. Paramètres impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress 129
4. Discussion 130
4.1. Validation des modèles de stress 130
4.2. L'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu semble due à une augmentation du rassasiement 133
4.3. L'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress chronique, relation avec la diminution du gain de poids 138
B. APPLICATION DES MODELES DE STRESS A L'ETUDE DE L'EFFET ANTI-STRESS D'UN EXTRAIT DE LEVURE 141
1. Introduction 141
2. Matériels et méthodes 144
2.1. Animaux et régimes 144
2.2. Produits anti-stress 145
2.2.1. Exl2006 145
2.2.1. Diazépam 146
2.3. Protocoles expérimentaux 146
2.3.1. Effet anti-stress de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu 147
2.3.2. Effet anti-stress de l'exl2006 sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu de contention et effet du lot de production de l'exl2006 148
2.3.3. Effet anti-stress de l'exl2006 lors du modèle de SCV 149
2.4. Analyses statistiques 150
3. Résultats 151
3.1. Pertinence de l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu comme marqueur de stress pour l'étude d'un produit anti-stress chez le rat 151
3.2. Effet de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu de nage forcée, de contention ou de défaite sociale 151
3.3. Effet anti-stress de l'exl2006 sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu de contention et effet du lot de production de l'exl2006 153
3.4. Effet anti-stress de l'exl2006 lors du modèle de stress chronique variable 154
4. Discussion 157

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 163

BIBLIOGRAPHIE 171

ANNEXES 193

ANNEXE 1 : HISTORIQUE DU CONCEPT DE STRESS 195
ANNEXE 2 : ARTICLE 1 "INHIBITION OF FOOD INTAKE INDUCED BY ACUTE STRESS IN RATS IS DUE TO SATIATION EFFECTS" 202
ANNEXE 3 : ARTICLE 2 "CHRONIC VARIABLE STRESS INDUCES A DIMINUTION OF FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT GAIN IN RATS" 231
ANNEXE 4 : PROCESS DE FABRICATION DES LEVURES PAR LES BIOTECHNOLOGIES 254

ANNEXE 5 : TABLEAU RECAPITULATIF DES ETUDES REALISEES TESTANT L'EFFET ANTI-STRESS D'EXTRAITS DE LEVURE LORS DE MODELES DE STRESS AIGU 255

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Enquête Baromètre santé 2005, survenu d'un épisode de stress dans le dernier mois parmi l'ensemble des actifs occupés (n = 15994). 22
- Figure 2. Enquête ANACT/CSA 2009, sentiments de stress chez les salariés actifs. 22
- Figure 3.Triade typique de la phase de réaction du syndrome général d'adaptation de Selye. 27
- Figure 4. Activation de l'axe corticotrope suite au stress. 35
- Figure 5. Diagramme schématique des relations entre les divisions magnocellulaires (zones ombrées) et parvocellulaires du PVN de l'hypothalamus. 37
- Figure 6. Intégration des stimuli stressants représentant une perturbation réelle de l'homéostasie : projections principales innervant les neurones du PVN de l'hypothalamus. 38
- Figure 7. Projections du système limbique vers les voies de régulations de la réponse de stress. 39
- Figure 8. Représentation schématique et temporelle de la réponse endocrine du stress. 40
- Figure 9. Représentation schématique de la maturation de la POMC. 41
- Figure 10. Représentation schématique des relations entre le PVN de l'hypothalamus et l'hypophyse. 41
- Figure 11. Coupe schématique d'une glande surrénale. 42
- Figure 12. Voies principales de biosynthèse de la corticostérone et du cortisol. 43
- Figure 13. Interactions entre les neurones CRF du noyau PVN de l'hypothalamus et les noyaux noradrénergiques du système LC/NA du tronc cérébral (cerveau de rat). 48
- Figure 14. Organisation du système nerveux autonome sympathique et parasympathique. 50
- Figure 15. Activation de l'axe sympathique lors du stress. 51
- Figure 16. Synthèse des catécholamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline). 52
- Figure 17. Libération de catécholamines par les cellules chromaffines de la médullosurrénale stimulées par le système nerveux sympathique. 52
- Figure 18. Illustration d'un stress de nage forcée chez le rat. 58
- Figure 19. Illustration d'un stress de choc électrique à la patte chez le rat. 58
- Figure 20. Illustration d'un stress de contention chez le rat. 59
- Figure 21. Schéma d'un terrier artificiel utilisé pour le stresseur social « Visible Burrow System ». 60
- Figure 22. Poule dont les plumes ont été arrachées par picage de ses congénères. 65
- Figure 23. Représentation schématique des principales voies de régulation de la prise alimentaire. 68
- Figure 24. Interactions entre les neurones NPY/AgRP et POMC au sein du noyau arqué de l'hypothalamus. 70
- Figure 25. Régulation schématique de la prise alimentaire par le système de l'hédonisme. 72
- Figure 26. Augmentation de la réponse à un stress de contention par l'administration d'un régime monotone hyperlipidique. 78
- Figure 27. Atténuation de la réponse à un stress de contention par l'administration d'un régime composé d'un choix entre un aliment standard et des aliments palatables (saindoux et saccharose). 79
- Figure 28. Illustrations d'un stress de défaite sociale chez le rat. 105
- Figure 29. Protocole expérimental pour valider les modèles de stress aigus de contention et de nage forcée et étudier leurs effets sur la prise alimentaire et les neuropeptides impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress. 107
- Figure 30. Planning de mesures de la prise alimentaire après l'exposition à un stress aigu de nage forcée, de contention ou de défaite sociale. 107

- Figure 31. Protocole expérimental pour étudier l'effet des stress aigus de nage forcée et de contention sur les profils de prise alimentaire et la séquence comportementale de satiété. 108
- Figure 32. Protocole expérimental pour valider le modèle de stress aigu de défaite sociale et étudier son effet sur la prise alimentaire. 108
- Figure 33. Protocole expérimental pour valider le modèle de stress chronique variable et étudier son effet sur prise alimentaire. 109
- Figure 34. Représentation schématique du dispositif d'open-field vu de profil. 110
- Figure 35. Prise alimentaire mesurée après le stress de nage forcée. 116
- Figure 36. Prise alimentaire mesurée immédiatement après le stress de contention. 116
- Figure 37. Profils de prise alimentaire obtenus après le stress de nage forcée. 118
- Figure 38. Séquence comportementale de satiété lors de la 1ère heure de prise alimentaire après le stress de nage forcée. 120
- Figure 39. Durée (A) et fréquence (B) des différents comportements recensés lors de la 1ère heure de prise alimentaire après le stress de nage forcée. 120
- Figure 40. Profil de prise alimentaire obtenu immédiatement après le stress de contention. 121
- Figure 41. Séquence comportementale de satiété lors de la 1ère heure de prise alimentaire après le stress de contention. 123
- Figure 42. Durée (A) et fréquence (B) des différents comportements recensés lors de la 1ère heure de prise alimentaire après le stress de contention. 123
- Figure 43. Prise alimentaire mesurée immédiatement après le stress de défaite sociale. 125
- Figure 44. Prise alimentaire sur 24 h mesurée lors du SCV. 128
- Figure 45. Poids des animaux mesuré lors du SCV. 129
- Figure 46. Protocole expérimental pour tester l'effet de l'administration de l'exl2006 (ou du diazépam) sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu. 147
- Figure 47. Mesures de la prise alimentaire après l'exposition à un stress aigu lors des expérimentations testant l'effet de l'administration d'exl2006 ou de diazépam. 148
- Figure 48. Protocole expérimental pour tester l'effet de l'exl2006 et de son lot de production sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu de contention. 149
- Figure 49. Mesures de la prise alimentaire après l'exposition à un stress aigu de contention lors de l'expérimentation testant l'effet de l'administration d'exl2006 et du lot de production de l'exl2006. 149
- Figure 50. Protocole expérimental pour tester l'effet de l'exl2006 lors du SCV. 150
- Figure 51. Effet de l'administration de diazépam sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress de nage forcée (A) ou de contention (B). 151
- Figure 52. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress de nage forcée de 10 min (A) et 30 min (B). 152
- Figure 53. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress de contention. 152
- Figure 54. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress de défaite sociale. 152
- Figure 55. Effet de l'administration de différents lots de production d'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu de contention. 153

- Figure 56. Effet de l'administration de différents lots de production d'exl2006 sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu de contention..... 154
- Figure 57. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'augmentation de la concentration plasmatique basale de corticostérone induite par 13 jours de SCV..... 154
- Figure 58. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire quotidienne et cumulée induite par 13 jours de SCV. 156
- Figure 59. Effet de l'administration de l'exl2006 sur la diminution de gain de poids induite par 13 jours de SCV. 156
- Figure 60. Effet de l'administration de l'exl2006 sur la diminution de masse de tissu adipeux sous cutané induite par 13 jours de SCV. 157
- Figure 61. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'augmentation de l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF et le MOR induite par 13 jours de SCV. 157
- Figure 62. Hypothèses concernant les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu. 168
- Figure 63. Hypothèses concernant les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress chronique. 168

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1. Traitements psychotropes consommés au cours de la vie rapportés par les sujets inclus dans l'enquête « Santé mentale en population générale » (n = 39785). 23
- Tableau 2. Evolution du concept de stress. 29
- Tableau 3. Syndrome de stress : adaptations comportementales et physiques. 32
- Tableau 4. Composition et valeur énergétique du régime standard « P14 »..... 102
- Tableau 5. Planning du stress chronique variable sur 13 jours..... 106
- Tableau 6. Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour les amplifications en PCR quantitative. 111
- Tableau 7. Description des comportements recensés lors de l'analyse vidéo de la 1ère heure de prise alimentaire suivant le stress de nage forcée ou de contention. 113
- Tableau 8. Paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après le stress de nage forcée 114
- Tableau 9. Paramètres plasmatiques et hypothalamiques déterminés après le stress de nage forcée. 114
- Tableau 10. Paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après le stress de contention. 115
- Tableau 11. Paramètres plasmatiques et hypothalamiques déterminés après le stress de contention..... 115
- Tableau 12. Prise alimentaire basale, poids et gain de poids basal et après le stress de nage forcée. 116
- Tableau 13. Prise alimentaire basale, poids et gain de poids basal et après le stress de contention. 117
- Tableau 14. Paramètres relatifs au repas lors de l'enregistrement en continu de la prise alimentaire suite au stress de nage forcée..... 119
- Tableau 15. Paramètres relatifs au repas lors de l'enregistrement en continu de la prise alimentaire suite au stress de contention. 122
- Tableau 16. Paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après le stress de défaite sociale. 124
- Tableau 17. Paramètres plasmatiques et hypothalamiques déterminés après le stress de défaite sociale..... 124
- Tableau 18. Prise alimentaire basale, poids et gain de poids basal et après le stress de défaite sociale. 125
- Tableau 19. Paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après 13 jours de SCV. 126
- Tableau 20. Paramètres plasmatiques et hypothalamiques déterminés après 13 jours de SCV..... 126
- Tableau 21. Composition corporelle déterminée après 13 jours de SCV. 126
- Tableau 22. Prise alimentaire cumulée et gain de poids cumulé de base et lors du SCV..... 127
- Tableau 23. Analyse des spectres de chromatographie de différents lots de production de l'exl2006..... 142
- Tableau 24. Récapitulatif et identification des lots de production des extraits de levure exl2006 testés lors des différentes expérimentations. 146
- Tableau 25. Effet de l'administration de l'exl2006 sur les paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après 13 jours de SCV. 155
- Tableau 26. Récapitulatif des résultats obtenus sur l'effet de l'exl2006 lors des différents modèles de stress étudiés. 158

LISTE DES ABBREVIATIONS

A	Adrénaline
Acc	Noyau accumbens
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
ADNc	ADN complémentaire
AgRP	Peptide apparenté à agouti
ANOVA	Analyse de la variance
AHN	Noyau hypothalamique antérieur
ARC	Noyau arqué de l'hypothalamus
ARNm	ARN messager
AVP	Vasopressine
β-LPH	Lipotropine-β
BST	Noyau du lit de la strie terminale
BSS	Séquence comportementale de satiété
CART	Cocaine-and-amphetamine-related transcript
CCK	Cholécystokinine
CeA	Noyau central de l'amygdale
CORT	Corticostérone
CONT	Stress de contention
CRF	Corticolibérine
CRF1 et 2	Récepteurs 1 et 2 au CRF
CSP	Catégorie socio-professionnelle
CV	Organes circumventriculaires
DMH	Noyau dorsomédian de l'hypothalamus
DS	Stress de défaite sociale
E	Epinéphrine
Exl	Extrait de levure
G/E	Energie ingérée sous forme de glucides par rapport à l'énergie totale
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GLP-1	Glucagon like peptide-1
GnRH	Gonadolibérine
GR	Récepteurs aux glucocorticoïdes

GRE	Elément de réponse aux glucocorticoïdes
HG	Hyperglucidique
HL	Hyperlipidique
HP	Hyperprotéique
Icv	Injection intracérébroventriculaire
Ip	Injection intrapéritonéale
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
L/E	Energie ingérée sous forme de lipides par rapport à l'énergie totale
LC	Locus coeruleus
LH	Aire hypothalamique latérale
LiCl	Chlorure de lithium
LPS	Lipopolysaccharide
LS	Septum latéral du système limbique
MCH	Melanin concentrating hormone
MCR	Récepteur aux mélanocortines
MeA	Noyau médian de l'amygdale
mnPOA	Noyau préoptique médian
mPFC	Cortex préfrontal médian du système limbique
mPOA	Aire préoptique médiane de l'hypothalamus
MOR	Récepteur μ aux opioïdes
MR	Récepteurs aux minéralocorticoïdes
MSH	Mélanotropine
NA	Noradrénaline
NE	Norépinéphrine
NF	Stress de nage forcée
NPY	Neuropeptide Y
NTS	Noyau du faisceau solitaire
Orex.	Orexines
OT	Oxytocine
OVLT	Organe vasculaire de la lamina terminalis
Oxm	Oxyntomoduline
PA	Prise alimentaire
PBN	Noyau parabrachial du tronc cérébral

P/E	Energie ingérée sous forme de protéines par rapport à l'énergie totale
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PC-1	Proconvertase 1
PMV	Noyau prémamillaire ventral de l'hypothalamus
PNMT	Phenylethanolamine N-methyltransferase
POMC	Proopiomélanocortine
PVN	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
PYY	Peptide YY
SCV	Stress chronique variable
SFO	Organe subfornical
SGA	Syndrome d'adaptation généralisée
SON	Noyau supraoptique de l'hypothalamus
VBS	Visible Burrow System
VMH	Noyau ventromédial de l'hypothalamus
vSUB	Subiculum ventral du système limbique
VTA	Aire ventrale tégmentaire

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles

Calvez J, Fromentin G, Nadkarni N, Darcel N, Even P, Tomé D, Ballet N, Chaumontet C. Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiation effects. En cours de soumission.

Calvez J, Fromentin G, Nadkarni N, Darcel N, Even P, Tomé D, Ballet N, Chaumontet C. Chronic variable stress induces a diminution of food intake and body weight in rats. En cours de soumission.

Communications

Calvez J, Fromentin G, Tomé D, Ballet N, Chaumontet C. Stress et prise alimentaire : comparaison du stress de nage forcée et du stress de contention chez le rat. SFN, 26-28 novembre 2008 (Brest, France). Communication affichée.

Calvez J, Fromentin G, Tomé D, Ballet N, Chaumontet C. First hours food intake after stress is marker for anti-stress activities. SSIB, 28 juillet-1er août 2009 (Portland, USA). Communication affichée.

Calvez J, Fromentin G, Tomé D, Ballet N, Chaumontet C. La prise alimentaire comme marqueur du stress de contention chez le rat. SFN, 10-12 décembre 2009 (Montpellier, France). Communication affichée.

Calvez J, Fromentin G, Tomé D, Ballet N, Chaumontet C. Stress chronique variable chez le rat : Relation entre la diminution du poids et la prise alimentaire. SFN, 10-12 décembre 2009 (Montpellier, France). Communication orale.

Calvez J, Nadkarni N, Fromentin G, Darcel N, Tomé D, Ballet N, Chaumontet C. Effect of chronic variable stress on central regulation of food intake and neurogenesis. SSIB, 13-17 juillet 2010 (Pittsburg, USA). Communication affichée.

INTRODUCTION GENERALE

Chaque individu, humain et animal, est confronté dans sa vie quotidienne à des situations stressantes.

Chez l'homme, le stress est omniprésent dans la vie personnelle et professionnelle. En France, selon le Baromètre santé 2005[1], près de 3 actifs sur 4 ont déclaré un épisode de stress lors du mois précédant le sondage, aussi bien dans leur vie personnelle (34,4 %) que professionnelle (59,4 % ; Figure 1). De la même manière, le sondage ANACT/CSA 2009[2] sur le stress au travail indique que 41 % des salariés sont en permanence assez ou très stressés (Figure 2). Quelles que soient les origines du stress déclarées, les conséquences sont importantes. Ainsi, le nombre de cas de maladies cardiovasculaires, de dépressions, de troubles musculo-squelettiques et de lombalgies attribuables au stress pour l'année 2000 en France se situerait entre 310000 et 400000 d'après le Baromètre santé 2005. Le stress est considéré comme étant à l'origine de 18 % de l'absentéisme au travail en France[3]. Le coût social et économique, direct et indirect, du stress est donc considérable et peut être évalué entre 1,2 à 2 milliards d'euros par an[4]. Pour lutter contre ce phénomène, la consommation de médicaments psychotropes[5] n'a cessé d'augmenter ces dernières années et plus d'un tiers des français rapporte avoir déjà fait usage au cours de leur vie d'un tel traitement. Les anxiolytiques occupent la première place devant les hypnotiques et les antidépresseurs[6] (Tableau 1). Cependant, les médicaments psychotropes sont généralement mal adaptés et mal utilisés et sont à l'origine d'effets secondaires néfastes comme la somnolence, des troubles de l'équilibre, de la mémoire et surtout un important risque de dépendance. Trouver des alternatives aux médicaments psychotropes pour diminuer leur exposition est donc important.

---

[1] Enquête déclarative en population générale réalisée en 2004 par téléphone sur 30514 individus de 12-75 ans par l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES).

[2] Enquête déclarative réalisée en 2009 par téléphone sur 1000 salariés actifs français occupés de plus de 18 ans par l'Agence Nationale pour l'Amélioration des Conditions de Travail (ANACT) et le CSA, institut français d'études de marketing et d'opinion.

[3] D'après le rapport annuel (2009) de l'agence européenne pour la santé et la sécurité au travail (EU-OSHA) basé sur des statistiques nationales et internationales.

[4] D'après le rapport du centre d'analyse stratégique : « La santé mentale, l'affaire de tous. Pour une approche cohérente de la qualité de la vie » remis au gouvernement en novembre 2009.

[5] Les médicaments psychotropes sont des composés pharmacologiques possédant une propriété dont l'action se situe spécifiquement sur l'activité cérébrale. Il y a cinq grandes familles de médicaments psychotropes : les anti-dépresseurs, les neuroleptiques, les hypnotiques, les anxiolytiques et les régulateurs de l'humeur.

[6] Enquête « Santé mentale en population générale » réalisée par l'unité INSERM U657 grâce à la mise à disposition du fichier national des données concernant l'usage de psychotropes et faisant l'objet d'un rapport parlementaire « Le bon usage des médicaments psychotropes ». Rapport N° 422 (2005-2006).

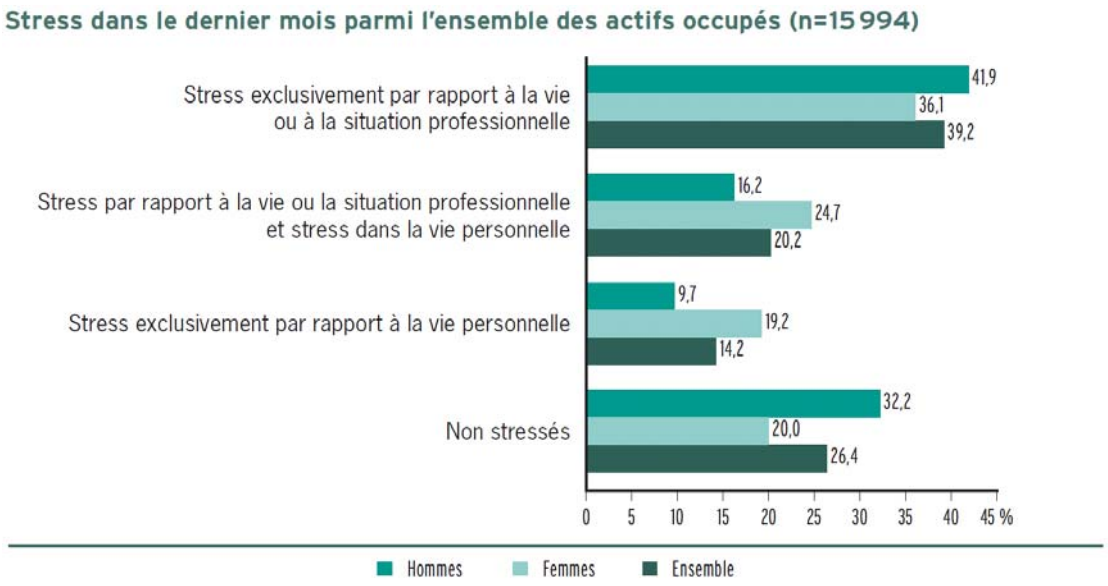


Figure 1. Enquête Baromètre santé 2005, survenu d'un épisode de stress dans le dernier mois parmi l'ensemble des actifs occupés (n = 15994).

73,7 % des actifs occupés ont répondu avoir été confrontés à un épisode de stress au cours du mois passé. (D'après Baromètre santé 2005 Attitudes et comportements de santé, 2007)

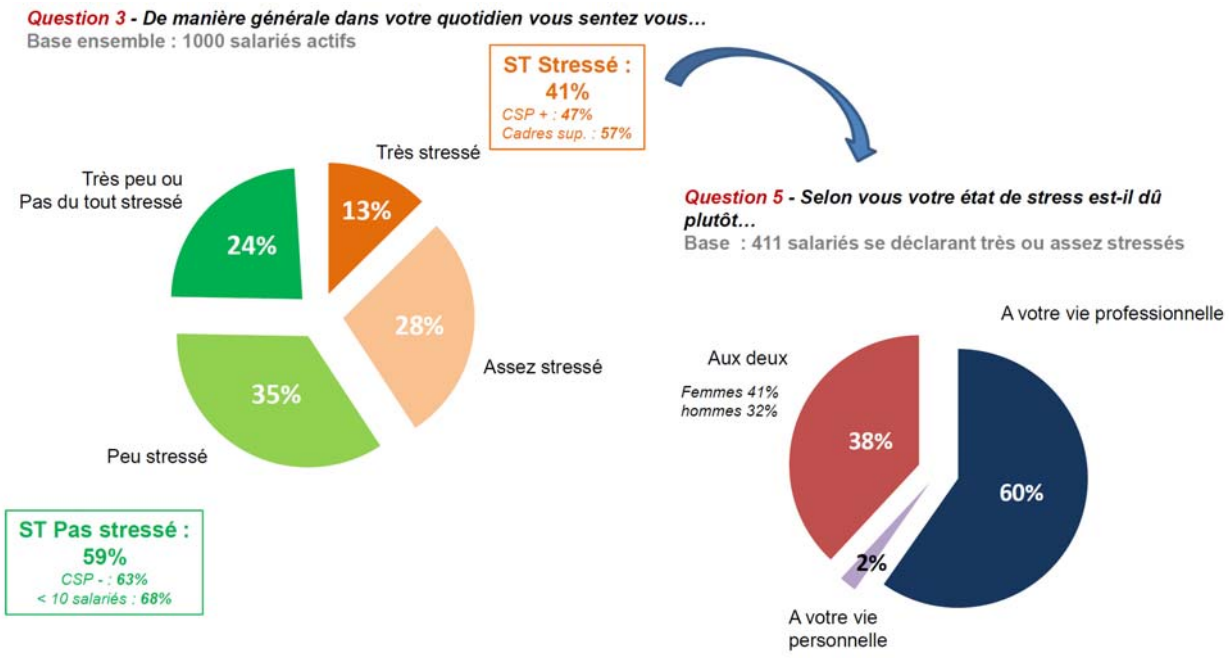


Figure 2. Enquête ANACT/CSA 2009, sentiments de stress chez les salariés actifs.

41 % des salariés actifs se sentent assez ou très stressé et parmi eux, 60 % le sont exclusivement à cause de leur vie professionnelle contre 2 % exclusivement à cause de leur vie personnelle. CSP : catégorie socio-professionnelle(D'après Le stress au travail, Rapport d'analyse ANACT, 2009)

Tableau 1. Traitements psychotropes consommés au cours de la vie rapportés par les sujets inclus dans l'enquête « Santé mentale en population générale » (n = 39785).

	% pondéré
Au moins un médicament psychotrope	36,3
Anxiolytiques	19,4
Hypnotiques	9,2
Antidépresseurs	11,6
Thymorégulateur	0,4
Neuroleptiques	1,3
Antiépileptiques	0,9
Remèdes traditionnels	0,4
Homéopathie	1,3
Autres	3,9

36,3 % des français rapportent avoir consommé au cours de leur vie au moins un médicament psychotrope, les médicaments anxiolytiques arrivant en première position (19,4 %) devant les antidépresseurs (11,6 %). (D'après le rapport sur le bon usage des médicaments psychotropes, par Mme Maryvonne Briot, 2006)

Le stress touche aussi le monde animal et représente un problème éthique et économique chez les animaux d'élevage. Une problématique importante en élevage est celle du bien-être animal. De nombreux concepts peuvent définir le bien-être, mais il se réfère principalement à l'état psychologique subjectif d'un animal en relation avec son environnement interne et externe (Fraser, 1999; Rushen, 2003). De manière schématique, le bien-être animal peut se définir de 3 façons différentes : l'absence de mortalité et de morbidité, l'absence de stress ou la possibilité d'exprimer les comportements naturels de l'espèce (Larrère, 2007). Le stress induit donc une diminution du bien-être. Ainsi, une mesure classique consiste à évaluer les marqueurs physiologiques de stress (Mormede *et al.*, 2007). Le maintien du bien-être animal est une obligation réglementaire permettant de respecter l'animal comme un être sensible mais est également d'une utilité économique car une baisse du bien-être engendre souvent une baisse de la productivité en élevage (Veissier *et al.*, 2007). La question du bien-être animal et de l'absence de stress dans les élevages est donc fondamentale aujourd'hui. D'après l'enquête Eurobaromètre[7] portant sur les attitudes des consommateurs concernant le bien-être des animaux d'élevage, 78 % des européens estiment qu'il est à améliorer. Ainsi, trouver des solutions environnementales, techniques ou nutritionnelles pour améliorer le bien-être des animaux d'élevage est une préoccupation actuelle.

[7] Enquête Eurobaromètre portant sur les « Attitudes des consommateurs concernant le bien-être des animaux d'élevage », conduite par le secteur « Analyse de l'opinion publique » de la Commission européenne. L'enquête a fait l'objet de deux campagnes de sondages en 2005 et 2006, interrogeant 52000 personnes dans l'ensemble des pays membres de l'Union.

Une des caractéristiques du stress est de modifier le comportement alimentaire. Chez l'homme, certains mangent plus et d'autres moins lorsqu'ils sont stressés. D'autres encore ne modifient pas leurs habitudes alimentaires. Dans tous les cas, les aliments « plaisir » gras et sucrés sont souvent préférés. Par conséquent, de nombreuses données indiquent que le stress participe au développement du surpoids et de l'obésité (Lecerf, 2006). Toutefois, fondamentalement, la première réaction de l'organisme à un agent stressant est une redirection de l'énergie vers le cerveau et les muscles impliqués dans la réponse adaptative associée à une inhibition en parallèle des fonctions non nécessaires à cette réponse, comme la prise alimentaire. Ainsi, dans de nombreux modèles animaux expérimentaux, le stress induit une inhibition de la prise alimentaire. Compte tenu de l'importance actuelle du stress et l'accroissement des problèmes de santé publique liés à la consommation alimentaire, comprendre la relation entre stress et prise alimentaire est une question majeure car cette relation ne semble pas simple et apparaît fonction de nombreux facteurs.

Ce travail de thèse, soutenu par la filiale Lesaffre Feed Additive de la société SI Lesaffre, a pour but d'évaluer l'effet anti-stress d'un aliment fonctionnel[8], un extrait de levure. Cet extrait de levure a montré des propriétés anti-stress chez la poule et nous avons poursuivi les investigations concernant ce produit. Pour ce faire, nous avons développé au laboratoire des modèles expérimentaux de stress chez le rat, puis caractérisé l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress et étudié certains mécanismes à l'origine de celle-ci. L'utilisation de méthodes de mesures qualitatives de la prise alimentaire ainsi que la détermination de l'expression centrale de neuropeptides nous a permis d'obtenir des données utiles à la compréhension des mécanismes responsables de l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress chez le rat. Grâce à ces modèles, nous avons évalué l'impact de l'administration d'un extrait de levure potentiellement anti-stress en utilisant l'inhibition de la prise alimentaire comme marqueur principal de stress.

[8] Un aliment fonctionnel est un aliment conventionnel, ou qui en a l'apparence, ayant pour caractéristique de procurer des effets physiologiques bénéfiques dépassant ses fonctions nutritionnelles habituelles ou de réduire le risque de maladies chroniques.

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A. LE STRESS

1. Définition du stress

Le mot stress est aujourd'hui largement répandu et utilisé. Malgré l'universalité de ce terme, la notion de stress reste subjective et il est difficile de décrire précisément ce qu'il est et d'en donner une définition précise. Le stress est donc une notion complexe et bien qu'elle ait vu le jour il y a plus de 100 ans, aucune définition n'est encore unanimement reconnue (des détails sur l'histoire du concept de stress sont donnés en Annexe 1).

1.1. L'histoire du concept de stress

Hans Selye (1907-1982), endocrinologiste canadien d'origine austro-hongroise, est considéré comme le père du concept de stress. Il introduit et popularise le stress en tant qu'idée scientifique et médicale dans les années trente (Selye, 1976). Pour Selye, le stress est un ensemble de réponses physiologiques non spécifiques à des agents nocifs divers, destinées à mobiliser les défenses de l'organisme pour maintenir ou rétablir un équilibre menacé. Il décrit plus précisément cette réponse et la nomme « syndrome d'adaptation généralisée » (SGA). Le SGA est une succession de 3 phases (la phase d'alarme, la phase de résistance et la phase d'épuisement) caractérisée par des changements mesurables au niveau de certains organes et par des manifestations physiologiques quantifiables (Figure 3).

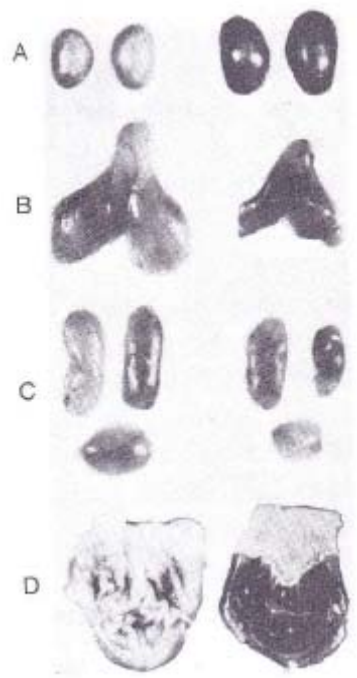


Figure 3.Triade typique de la phase de réaction du syndrome général d'adaptation de Selye.

Les organes à gauche sont ceux de rats normaux et les organes à droite sont ceux de rats exposés à un stress chronique d'immobilisation. On note un élargissement et une coloration foncée des glandes surrénales (A), un rétrécissement important du thymus (B) et des ganglions lymphatiques (C) ainsi que l'apparition d'ulcères au niveau de l'estomac (D). *(D'après Selye 1976)*

Bien que la définition énoncée par Selye soit toujours aujourd'hui largement répandue, elle semble incomplète car elle ne corrobore pas toutes les données expérimentales (Pacak & Palkovits, 2001). De nouvelles définitions du concept de stress ont donc été élaborées au fil des années et dans l'évolution de ce concept, l'aspect psychologique, les émotions mais également des facteurs environnementaux et génétiques ont été de plus en plus pris en compte. Le concept de stress est devenu largement multidimensionnel, ce qui complique l'élaboration d'une définition claire. Actuellement, beaucoup d'opinions sur ce qu'est le stress et comment le définir et le mesurer existent mais aucune définition n'est unanimement acceptée, le tableau 2 résume quelques une des définitions énoncées jusqu'alors. Aujourd'hui, le stress peut être toutefois résumé comme une réponse adaptative ou compensatoire à une situation perturbée où l'homéostasie est menacée. La réponse adaptative vise à maintenir un équilibre et est influencée par des facteurs psychologiques, génétiques et innés, l'expérience mais aussi l'environnement et le style de vie. Même s'il est clair que la réponse de stress implique l'activation de système commun à tous les agents stressants, elle ne semble pas exclusivement non spécifique comme l'avait énoncé Selye et chaque stresseur induit également une réponse spécifique (Chrousos & Gold, 1992).

Tableau 2. Evolution du concept de stress.

Auteurs	Date	Définitions du stress
Bernard	1878	Introduit de la notion de milieu intérieur
Cannon	1932	Introduit de la notion d'homéostasie Définit le comportement de « fight or flight » suite à un événement perturbant
Selye	1936	Introduit le concept de stress et le syndrome général d'adaptation Définit le stress comme la réponse non spécifique de l'organisme à toute demande qui lui est faite
Mason	1971	Critique la notion de non spécificité du stress de Selye Considère l'anxiété et la peur comme les déterminants de la réponse non spécifique engendrée par un stresseur
Weiner	1991	Définit le stress comme une pression sélective provenant de l'environnement physique et social qui menace l'organisme et provoque une réponse compensatoire adaptative (s'appuie sur les théories de Darwin)
Levine et Ursin	1991	Définissent le stress comme composé de trois éléments principaux : le stimulus, l'évaluation par le système d'intégration de ce stimulus et la réponse correspondante de l'organisme Définissent le stress comme partie intégrante d'un système biologique adaptatif
Chrousos et Gold	1992	Définissent le stress comme un état d'homéostasie menacée engendrant une réponse adaptative spécifique et non spécifique Caractérisent les réponses comme spécifiques ou non spécifiques suivant l'intensité de l'agent stressant Intègrent l'importance du polymorphisme génétique, des altérations de l'expression de gènes et des facteurs environnementaux dans la réponse individuelle au stress
Golstein	1995	Définit le stress comme une condition où il existe une inadéquation entre les attentes (programmées génétiquement, établies par un apprentissage préalable ou déduites des circonstances) et les perceptions (observées ou ressenties) engendrant une réponse compensatoire
McEwen	1998	Introduit le terme d'allostasie (processus de maintien de la stabilité interne du milieu grâce à des changements physiologiques et comportementaux) et de coût allostatique à la réponse adaptative de l'organisme à l'exposition à un stresseur Intègre les aspects d'anticipation d'un nouvel événement stressant et de style de vie à sa définition du stress

(Adapté d'après Pacak et Palkovits, 2001)

1.2. Les notions à ne pas confondre avec le stress

Pour bien définir le concept de stress, il est important de caractériser ce que le stress n'est pas. Le stress n'est pas le stimulus déclenchant la réponse adaptative de l'organisme c'est-à-dire le stresseur, et le stress est différent des conséquences qu'il peut entraîner comme la maladie, l'anxiété ou la dépression.

1.2.1. Les stresseurs

Un stresseur est défini comme un stimulus engendrant une réponse adaptative, le stress. Dans toutes les définitions existantes du concept, le stress est à distinguer du stresseur mais le langage courant emploie généralement les 2 mots comme synonyme. Ainsi, on parle de stress de froid, de stress de contention, de stress infectieux pour se référer au froid, à la contention ou à l'infection induisant un stress. Bien que ces expressions soient acceptées et largement employées, il faut garder à l'esprit la distinction entre les notions de stress et stresseur.

Les stresseurs sont divisés en 2 catégories, physiques et psychologiques (Sawchenko *et al.*, 2000; Dayas *et al.*, 2001; Herman *et al.*, 2003). Les stresseurs physiques également appelés stresseurs systémiques représentent une perturbation réelle et effective de l'homéostasie comme par exemple l'hypoxie, l'exercice intense, l'hémorragie ou le froid. Les stresseurs psychologiques ou émotionnels reflètent une menace prédite issue de prédispositions conditionnées basées sur la mémoire et les expériences passées ou par des prédispositions innées spécifiques à chaque espèce. Les réponses sont générées au niveau central en l'absence de perturbations physiologiques réelles et représentent une anticipation à la perturbation potentielle de l'homéostasie. Ces stresseurs sont divers et spécifiques de chaque individu.

1.2.2. L'anxiété et la peur

L'anxiété et la peur sont des émotions normales. L'anxiété est cliniquement définie comme un sentiment pénible d'attente, une peur sans objet, la crainte d'un danger imprécis. Ces caractéristiques distinguent l'anxiété de la peur, émotion analogue mais qui est liée à un danger objectif et réel (Viveros *et al.*, 2005).

L'anxiété et la peur sont des composantes adaptatives cruciales du stress et suite à l'exposition à un stresseur, elles sont considérées comme des émotions positives car protectives (Millan, 2003). L'anxiété transitoire provoquée par un stresseur provoque une réponse appropriée généralement la fuite ou l'évitement et est d'une importance fondamentale dans les stratégies de survie. Néanmoins, si l'anxiété induite est disproportionnée ou prolongée par rapport au stresseur alors ce comportement devient mal adapté et pathologique correspondant à des troubles anxieux.

1.2.3. La dépression

La dépression est un trouble psychique connue depuis l'antiquité. Elle se présente comme une caractéristique de la nature humaine, depuis la tristesse passagère jusqu'à la dépression profonde (Kleftaras, 2004). Il existe de nombreux types de dépression. La dépression se définit

par ses manifestations psychologiques, comportementales, cognitives et biologiques. Ainsi, les symptômes dépressifs incluent des perturbations psychologiques comme une tristesse latente, des sentiments de désespoir, d'impuissance, d'inutilité et une incapacité à éprouver du plaisir, des difficultés cognitives comme des problèmes de concentration, des changements comportementaux tels des modifications du comportement alimentaire (perte de goût, d'appétit) et sexuel (absence de libido), des ralentissements de l'activité psychomotrice, et des manifestations physiques regroupant par exemple des perturbations du sommeil et une perte de poids (Klerman & Weissman, 1988).

Il a clairement été mis en évidence un lien entre le stress et la dépression (Hammen, 2005). La dépression peut être une des conséquences de l'exposition répétée à des agents stressants (Chrousos & Gold, 1992) et les symptômes de la dépression sont souvent identiques aux manifestations du stress chronique.

Comme souvent en biologie ou en médecine, un phénomène se décrit plus facilement par ses effets. Ainsi, bien que le concept de stress ait évolué et que plusieurs définitions soient aujourd'hui énoncées mais qu'aucune ne soit unanimement acceptée, les effets du stress à court et long terme sont bien définis et les recherches sur le stress n'ont à ce jour fait qu'étoffer les découvertes de Selye.

2. Le rôle du stress, ses effets aigus et chroniques

Chez l'homme comme chez l'animal, si le stress a un rôle bénéfique à court terme, appliqué à long terme ses conséquences sont souvent néfastes.

2.1. Effets du stress à court terme : une réponse adaptative bénéfique

L'activation aiguë des systèmes de stress mène à un ensemble de changements comportementaux et physiques défini comme le syndrome de stress (Tableau 3) (Chrousos & Gold, 1992). Ces changements sont adaptatifs et normalement limités dans le temps car ils ont pour but d'optimiser les chances de survie d'un individu en mobilisant ses forces physiques et mentales. Ils sont modulés par les médiateurs du stress que sont des neuropeptides et hormones régulateurs de l'homéostasie sécrétés par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (que l'on appellera axe corticotrope) et le système nerveux sympathique associé aux glandes médullosurrénales : la corticolibérine (CRF), l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), les glucocorticoïdes et les catécholamines.

Tableau 3. Syndrome de stress : adaptations comportementales et physiques.

Adaptations comportementales
Redirection adaptative du comportement par facilitation ou inhibition centrale de voies nerveuses
Augmentation de l'éveil et de l'état d'alerte
Augmentation des capacités de cognition, de la vigilance, de l'attention
Suppression du comportement alimentaire
Suppression de la libido
Limitation de la réponse comportementale de stress dans le temps
Adaptations physiques
Redirection adaptative de l'énergie
Redirection de l'oxygène et des nutriments vers le système nerveux central, le cœur et les muscles
Modification du tonus cardiovasculaire, augmentation de la pression artérielle et du rythme cardiaque
Augmentation du rythme respiratoire
Augmentation de la glycogénolyse, de la gluconéogenèse et de la lipolyse
Inhibition de la croissance et du système reproductif
Inhibition de la digestion et stimulation de la mobilité du colon
Inhibition de la réponse immunitaire et inflammatoire
Détoxification des cellules des métabolites engendrés lors de la réponse de stress
Limitation de la réponse de stress dans le temps

(Adapté d'après Chrousos et Gold, 1992)

Les principales adaptations comportementales incluent un état d'éveil, d'alerte, de vigilance et des capacités cognitives accrues combinés à une attention focalisée, une analgésie augmentée et une inhibition de comportements liés aux fonctions végétatives concurrentes comme l'alimentation et la reproduction. Ces adaptations sont permises par une facilitation ou une inhibition au niveau central de voies nerveuses modulant ces fonctions.

En parallèle, des adaptations physiques permettent de promouvoir en périphérie une redirection adaptative de l'énergie. L'oxygène et les nutriments sont sélectivement dirigés vers le système nerveux central et les sites de l'organisme impliqués dans la réponse de stress comme le cœur ou les muscles, où le besoin est transitoirement augmenté. Cette redirection de l'énergie se fait grâce à la modification du tonus cardiovasculaire menant à l'augmentation du rythme cardiaque et de la pression artérielle, ainsi qu'à l'augmentation du rythme respiratoire. L'augmentation du métabolisme intermédiaire (glycolyse, néoglucogenèse, lipolyse) permet de promouvoir la disponibilité des substrats vitaux. En corollaire, les fonctions consommant de l'énergie comme la digestion, la croissance, l'immunité sont temporairement supprimées permettant une utilisation optimale de l'énergie.

Le succès de ces adaptations tient non seulement à la rapidité de mise en place de celles-ci mais également à la capacité de l'organisme à contenir la réponse de stress en quantité et dans le

temps. Ainsi, tous les éléments de la réponse de stress sont contre-régulés et les fonctions de détoxification au niveau cellulaire sont activées pour éliminer de l'organisme les métabolites produits durant la réponse adaptative.

Bien que les réponses adaptatives face aux agents stressants soient bénéfiques à court terme, elles peuvent engendrer des manifestations désagréables (Chrousos, 2009). En effet, il est fréquent que ces réponses entraînent des manifestations allergiques, des migraines, des épisodes d'hypertension, des douleurs abdominales, des indigestions, des diarrhées ou des constipations. Malgré ces manifestations possiblement gênantes, la réponse de l'organisme à un stresseur est positive à court terme car elle maximise la survie de l'organisme. Toutefois, la capacité à limiter quantitativement et dans le temps ces réponses adaptatives est également cruciale pour la survie de l'individu. Si les processus de régulation de la réponse de stress échouent ou si l'exposition aux agents stressants est répétée trop fréquemment les changements adaptatifs peuvent devenir chroniquement excessifs et les effets cataboliques, anti-reproductifs, anti-croissance et immunosuppresseurs contribuent au développement d'effets néfastes et de pathologies.

2.2. Effets de l'hyperactivation des systèmes de stress : les maladies de l'adaptation

C'est par ces changements pathologiques appelés maladies de l'adaptation que Selye a commencé à étudier le stress (Selye, 1998). L'hyperactivation des systèmes de stress est impliquée dans un grand nombre de problèmes de santé chez l'homme. Comme Chrousos et Gold (Chrousos & Gold, 1992) l'expliquent, le stress a une composante non spécifique et les réponses mal adaptées donc inappropriées peuvent être considérées comme des stresseurs alimentant alors un cercle vicieux. Il est alors difficile de distinguer la cause et l'effet d'une hyperactivation des systèmes de stress. Ainsi, on retrouve une hyperactivité des systèmes de stress dans des situations aussi diverses que le stress chronique, la dépression, l'anorexie nerveuse, les troubles obsessionnels compulsifs, les troubles paniques, l'alcoolisme, l'addiction aux narcotiques, le diabète de type 2, le syndrome métabolique ou l'obésité viscérale (Chrousos, 2009) sans pouvoir dissocier les causes du stress de leurs conséquences.

Les conséquences d'une hyperactivation des systèmes de stress sont physiques et comportementales et ont des manifestations physiologiques, comportementales et neuropsychiatriques. Il existe un grand nombre de pathologies et manifestations liées à cette hyperactivation. Elles sont fonction de facteurs exogènes et endogènes comme des facteurs génétiques ou environnementaux, l'état de santé des individus, leur période de développement,

leur mode de vie, leur alimentation, etc. (Chrousos, 2009). Par exemple les périodes comme le développement prénatal, la petite enfance, l'enfance ou l'adolescence, sont des périodes de forte vulnérabilité au stress. L'exposition à des agents stressants pendant ces périodes peut conduire à une hypersensibilité aux stresseurs durant l'âge adulte permettant une survenue plus rapide et sévère des pathologies corrélées (Charmandari *et al.*, 2003). De même suivant des facteurs génétiques et environnementaux, l'hyperactivation des systèmes de stress peut conduire à l'anorexie ou à l'obésité (Chrousos & Gold, 1992; Dallman, 2009).

Parmi les manifestations de l'hyperactivation des systèmes de stress, on retrouve classiquement les troubles anxieux, la dépression, des dysfonctionnements cognitifs et des troubles du sommeil. Des problèmes cardiovasculaires peuvent apparaître comme par exemple l'hypertension ou l'athérosclérose. Les troubles métaboliques sont également très fréquents incluant l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète de type 2. Il existe un grand nombre d'autres manifestations et pathologies liées notamment au pouvoir immunosuppresseur du stress (Tsigos & Chrousos, 1994; Tsigos & Chrousos, 2002).

En résumé, le stress maximise la survie de l'organisme en permettant l'accomplissement d'un répertoire complexe de réponses adaptatives grâce à des médiateurs centraux et périphériques. Ces réponses sont régulées par l'activation de l'axe corticotrope mais aussi du système nerveux sympathique.

3. Les mécanismes du stress

3.1. Principaux acteurs du stress

L'axe corticotrope et le système nerveux sympathique sont des systèmes neuroendocriniens de régulation de l'homéostasie. Lors du stress, ces axes sont mobilisés pour permettre la réponse de stress. Le contrôle central du stress est situé dans l'hypothalamus et le tronc cérébral. Les principaux acteurs de ce contrôle central sont les neurones sécrétant du CRF et de la vasopressine (AVP) localisés dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) et le locus coeruleus (LC) associé à d'autres groupes de neurones à noradrénaline du tronc cérébral formant le système LC/NA du système nerveux sympathique (Chrousos & Gold, 1992; Tsigos & Chrousos, 2002). L'axe corticotrope et les efférences du système sympathique vers la médullosurrénale représentent les 2 principales branches effectrices périphériques permettant le contrôle par le cerveau des différents organes durant l'exposition au stresseur (Tsigos & Chrousos, 2002). Le cerveau active également une partie des efférences vagales

parasympathiques qui modulent les réponses au stress du tractus gastro-intestinal (Habib *et al.*, 2001; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Ainsi l'axe corticotrope et le système LC/NA associé aux efférences sympathiques du système nerveux autonome vers la médullosurrénale (que l'on appellera par la suite axe sympathique) constituent les 2 principaux systèmes effecteurs de la réponse de stress, des sites d'interaction existent entre les différents composants de ces 2 systèmes (Figures 4 et 15).

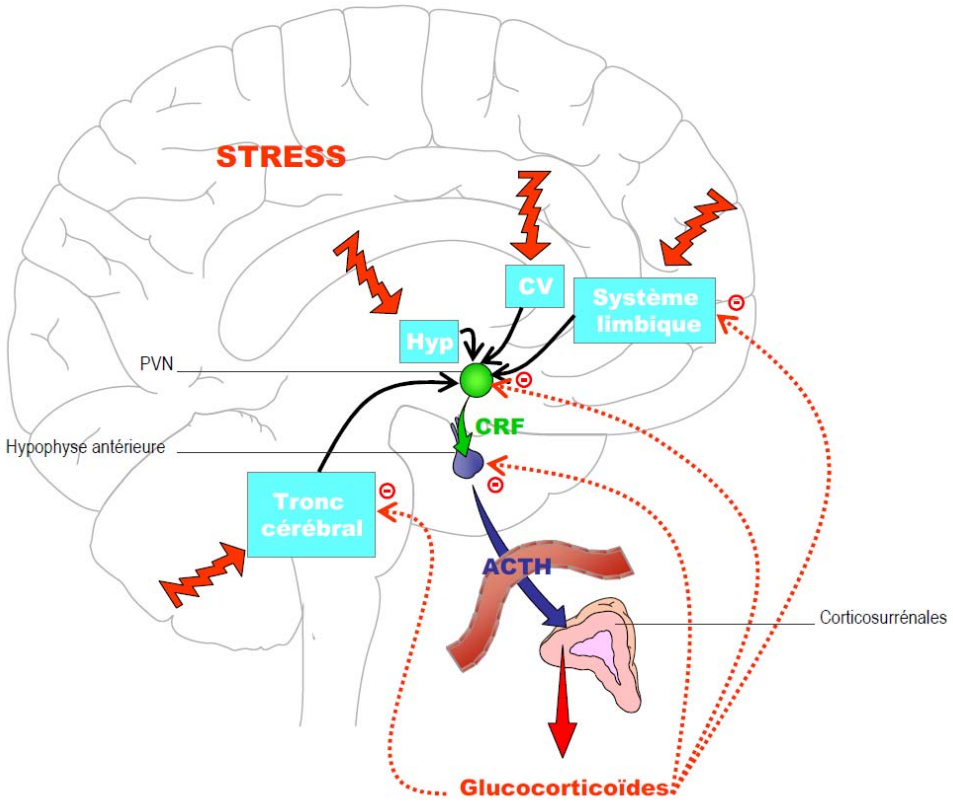


Figure 4. Activation de l'axe corticotrope suite au stress.

Le stimulus stressant est intégré par le système limbique, les organes circumventriculaires (CV), des noyaux hypothalamiques (Hyp) et/ou des noyaux du tronc cérébral stimulant ensuite le PVN de l'hypothalamus. Le CRF est alors libéré au niveau de l'éminence médiane par des terminaisons nerveuses provenant de la zone parvocellulaire du PVN. Il agit sur les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure pour stimuler la libération d'ACTH dans la circulation générale. L'ACTH stimule ensuite la corticosurrénale permettant la libération de glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes sont les effecteurs finaux de l'axe corticotrope et exercent un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse permettant d'inhiber la libération de CRF et d'ACTH, mais également au niveau du tronc cérébral et du système limbique permettant de limiter la réponse de stress (traits pointillés rouges).

3.2. Axe corticotrope

3.2.1. Activation de l'axe corticotrope

Le CRF est le premier régulateur hypothalamique de l'axe corticotrope. Il est libéré au niveau de l'éminence médiane dans le système porte hypophysaire par des terminaisons nerveuses

provenant de la zone parvocellulaire du PVN[9] de l'hypothalamus suite à une stimulation du PVN par d'autres structures. Il agit sur les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure pour stimuler la libération d'ACTH dans la circulation générale. Suite à sa libération par l'hypophyse, l'ACTH stimule la corticosurrénale permettant la libération de glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes sont les effecteurs finaux de l'axe corticotrope et jouent un rôle majeur dans la réponse adaptative du stress (Sapolsky *et al.*, 2000). Ils sont également d'une importance fondamentale dans l'arrêt de la réponse de stress car ils exercent un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse permettant d'inhiber la libération de CRF et d'ACTH (Figure 4).

L'activité de l'axe corticotrope est importante aussi bien en conditions non stressantes qu'en conditions stressantes. Ainsi, en conditions non stressantes, le CRF et l'AVP sont sécrétés de manière pulsatile et synchronisée dans le système porte hypophysaire suivant un rythme circadien (Charmandari *et al.*, 2005). Ce rythme est contrôlé par les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus antérieur qui représentent le siège de la régulation des rythmes de nombreux comportements et processus physiologiques (Saper *et al.*, 2005). L'augmentation de l'amplitude et de la fréquence des sécrétions pulsatiles durant les premières heures de la phase d'activité (le matin pour les espèces diurnes comme l'homme, le début de la nuit pour les espèces nocturnes comme le rat) entraîne une augmentation de la sécrétion d'ACTH et de glucocorticoïdes (Gudmundsson & Carnes, 1997; Lightman *et al.*, 2008). Ainsi, les glucocorticoïdes sont sécrétés suivant un rythme précis au cours de la journée. Ce rythme permet de coordonner les événements circadiens comme les phases de sommeil et d'éveil ou la prise alimentaire et est impliqué dans les processus sous-jacents au maintien de l'attention et à l'intégration d'informations sensorielles (De Kloet *et al.*, 1998). L'exposition à un stresseur entraîne une modification du rythme circadien de sécrétion de CRF et d'AVP due à une forte augmentation de leurs sécrétions pulsatiles (Herman *et al.*, 2003; Charmandari *et al.*, 2005; Kyrou & Tsigos, 2009).

[9] Le noyau paraventriculaire est formé de deux types de neurones : des neurones de gros volume dits magnocellulaires et des neurones de petit volume dits parvocellulaires (Figure 5).

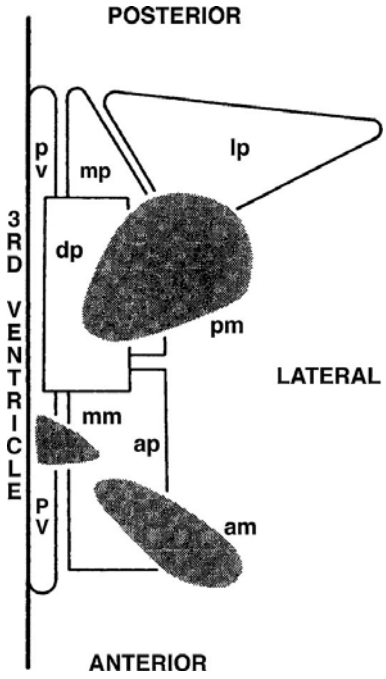


Figure 5. Diagramme schématique des relations entre les divisions magnocellulaires (zones ombrées) et parvocellulaires du PVN de l'hypothalamus.

La division magnocellulaire est composée de 3 zones : postérieure (pm), médiane (mm) et antérieure (am). Les neurones (sécrétant de l'AVP et de l'oxytocine) des ces zones projettent vers la neurohypophyse et sont impliqués dans la production d'hormones par l'hypophyse postérieure. La division parvocellulaire est composée de 5 zones : antérieure (ap), dorsale (dp), latérale (lp), médiane (mp) et périventriculaire (pv). Les neurones de ces zones projettent vers l'éminence médiane pour libérer des peptides dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (CRF et AVP) mais une autre population de neurones projettent vers différentes zones du système nerveux central notamment vers d'autres noyaux hypothalamiques et vers le tronc cérébral. (D'après Pyner et al., 2009)

3.2.2. Organisation fonctionnelle de l'activation de l'axe corticotrope

3.2.2.1. Stimulation du PVN de l'hypothalamus

Suivant le type de stresseur, physique ou psychologique, les voies de stimulation du PVN de l'hypothalamus diffèrent. En effet, les informations liées aux stresseurs physiques, correspondant à une perturbation réelle de l'homéostasie, sont intégrées par des voies somatiques, viscérales ou par les organes circumventriculaires[10] alors que les informations émotionnelles et liées à la mémoire des stresseurs psychologiques sont intégrées par les structures limbiques comprenant l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal (Herman *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 2005).

Le PVN de l'hypothalamus reçoit directement les terminaisons nerveuses d'un nombre restreint de structures nerveuses et ces structures reçoivent les informations des nocicepteurs somatiques, des afférences viscérales ou des voies hormonales sensorielles permettant de détecter rapidement une perturbation de l'homéostasie (Figure 6). Ces structures comprennent le noyau du faisceau solitaire (NTS) et le noyau parabrachial du tronc cérébral qui relayent les informations véhiculées par le système nerveux autonome, le système constitué de l'organe

[10] Les organes circumventriculaires sont des structures centrales permettant aux hormones polypeptidiques de l'hypothalamus de diffuser sans perturber la barrière hémato-encéphalique et permettant également aux substances ne pouvant pas franchir cette barrière d'induire des changements dans les fonctions centrales. Chez les mammifères, ils incluent l'éminence médiane, l'hypophyse postérieure, l'organe vasculaire de la lamina terminalis, l'organe subfornical et l'area postrema (Ganong WF (2000) Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**, 422-427.).

subfornical et l'organe vasculaire de la lamina terminalis qui régule l'équilibre électrolytique et hydrique et différents noyaux hypothalamiques comme le noyau dorsomédial, l'aire préoptique médiale, l'aire hypothalamique latérale, le noyau arqué (ARC) entre autres, qui relayent les signaux d'ordre autonome, métabolique, immunitaire ou d'excitation (Herman *et al.*, 2003). Suivant les neuromédiateurs mis en jeu (GABA pour acide γ-aminobutyrique, sérotonine, glutamate, catécholamines, etc.), ces structures ont un rôle inhibiteur ou stimulateur sur le PVN.

Le système limbique n'est pas directement connecté avec le PVN de l'hypothalamus et ses signaux de régulation sur l'axe corticotrope sont donc relayés par des structures directement connectées au PVN. Ces structures sont intra et extra-hypothalamiques, elles correspondent aux structures citées ci-dessus auxquelles viennent s'ajouter d'autres structures centrales comme par exemple le noyau du lit de la strie terminale (Figure 7). L'hippocampe et le cortex préfrontal sont inhibiteurs alors que l'amygdale est un activateur de l'axe corticotrope (Herman *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 2005).

Les voies d'activation du PVN sont donc très spécifiques de l'agent stressant (Sawchenko *et al.*, 2000; Dayas *et al.*, 2001).

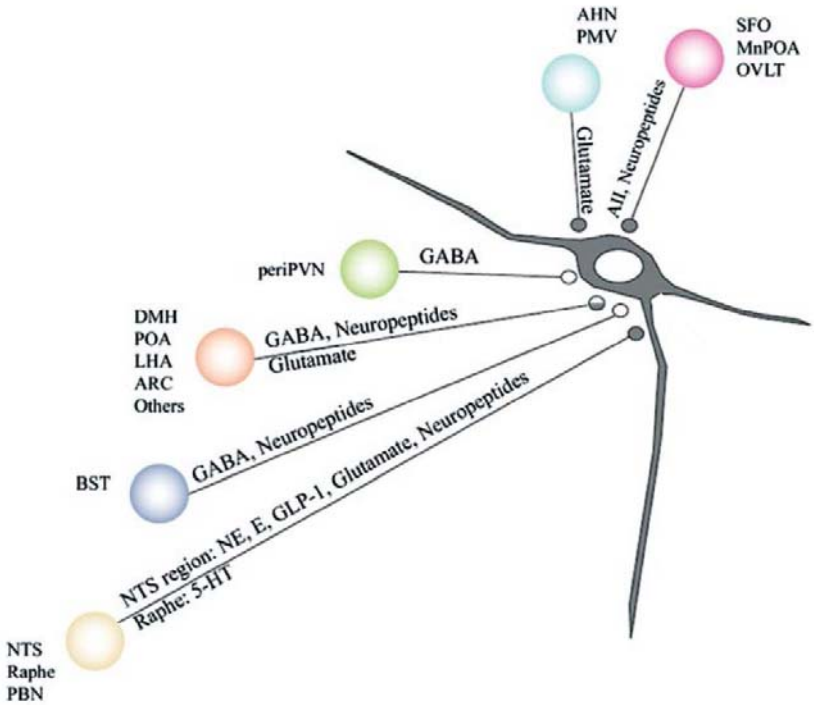


Figure 6. Intégration des stimuli stressants représentant une perturbation réelle de l'homéostasie : projections principales innervant les neurones du PVN de l'hypothalamus.

Les projections sont GABAergiques (cercles vides), glutamatergiques (cercles pleins gris) ou mixtes de neurotransmetteurs variés (cercles gris et blancs). BST : noyau du lit de la strie terminale ; SFO : organe subfornical ; mnPOA : noyau préoptique médian ; OVLT : organe vasculaire de la lamina terminalis ; PBN : noyau parabrachial du tronc cérébral ; DMH : noyau hypothalamique dorsomédian ; mPOA : aire préoptique médiane de l'hypothalamus ; LH : hypothalamus latéral ; AHN : noyau hypothalamique antérieur ; PMV : noyau prémamillaire ventral de l'hypothalamus. (D'après Herman 2003)

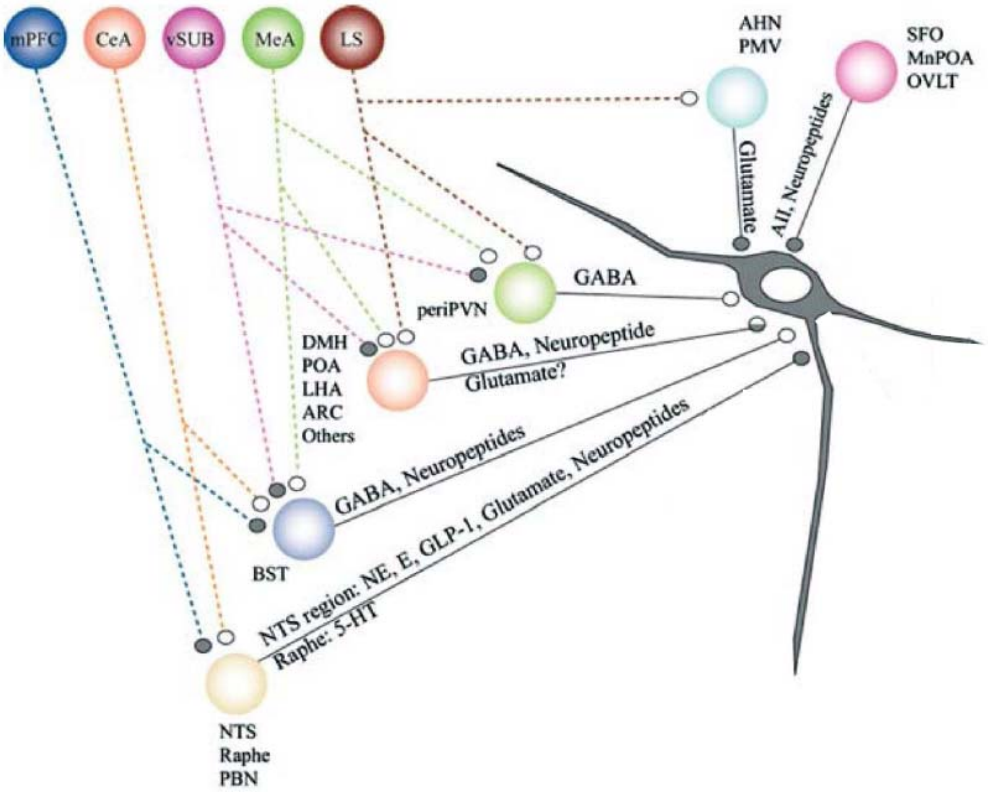


Figure 7. Projections du système limbique vers les voies de régulations de la réponse de stress.

Les projections sont soient GABAergiques (cercles vides) ou glutamatergiques (cercles pleins gris). mPFC : cortex préfrontal médian ; CeA : noyau central de l'amygdale ; vSUB : subiculum ventral ; MeA : noyau médian de l'amygdale ; LS : septum latéral. (D'après Herman 2003)

3.2.2.2. De l'hypothalamus à l'hypophyse

Lors de l'exposition à un stresseur, le CRF est libéré par les neurones de la zone parvocellulaire du PVN très rapidement (Figure 8). Le CRF est le principal effecteur de la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse antérieure. Le CRF est un neuropeptide de 41 acides aminés qui ne peut pas passer la barrière hémato-encéphalique (Chrousos, 2009). Au niveau du système nerveux central, il se retrouve dans de nombreux noyaux extra et intra-hypothalamiques. Le CRF provenant de la zone parvocellulaire du PVN a un rôle endocrine (Habib *et al.*, 2001). Environ 50 à 90 % des neurones du PVN de l'hypothalamus projetant dans l'éminence médiane contiennent du CRF et sont responsables de la libération de ce neurotransmetteur en réponse au stresseur (Miller & O'Callaghan, 2002). Beaucoup des neurones de la zone parvocellulaire du PVN produisant le CRF produisent également de l'AVP qui constitue un puissant facteur synergique du CRF mais seule, l'AVP ne stimule que très peu la libération d'ACTH (Abou-Samra *et al.*, 1987; Charmandari *et al.*, 2005). Il existe une intéraction positive entre le CRF et l'AVP au niveau de l'hypothalamus, chaque neuropeptide stimulant la sécrétion de l'autre (Chrousos, 1998).

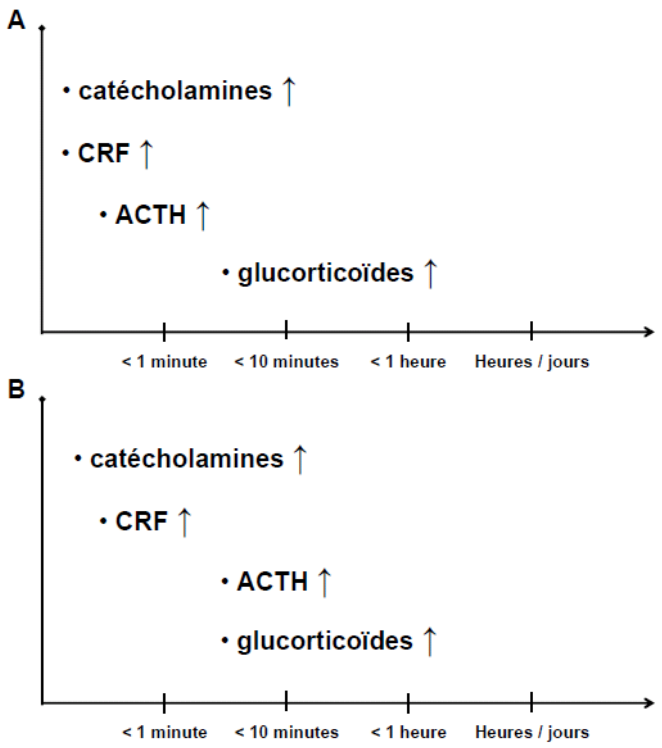


Figure 8. Représentation schématique et temporelle de la réponse endocrine du stress. *Évolution au cours du temps de la sécrétion des différentes hormones en réponse à l'exposition à un stresseur (A) et temps de latence jusqu'à l'atteinte du tissu cible et l'effet de l'hormone (B). (Adaptée d'après Sapolsky et al., 2000)*

Le CRF stimule la sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes (3 à 10 % de la quantité totales de cellules) de l'hypophyse antérieure via des récepteurs spécifiques au CRF de type I (CRF1). Les récepteurs au CRF sont des récepteurs membranaires de 2 types, CRF1 et CRF2, issus de gènes distincts et couplés aux protéines G[11] (Bale & Vale, 2004). L'AVP potentialise l'effet du CRF par l'intermédiaire de récepteurs à vasopressine V1b (Tanoue *et al.*, 2004).

La stimulation des cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure par le CRF entraîne la transcription de la proopiomélanocortine (POMC) (Lightman, 2008). La POMC est un polypeptide qui peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles permettant la libération de fragments biologiquement actifs incluant les mélanocortines, la lipotropine-β (β-LPH) et la β-endorphine (Figure 9). L'ACTH, l'α-, β- et γ- mélanotropine (MSH) constituent la famille des mélanocortines. Le clivage de la POMC est spécifique au tissu considéré du fait de la présence ou non d'enzyme spécifique (Coll & Loraine Tung, 2009). Dans les cellules corticotropes, l'enzyme proconvertase 1 (PC-1) permet le clivage de la POMC en ACTH et β-LPH (Pritchard & White, 2007). En plus de stimuler la transcription de la POMC, le CRF agirait également sur les niveaux d'expression de PC-1 (Kageyama & Suda, 2009).

---

[11] Les récepteurs couplés aux protéines G constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires de mammifères puisqu'elle représente 3,4 % du génome. Ces récepteurs doivent leur nom à leur couplage, une fois activés, à des protéines hétérotrimériques liant le guanosine triphosphate (GTP), aussi appelées protéines G. Ces protéines transmettent le signal provenant du récepteur à différents effecteurs intracellulaires permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée (Gershengorn MC & Osman R (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology* **142**, 2-10.).

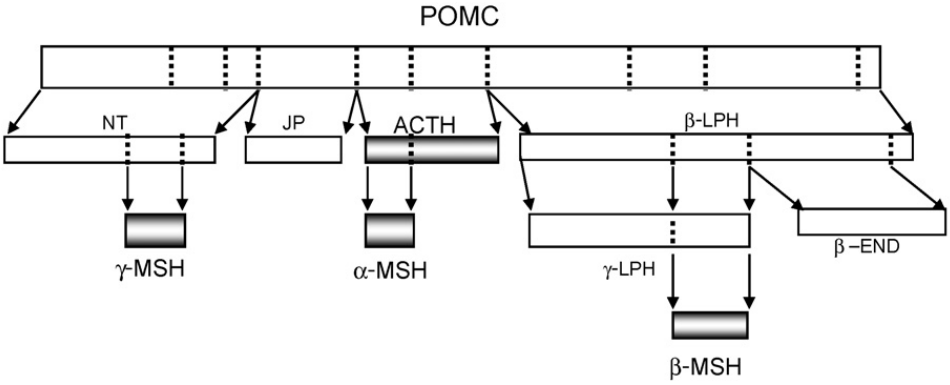


Figure 9. Représentation schématique de la maturation de la POMC.

NT : fragment N-terminal, JP : joining peptide. (D'après Coll et al., 2009)

Les neurones de la zone magnocellulaire du PVN et du noyau supraoptique de l'hypothalamus se projettent au niveau du lobe postérieur de l'hypophyse via l'éminence médiane (Figure 10). Ces neurones synthétisent de l'AVP et de l'oxytocine. Ces peptides peuvent être sécrétés dans l'hypophyse postérieure et entrer dans la circulation générale. L'AVP et l'oxytocine ainsi sécrétée peuvent atteindre l'hypophyse antérieure par voie systémique ou par le système porte reliant l'hypophyse antérieure et postérieure et peuvent agir en synergie avec le CRF afin de potentialiser la libération d'ACTH. La stimulation du PVN lors de la réponse de stress entraîne une libération d'oxytocine et d'AVP, cependant en fonction du type de stress, il se peut que seuls les neurones à oxytocine ne soient excités (Engelmann *et al.*, 2004).

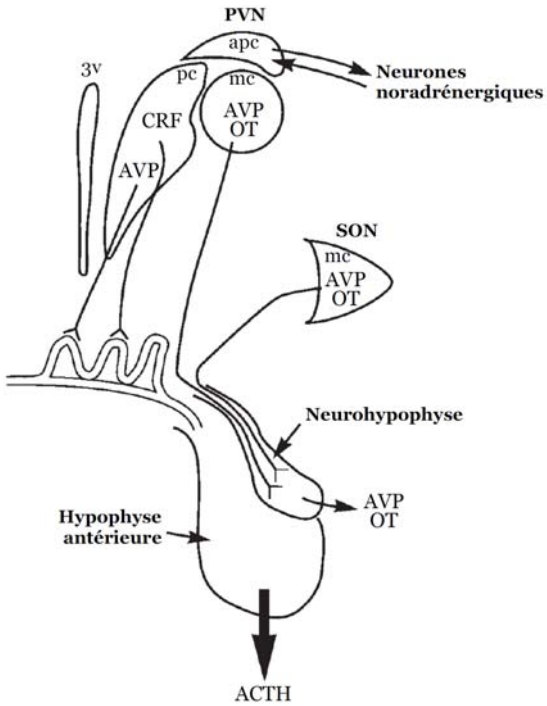


Figure 10. Représentation schématique des relations entre le PVN de l'hypothalamus et l'hypophyse.

SON : noyau supraoptique ; OT : oxytocine ; mc : division magnocellulaire ; pc/apc : division parvocellulaire ; 3v : 3ème ventriculaire. (Adaptée d'après Aguilera 1998)

3.2.2.3. De l'hypophyse à la corticosurrénale

Suite à la stimulation des cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure par le CRF, l'ACTH est libérée dans la circulation générale en moins de 1 minute (Sapolsky *et al.*, 2000)

(Figure 8). L'ACTH est un peptide de 39 acides aminés responsable de la sécrétion basale et de l'hypersécrétion liée au stress des glucocorticoïdes par les glandes corticosurrénales (Miller & O'Callaghan, 2002; Charmandari *et al.*, 2005; Kyrou & Tsigos, 2009).

Les glandes surrénales sont 2 glandes endocrines situées aux pôles supérieurs de chaque rein. Elles sont divisées en 2 structures fonctionnellement et embryologiquement distinctes : la médullosurrénale au centre et la corticosurrénale qui l'entoure (Rosol *et al.*, 2001) (Figure 11). La corticosurrénale est divisée en 3 zones concentriques : la zone glomérulée externe, la zone fasciculée intermédiaire et la zone réticulée interne (Rosol *et al.*, 2001). La zone glomérulée constitue 15 % de la masse de la glande surrénale, la zone fasciculée 50 % et la zone réticulée 7 % (Ganong, 2004). La corticosurrénale sécrète des corticostéroïdes : la zone fasciculée sécrète essentiellement les glucocorticoïdes, la zone réticulée les androgènes surrénaliens et la zone glomérulée les minéralocorticoïdes (principalement l'aldostérone) (Pocock & Richards, 2004).

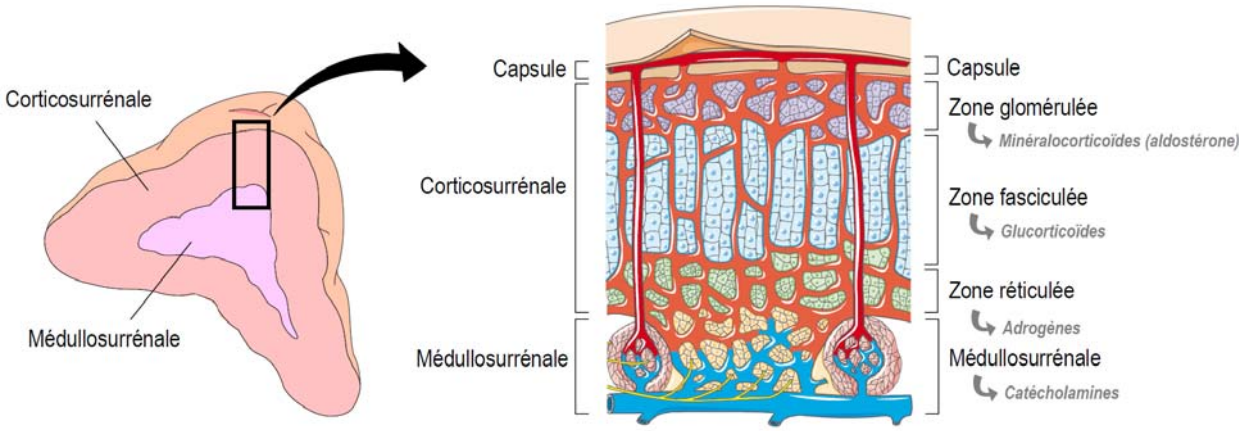


Figure 11. Coupe schématique d'une glande surrénale.

L'activité des mélanocortines est modulée par 5 récepteurs couplés aux protéines G (MCR1 à 5) et l'ACTH stimule la synthèse de glucocorticoïdes au niveau de la zone fasciculée de la corticosurrénale par l'intermédiaire du récepteur MCR2 (Abdel-Malek, 2001). La liaison de l'ACTH avec le MCR2 permet d'augmenter la disponibilité en cholestérol grâce à la conversion du cholestérol estérifié dans des gouttelettes lipidiques en cholestérol libre dans la cellule, précurseur des glucocorticoïdes (Rosol *et al.*, 2001). Le cholestérol libre est alors disponible pour permettre la chaîne de réactions de déshydrogénation et d'hydroxylation ayant lieu dans la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique lisse et mener à la transformation en glucocorticoïdes (Figure 12) (Ganong, 2004). Chez l'homme, le cortisol est le principal glucocorticoïde biologiquement actif alors que chez le rongeur, c'est la corticostérone. Les glucocorticoïdes sont les effecteurs finaux de l'axe corticotrope. Suite à l'exposition à un

stresseur, les glucocorticoïdes sont libérés dans la circulation sanguine en quelques minutes (Sapolsky *et al.*, 2000).

Bien que l'ACTH soit le principal modulateur de la libération de glucocorticoïdes, des efférences du système nerveux autonomes et des hormones ou cytokines venant de la médullosurrénale ou de la circulation générale peuvent également participer à la régulation de la sécrétion de glucocorticoïdes (Chrousos, 1998; Habib *et al.*, 2001; Ulrich-Lai & Engeland, 2002).

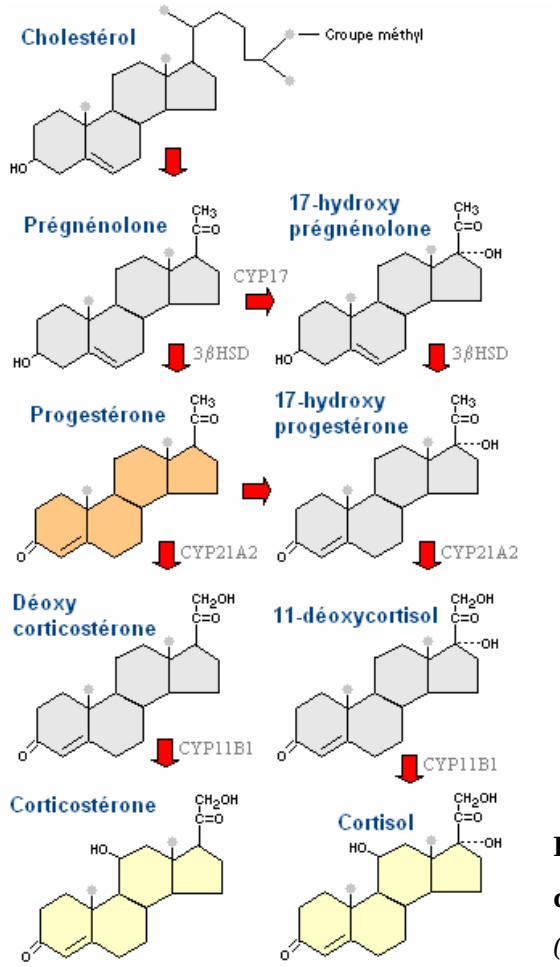


Figure 12. Voies principales de biosynthèse de la corticostérone et du cortisol.
(Adaptée d'après Ganong 2004)

3.2.3. Effets des différents acteurs de l'axe corticotrope

3.2.3.1. Le CRF

Le CRF et les récepteurs au CRF sont présents dans de nombreux sites centraux intra et extra-hypothalamiques. Les corps cellulaires de neurones sécrétant du CRF sont notamment présents dans le système limbique (noyau central de l'amygdale, hippocampe), le noyau du lit de la strie terminale, le cortex cérébral, le tronc cérébral permettant l'activation du système nerveux autonome et l'élaboration de réponses cognitives et comportementales (Habib *et al.*, 2001; Bale & Vale, 2004). Au sein du PVN, à côte des neurones projetant vers l'éminence médiane de

l'hypophyse et sécrétant du CRF en tant que neurohormone, un petit nombre de neurones CRF projette vers le tronc cérébral notamment et est impliqué dans la régulation du système nerveux autonome (Dunn & Swiergiel, 2008).

Le stress est un puissant activateur de la libération de CRF au niveau central (Owens & Nemeroff, 1991; Habib *et al.*, 2000) et il a été mis en évidence qu'en plus de son effet sécrétagogue de l'ACTH au niveau des cellules corticotropes de l'hypophyse, le CRF module de nombreuses réponses comportementales et physiologiques du stress (Owens & Nemeroff, 1991; Koob & Heinrichs, 1999; Heinrichs & Koob, 2004) et ses effets s'expriment très rapidement, en moins d'une minute (Sapolsky *et al.*, 2000).

Parmi les réponses comportementales modulées au niveau central (Koob & Heinrichs, 1999; Habib *et al.*, 2001; Heinrichs & Koob, 2004), le CRF participe à l'état d'éveil et de vigilance via des processus de stimulation de l'éveil et de modification des cycles de sommeil. De plus, le CRF est un neuropeptide anxiogène et inhibe le comportement sexuel et la prise alimentaire (ce dernier aspect est traité en détail dans la partie I.C.3.1.1 du document).

Concernant les effets physiologiques du CRF, il active le système nerveux sympathique et inhibe le système nerveux parasympathique participant alors aux réponses cardiovasculaires, digestives et métaboliques du stress (Tache *et al.*, 1990; Owens & Nemeroff, 1991; Tache & Bonaz, 2007; Stengel & Tache, 2009). Enfin, le CRF influence également le système reproducteur en inhibant les neurones à gonadolibérine (GnRH) de l'ARC et la croissance et le développement en stimulant la sécrétion de somatostatine, inhibitrice de l'hormone de croissance (Tsigos & Chrousos, 2002; Charmandari *et al.*, 2005).

3.2.3.2. Les glucocorticoïdes

<u>Mécanismes d'action des glucocorticoïdes</u>

Les glucocorticoïdes ont des effets pléiotropiques, ils agissent sur quasiment tous les organes et tissus, incluant le cerveau, grâce à des récepteurs nucléaires présents dans toutes les cellules (Munck *et al.*, 1984). Les récepteurs sont de 2 types, les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR).

Les GR sont largement exprimés en périphérie et dans le système nerveux central notamment dans l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus et le LC. La distribution des MR est plus restreinte, notamment au niveau central car les MR ne sont presqu'essentiellement exprimés dans l'hypothalamus, l'hippocampe et le septum latéral (Buckingham, 2006; Fietta & Fietta, 2007; de Kloet *et al.*, 2008). L'affinité des 2 récepteurs à leur ligand est différente : les MR ont une grande affinité avec les glucocorticoïdes alors que les GR présentent une affinité dix fois plus faible (De Kloet *et al.*, 1998). Ces différences de distribution et d'affinité confèrent aux MR

et aux GR des fonctions distinctes. Lorsque les concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes sont basses, c'est-à-dire en l'absence de stress, seuls les MR sont occupés alors qu'en cas de stress, l'augmentation de concentration plasmatique de glucocorticoïdes entraîne une saturation des MR et les GR sont occupés (De Kloet *et al.*, 1998).

Lors du stress, les glucocorticoïdes agissent via des mécanismes génomiques modulés par les MR et les GR mais également par des mécanismes plus rapides non génomiques (Makara & Haller, 2001; Buckingham, 2006; de Kloet *et al.*, 2008; Fietta *et al.*, 2009).

Les mécanismes génomiques des glucocorticoïdes s'expriment à partir de 15 min après le début de la réponse de stress et peuvent durer des heures voire des jours (Sapolsky *et al.*, 2000) (Figure 8). Ils sont majoritairement transcriptionnels mais peuvent également être post-transcriptionnels (Stellato, 2004; Barnes, 2006; van der Laan & Meijer, 2008). Les MR et les GR sont présents dans le cytoplasme sous forme inactive. Les glucocorticoïdes sont des composés lipophiles et diffusent facilement à travers les membranes cellulaires pour se lier à leurs récepteurs. Une fois le complexe glucocorticoïde-récepteur formé, ce dernier entre dans le noyau de la cellule où il agit sur l'expression du génome en activant ou inhibant la transcription (Munck *et al.*, 1990; Barnes, 2006). Pour activer la transcription de gènes, le complexe glucocorticoïde-récepteur se fixe sous forme de dimère à une séquence d'ADN spécifique appelée « élément de réponse aux glucocorticoïdes » (GRE). Des sites GRE négatifs existent également et permettent une inhibition de la transcription (Barnes, 2006; van der Laan & Meijer, 2008). Le complexe glucocorticoïde-récepteur peut également interagir avec d'autres facteurs de transcription comme le « nuclear factor-κB » ou l'« activating protein-1 » et réduire l'activité de ces derniers (van der Laan & Meijer, 2008). Au niveau post-transcriptionnel, les glucocorticoïdes agissent sur la stabilité des ARNm, leur traduction en protéines, leur dégradation et la libération des protéines par de multiples mécanismes (Bergmann *et al.*, 2004; Stellato, 2004; Barnes, 2006).

Les mécanismes non génomiques sont basés sur la liaison des glucocorticoïdes avec des protéines membranaires spécifiques (lipoprotéines des membranes synaptiques, récepteurs aux neurotransmetteurs ou récepteurs spécifiques aux glucocorticoïdes différents des récepteurs génomiques) et les actions rapides de modulations de voies cellulaires qui s'en suivent (Makara & Haller, 2001).

Effets des glucocorticoïdes

Un des effets des glucocorticoïdes consiste à exercer un rétrocontrôle négatif sur l'axe corticotrope (Figure 4). L'effet adaptatif bénéfique du stress repose sur ce rétrocontrôle. Il est

réalisé par des mécanismes rapides non génomiques et des mécanismes retardés, plus longs et génomiques.

Le rétrocontrôle négatif génomique est majoritairement modulé par les GR suite au stress alors qu'il est régulé par les MR en condition basale d'activité de l'axe corticotrope (De Kloet *et al.*, 1998). Les premiers sites de rétrocontrôle des glucocorticoïdes par des mécanismes génomiques sont l'hypophyse et l'hypothalamus. Des sites GRE négatifs ont été identifiés au niveau du promoteur de gènes de la POMC et du CRF (Barnes, 2006; van der Laan & Meijer, 2008). Suite à un stress, les glucocorticoïdes inhibent l'expression de POMC et des récepteurs au CRF et à l'AVP des cellules corticotropes de l'hypophyse et contrôlent ainsi la quantité d'ACTH libérée (Tasker *et al.*, 2006). Au niveau de l'hypothalamus, les glucocorticoïdes inhibent l'expression de CRF et d'AVP dans le PVN (Tasker *et al.*, 2006). Au niveau de l'hippocampe, l'abondance des GR et des MR ainsi que des observations mettant en évidence un délai de la terminaison de la libération de glucocorticoïdes suite au stress lorsque l'hippocampe est lésé suggèrent un rôle de cette structure limbique dans le rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope par les glucocorticoïdes (Herman *et al.*, 2003; Jacobson, 2005). De même, l'amygdale et le cortex préfrontal pourraient être impliqués dans le rétrocontrôle des glucocorticoïdes (Herman *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 2005; Jacobson, 2005).

Le rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope par les glucocorticoïdes est également régulé par des mécanismes rapides et non génomiques (Tasker *et al.*, 2006). Les effets rapides des glucocorticoïdes s'exercent pour moitié par une inhibition de la libération d'ACTH au niveau de l'hypophyse et pour une autre moitié par des mécanismes au niveau du cerveau. Au niveau du PVN, les glucocorticoïdes réduisent l'activité des neurones projetant vers l'éminence médiane, inhibent la libération d'AVP et facilitent les effets inhibiteurs des neurones GABAergiques projetant vers le PVN. De plus, au niveau de l'hippocampe, les glucocorticoïdes ont des effets non génomiques entraînant une excitation des neurones de l'hippocampe et une inhibition conséquente de l'axe corticotrope (Jacobson & Sapolsky, 1991; Jacobson, 2005).

Parmi les autres effets des glucocorticoïdes lors de l'exposition à un stresseur, nous allons citer les principaux effets au niveau périphérique et central. Ces effets ont été classés en 4 grandes catégories par Sapolsky *et al.* (Sapolsky *et al.*, 2000) : les effets permissifs qui permettent d'augmenter les réponses aux stresseurs engendrées par d'autres médiateurs, les effets suppresseurs qui inhibent certaines fonctions, les effets stimulateurs permettant la mise en place de réponses adaptatives et les effets préparatifs permettant de préparer l'organisme à une nouvelle exposition à un stresseur.

Au niveau périphérique, les effets des glucocorticoïdes sur le métabolisme intermédiaire sont permissifs et stimulateurs (Sapolsky *et al.*, 2000). En effet, suite au stress, les glucocorticoïdes ont tout d'abord un effet permissif en augmentant les effets rapides des catécholamines sur la stimulation de la néoglucogenèse, la glycogénolyse et la lipolyse. Toutefois, les glucocorticoïdes ont également un effet stimulateur car ils ont un effet direct sur la mobilisation de l'énergie. Ils stimulent la néoglucogenèse hépatique et mobilisent les acides aminés par inhibition de la synthèse protéique et stimulation de la protéolyse dans certains muscles. Ils mobilisent également les acides gras par lipolyse du tissu adipeux et inhibent le transport du glucose vers divers tissus périphériques. Ces effets stimulateurs permettent de faire perdurer la redirection de l'énergie nécessaire à la réponse adaptative du stress.

Les glucocorticoïdes ont un effet permissif sur l'activation cardiovasculaire et l'inhibition du système reproducteur engendrée par le CRF et les catécholamines suite au stress (Galosy *et al.*, 1981). Les glucocorticoïdes entraînent une diminution du nombre de récepteurs et de la sensibilité des ovaires à la luteinizing hormone (Sapolsky *et al.*, 2000).

Par contre, les glucocorticoïdes ont un effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire en réponse au stresseur majoritairement suppressif (Sapolsky *et al.*, 2000). Ils entraînent une altération de la circulation et de la fonction des leucocytes, une diminution de la production de cytokines et des médiateurs de l'inflammation et une inhibition des effets de ces derniers sur leurs tissus cibles (Chrousos, 1995).

Au niveau central, les glucocorticoïdes ont de nombreux effets sur le comportement et les performances cognitives (Fietta *et al.*, 2009). Les glucocorticoïdes peuvent agir au niveau central sur l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal influençant les capacités d'apprentissage et de mémorisation (de Kloet, 2000; Fietta *et al.*, 2009). D'un point de vue comportemental, les glucocorticoïdes stimulent l'appétit et la recherche de nourriture (cet effet est développé dans la partie I.C.3.2 du document). L'effet orexigène des glucocorticoïdes est considéré comme préparatif car il permet de stocker l'énergie perdue lors de la réponse de stress et donc de permettre de répondre à une nouvelle exposition au stress (Sapolsky *et al.*, 2000; Fietta *et al.*, 2009).

En parallèle de l'activation de l'axe corticotrope, l'axe constitué du système LC/NA, du système nerveux sympathique et des glandes médullosurrénales est également activé en situation de stress.

3.3. Axe sympathique

3.3.1. Activation du système LC/NA

Le locus coeruleus (LC), situé dans le pont du tronc cérébral, est le plus important noyau noradrénergique (A6) du système nerveux central. Avec les noyaux noradrénergiques A1 et A2 respectivement situés dans la formation réticulée ventrolatérale et le NTS du bulbe rachidien, le LC constitue le système LC/NA (Carrasco & Van de Kar, 2003; Itoi, 2008). Les neurones du système LC/NA possèdent des projections entre eux et vers le système limbique, l'hypothalamus, le tronc cérébral et la moelle épinière notamment (Itoi & Sugimoto, 2010). Il semble que ce système contribue à la majorité de la noradrénaline présente dans le cerveau car la noradrénaline plasmatique est hydrosoluble et ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique (Habib *et al.*, 2001).

Lors du stress, les informations d'ordre émotionnel ou physique sont intégrées par les structures appropriées (amygdale et hippocampe ou noyau parabrachial du tronc cérébral par exemple) et peuvent réguler directement le système LC/NA, engendrant une libération massive et très rapide de noradrénaline au niveau central. Le système LC/NA reçoit des fibres nerveuses de neurones CRF du PVN de l'hypothalamus et innerve réciproquement le PVN avec des fibres nerveuses noradrénergiques (Figure 13). L'activation du PVN par le stress entraîne alors une stimulation du système LC/NA grâce à la fixation du CRF sur des récepteurs de type 1. Cette stimulation est réciproque car la libération de noradrénaline active le PVN via des récepteurs α_1-noradrénergiques (Kiss & Aguilera, 2000; Charmandari *et al.*, 2005; Dunn & Swiergiel, 2008).

Comme pour les neurones CRF, les neurones noradrénergiques sont influencés par d'autres systèmes centraux. Les systèmes GABAergiques et opioïdes l'inhibent alors que les systèmes sérotoninergiques et cholinergiques le stimulent (Szafarczyk *et al.*, 1993; Kyrou & Tsigos, 2009).

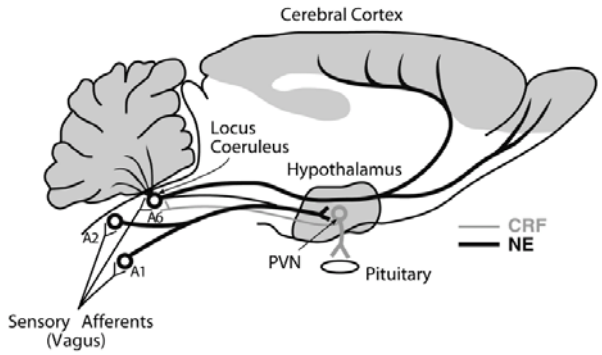


Figure 13. Interactions entre les neurones CRF du noyau PVN de l'hypothalamus et les noyaux noradrénergiques du système LC/NA du tronc cérébral (cerveau de rat).

NE : norépinéphrine = noradrénaline. (D'après Dunn et al., 2004)

3.3.2. Stimulation du système nerveux sympathique

Le système nerveux autonome est responsable de la régulation des fonctions automatiques assurant l'homéostasie inconsciente de l'organisme comme par exemple le fonctionnement des systèmes cardiovasculaire, respiratoire et digestif. Le système nerveux autonome possède 2 composantes desservant généralement les mêmes organes : le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique (Figure 14). Le système sympathique fonctionne sur un modèle à 2 neurones, un neurone préganglionnaire dont le corps cellulaire est localisé dans la moelle épinière, fait synapse avec un neurone post-ganglionnaire dont le corps cellulaire est localisé dans un ganglion qui lui-même innerve le tissu cible. Le neurotransmetteur des neurones pré-ganglionnaires est l'acétylcholine, tandis que celui des neurones post-ganglionnaires est en général la noradrénaline. Les neurones sympathiques innervent les muscles lisses du système vasculaire, le cœur, les muscles squelettiques, le rein, l'intestin, le tissu adipeux et beaucoup d'autres organes, tissus ou glandes dont notamment les glandes médullosurrénales (Ganong, 2004). Le système nerveux parasympathique a des effets opposés au sympathique permettant une régulation fine des organes, glandes et tissus innervés. Les fibres nerveuses du système parasympathique prennent leur origine dans les nerfs crâniens (nerf III, VII, IX et X) et de la moelle épinière. Comme le système sympathique, il fonctionne sur un modèle à 2 neurones. Le neurotransmetteur des fibres pré et post-ganglionnaires parasympathiques est l'acétylcholine (Ganong, 2004).

Le système LC/NA possède des projections vers la moelle épinière et contrôle la stimulation du système nerveux sympathique et parasympathique lors du stress. En particulier, le système LC/NA stimule les efférences splanchniques du système nerveux sympathique permettant la libération d'adrénaline et de noradrénaline par les glandes médullosurrénales (Figure 15) (Habib *et al.*, 2001; Carrasco & Van de Kar, 2003). La réponse de stress inclut donc une activation du système nerveux sympathique mais également une modulation coordonnée du système parasympathique. La réponse parasympathique est notamment régulée par le noyau moteur dorsal du nerf vague par l'intermédiaire de signaux provenant du NTS ou du PVN (Ulrich-Lai & Herman, 2009).

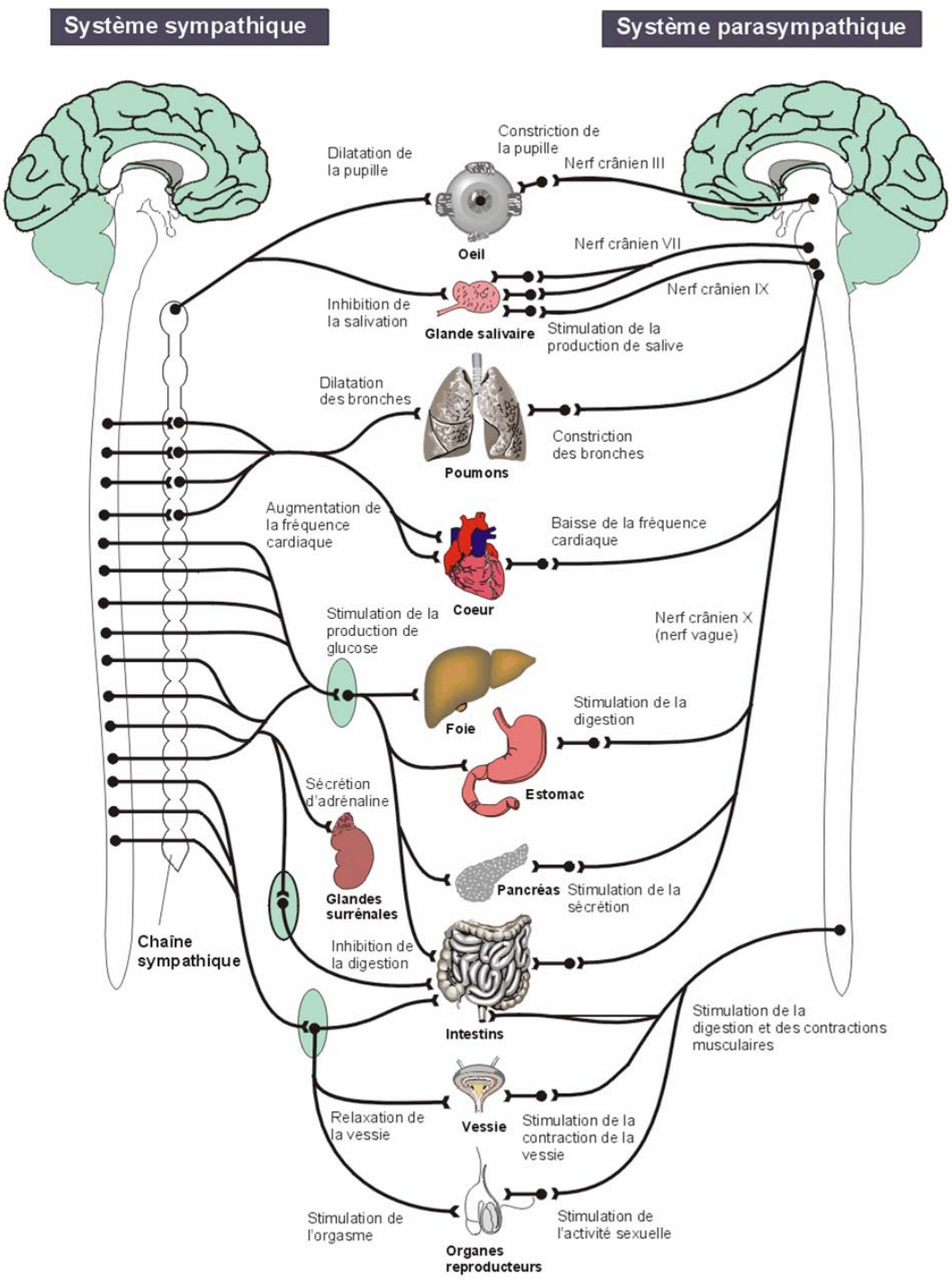


Figure 14. Organisation du système nerveux autonome sympathique et parasympathique.

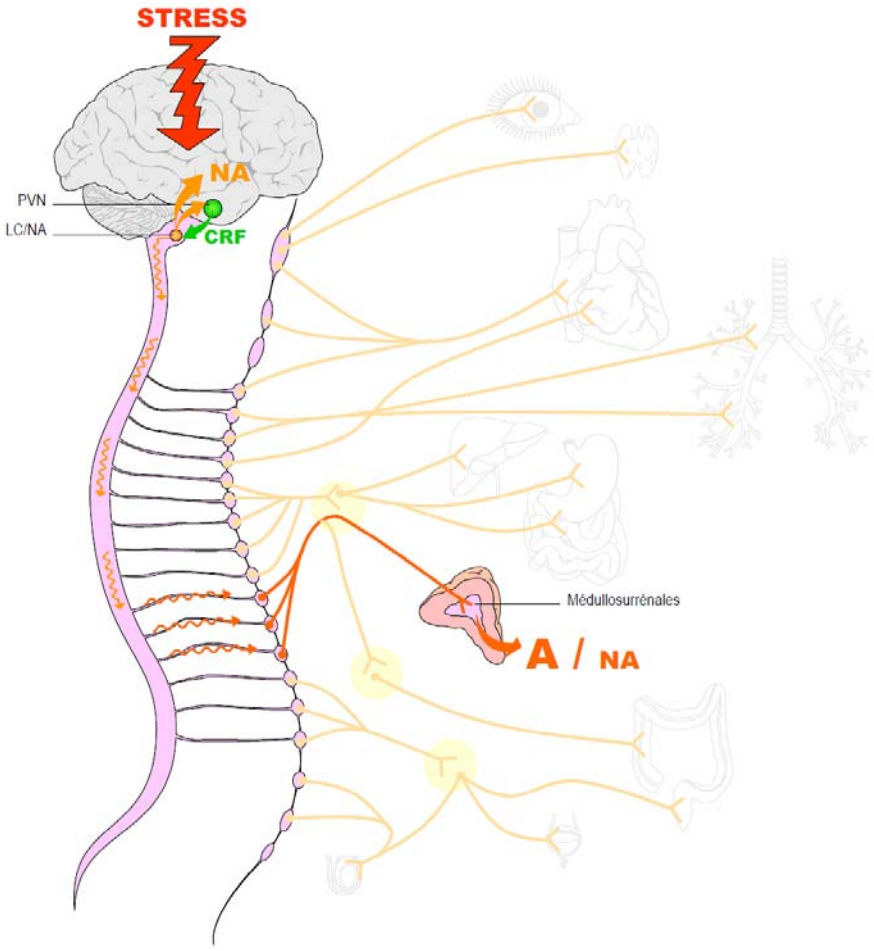


Figure 15. Activation de l'axe sympathique lors du stress.

Lors du stress, les informations d'ordre émotionnel ou physique sont intégrées par les structures appropriées. Ces structures peuvent réguler directement le système LC/NA au sein du tronc cérébral, engendrant une libération massive et très rapide de noradrénaline au niveau central. Une innervation réciproque existe entre les neurones CRF du PVN de l'hypothalamus et les neurones noradrénergiques du système LC/NA, permettant une activation du système LC/NA par le CRF suite à l'activation du PVN engendrée par les stimuli stressants. Le système LC/NA stimule ensuite le système nerveux sympathique engendrant une libération par les glandes médullosurrénales d'adrénaline et de noradrénaline dans la circulation générale. De plus l'activation du système sympathique induit une libération de noradrénaline dans la circulation générale et au niveau des organes qu'il innerve permettant la régulation de nombreuses fonctions. A : adrénaline ; NA : noradrénaline.

3.3.3. Libération de catécholamines par les médullosurrénales

La médullosurrénale (Figure 11) est principalement composée de cellules chromaffines. Chez l'homme, ces cellules contiennent à la fois des granules à adrénaline et à noradrénaline alors que chez les rongeurs, certaines cellules contiennent uniquement l'adrénaline et d'autres la noradrénaline (Rosol *et al.*, 2001). L'adrénaline est synthétisée à partir de la noradrénaline par N-méthylation, ce processus étant catalysé par l'enzyme phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT ; Figure 16). Les médullosurrénales contiennent également des cellules ganglionnaires sympathiques présynaptiques provenant des fibres nerveuses splanchniques sympathiques. La médullosurrénale peut être considérée comme un ganglion

hypertrophié et ses cellules comme des neurones sympathiques post-ganglionnaires spécialisés sécrétant dans le sang des catécholamines (adrénaline et noradrénaline ; Figure 17).

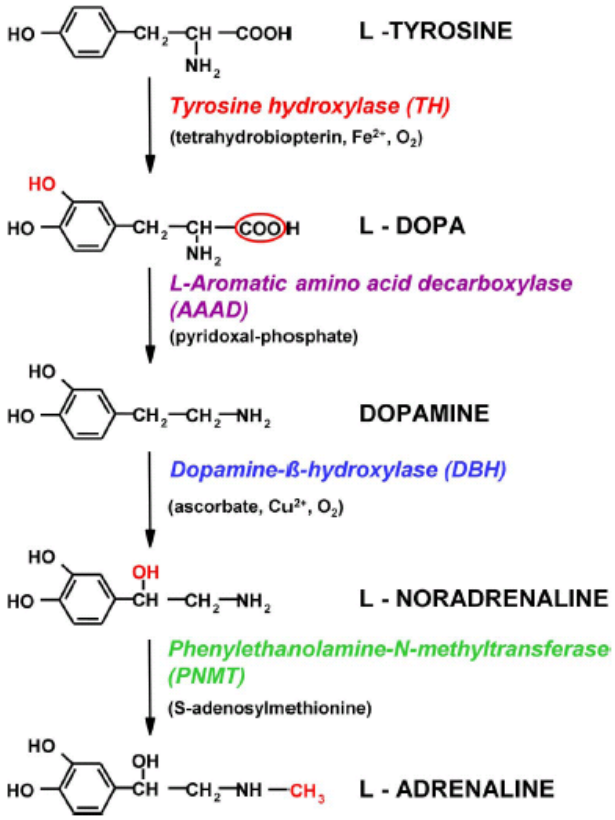


Figure 16. Synthèse des catécholamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline).

(D'après Kvetnansky et al., 2009)

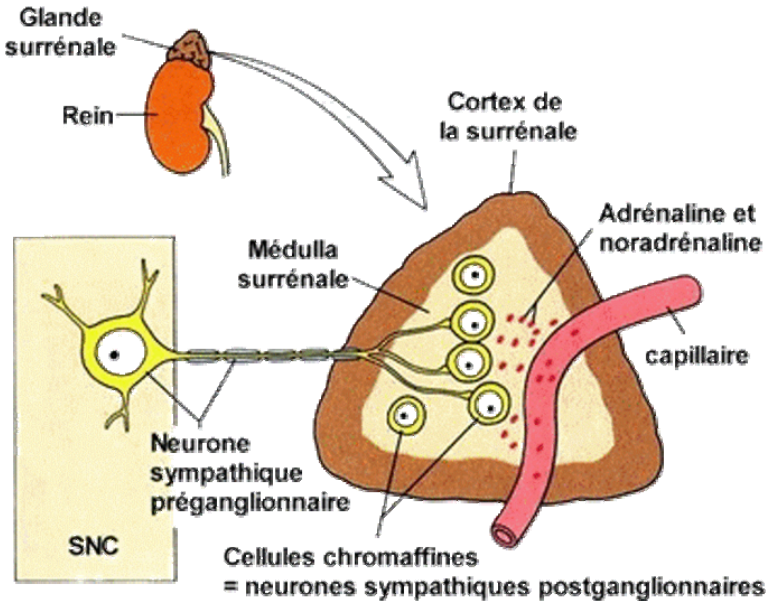


Figure 17. Libération de catécholamines par les cellules chromaffines de la médullosurrénale stimulées par le système nerveux sympathique.

SNC : système nerveux central.

La sécrétion de catécholamines en situation basale est faible mais en situation de stress, l'acétylcholine libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques préganglionnaires se lie à ses récepteurs sur la membrane des cellules chromaffines de la médullosurrénale engendrant une dépolarisation de la membrane qui induit l'exocytose des granules contenant l'adrénaline ou la noradrénaline (Kvetnansky *et al.*, 2009). L'adrénaline et la noradrénaline sont alors sécrétées dans la circulation générale. Comme ces mécanismes sont nerveux, la libération des catécholamines suite au stress est de l'ordre de la dizaine de secondes (Sapolsky *et al.*, 2000). La libération d'acétylcholine engendre également une induction de l'activation de certaines enzymes nécessaires à la biosynthèse d'adrénaline et de noradrénaline (Rosol *et al.*, 2001). Le « pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide » (peptide PACAP) est un neuropeptide libéré avec l'acétylcholine par les terminaisons nerveuses sympathiques splanchniques dans les médullosurrénales. Le peptide PACAP est considéré comme un co-neurotransmetteur nécessaire au maintien de la biosynthèse et à la sécrétion d'adrénaline durant le stress (Hamelink *et al.*, 2002). Une grande partie de l'apport sanguin à la médullosurrénale se fait par un système porte provenant des corticosurrénales. Les glucocorticoïdes libérés lors du stress par la corticosurrénale passent dans ce système porte traversant la médullosurrénale pour être libérés dans la circulation générale et jouent un rôle important dans la synthèse de l'adrénaline. Ils sont nécessaires à la synthèse de l'enzyme PNMT contrôlant la N-méthylation de la noradrénaline en adrénaline (Wurtman, 2002; Ehrhart-Bornstein & Bornstein, 2008).

L'adrénaline correspond à 80 % des catécholamines sécrétées par les médullosurrénales (Pocock & Richards, 2004). En cas de stress, les médullosurrénales sécrètent 95 % de l'adrénaline plasmatique et 30 % de la noradrénaline plasmatique. Les 70 % de noradrénaline plasmatique restant sont sécrétées par les terminaisons nerveuses du système sympathique (Kvetnansky *et al.*, 2009).

3.3.4. Terminaison de la réponse de l'axe sympathique

La réponse de l'axe sympathique est, comme l'axe corticotrope, sous rétrocontrôle négatif. Le CRF stimule le système LC/NA et par conséquent la libération de noradrénaline et d'adrénaline au niveau des terminaisons sympathiques et des médullosurrénales. Lorsque le CRF est inhibé par rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes, une inhibition de la réponse adrénergique est conséquente. Le système LC/NA possède des récepteurs GR et les glucocorticoïdes sont susceptibles de réguler directement l'activation de celui-ci (Kvetnansky *et al.*, 1995; Makino *et al.*, 2002). Une élévation aiguë des glucocorticoïdes inhibe l'activation de

l'axe sympathique. Par contre, une élévation chronique entraîne une diminution de cette inhibition (Makino *et al.*, 2002) voire une stimulation (Kvetnansky *et al.*, 1995).

3.3.5. Effets périphériques et centraux des catécholamines

L'adrénaline et la noradrénaline agissent via des récepteurs membranaires adrénergiques α et β couplés à des protéines G et qui comprennent de nombreux sous types (α1, α2, β1, β2, β3). L'adrénaline stimule principalement les récepteurs β et la noradrénaline les récepteurs β1 et α.

Les effets physiologiques des catécholamines circulantes médullosurrénaliennes sont très rapides et doivent être envisagés dans le cadre global de la réponse sympathique car la sécrétion de ces hormones est toujours associée à une libération de noradrénaline par les terminaisons sympathiques post-ganglionnaires (Pocock & Richards, 2004).

Parmi leurs effets principaux, l'adrénaline et la noradrénaline stimulent le rythme cardiaque et la force contractile du myocarde via des récepteurs β1, ce qui aboutit à un accroissement du débit cardiaque. La stimulation sympathique produit également une augmentation de la tension artérielle par une stimulation directe du cœur et une stimulation des muscles lisses artériolaires produisant une vasoconstriction des vaisseaux grâce aux récepteurs α. L'adrénaline et la noradrénaline modulent également les flux sanguins en diminuant les flux cutanés et rénaux et en augmentant les flux musculaires et coronaires. La stimulation sympathique entraîne le relâchement du muscle lisse bronchiolaire permettant ainsi une meilleure oxygénation grâce à une plus importante dilatation des bronches (Pocock & Richards, 2004).

Le muscle lisse gastro-intestinal se relâche avec l'adrénaline. Le tonus général et l'amplitude des contractions spontanées sont réduits par l'intermédiaire des récepteurs β engendrant une diminution de l'activité motrice du tube digestif (Pocock & Richards, 2004).

L'adrénaline et la noradrénaline agissent également au niveau du métabolisme (Nonogaki, 2000). Ainsi, l'adrénaline participe à l'activation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse dans le foie permettant la libération de glucose dans la circulation générale. L'adrénaline circulante stimule la sécrétion de glucagon et inhibe la sécrétion d'insuline par le pancréas. L'augmentation de la glycogénolyse dans le foie est alors modulée par le glucagon et l'effet direct de l'adrénaline sur les cellules hépatiques. L'adrénaline et la noradrénaline stimulent la glycogénolyse dans les muscles entraînant une libération de lactate dans la circulation ce qui, combiné à leur action directe sur le foie de l'adrénaline, induit la néoglucogenèse hépatique. L'adrénaline et la noradrénaline stimulent également la lipolyse au niveau des adipocytes via des récepteurs β. Le couplage des catécholamines aux récepteurs β entraîne l'activation de

l'hormone-sensitive lipase et de la périlipine, 2 hormones impliquées dans la lipolyse (Jocken & Blaak, 2008).

Le système nerveux parasympathique est également mis en jeu durant le stress. Ainsi, la plupart des effets du système nerveux sympathique, et donc de l'adrénaline et de la noradrénaline, sont appuyés par une inhibition centrale (par le CRF notamment) du système parasympathique (Habib *et al.*, 2001). Par exemple, en réponse au stresseur, les efférences vers l'estomac du nerf vague sont inhibées par le CRF entraînant un ralentissement de la vidange gastrique alors que les efférences au niveau du colon sont stimulées par le CRF de manière indirecte via le système LC/NA et engendrant une augmentation du transit au niveau du colon (Stengel & Tache, 2009).

Sécrétée au niveau central, la noradrénaline joue principalement le rôle de système d'alarme et entraîne une diminution des fonctions neurovégétatives, comme le sommeil et l'alimentation par exemple (Habib *et al.*, 2001). Elle contribue également à augmenter les réponses autonomes et neuroendocrines au stress incluant l'activation de l'axe corticotrope grâce à l'innervation réciproque du système LC/NA et du PVN de l'hypothalamus (Habib *et al.*, 2001; Carrasco & Van de Kar, 2003; Itoi & Sugimoto, 2010). La noradrénaline active aussi l'amygdale qui est le centre à l'origine de la peur et est donc anxiogène (Habib *et al.*, 2001; Carrasco & Van de Kar, 2003; Aston-Jones & Cohen, 2005; Itoi, 2008; Itoi & Sugimoto, 2010).

3.4. Modulation des systèmes de stress en cas de stress chronique

L'exposition à un stress chronique entraîne une altération des structures et des fonctions des régions du cerveau impliquées dans le contrôle de l'axe corticotrope et du système nerveux autonome. Le stress chronique induit des modifications structurelles au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal (Magarinos & McEwen, 1995; Radley *et al.*, 2008). Au niveau du PVN, une augmentation de l'expression de CRF et d'AVP et une diminution de l'expression des GR sont mises en évidence (Herman *et al.*, 1995; Makino *et al.*, 1995) ainsi qu'une altération de nombreux autres récepteurs (Cullinan, 2000; Ziegler *et al.*, 2005). Des changements neurochimiques sont également démontrés dans de nombreuses voies de signalisation projetant vers le PVN, notamment une augmentation des niveaux de neurotransmetteurs GABA dans l'hypothalamus et le noyau du lit de la strie terminale (Bowers *et al.*, 1998). Ces changements sont à l'origine des effets délétères du stress chronique.

Pour connaître les mécanismes impliqués dans la réponse adaptative du stress, de nombreux modèles de stress ont été étudiés. En effet, un des objectifs de l'étude du stress est de connaître les mécanismes sous-jacents à l'activation des différents systèmes impliqués et les effets du stress sur ces mécanismes dans différentes situations métaboliques ou conditions environnementales. Connaître précisément ces mécanismes et leur modulation permet de mettre en place des programmes de lutte contre l'impact négatif qu'a actuellement le stress sur notre société.

B. ETUDIER LE STRESS

Pour étudier le stress, il est pertinent d'étudier le sujet cible. Dans le cas de l'homme, les études mécanistiques restent limitées et manipuler son environnement demeure difficile. Le modèle rongeur est plus malléable et permet d'avoir accès à un grand nombre de données. On peut également étudier le stress pour essayer d'améliorer les conditions de vie des animaux de rentes dans une optique d'amélioration du bien-être animal et/ou d'optimisation de la productivité. Il est alors possible d'utiliser les animaux en question dans des modèles expérimentaux. En outre, une partie des études utilisant les modèles de stress est dévolue à l'étude de médicaments ou d'aliments fonctionnels aux propriétés anti-stress, anxiolytiques ou antidépressives chez l'homme, le rongeur ou l'animal.

1. Catégorisation des modèles expérimentaux de stress

Comme nous l'avons vu au paragraphe I.A.1.2.1., il existe 2 grands types de stresseurs : physiques et psychologiques. Cette distinction se fait sur une perturbation réelle et effective ou prédite et anticipée de l'homéostasie. La différence entre les 2 types de stresseurs est importante car bien que tous les 2 entraînent une activation de l'axe corticotrope et/ou du système nerveux sympathique, les voies nerveuses d'activations sont différents (Sawchenko *et al.*, 2000; Dayas *et al.*, 2001). Dans beaucoup de modèles expérimentaux de stress, la différence entre physique et psychologique n'est pas toujours claire, mais généralement, l'une des 2 composantes est prédominante.

1.1. Modèles de stress chez l'homme

Chez l'homme, les modèles de stress utilisés en laboratoire ont souvent pour objectif de mimer des situations de la vie courante afin de pouvoir extrapoler les résultats à la vie réelle. Les stresseurs sont souvent d'ordre psychosocial mais peuvent également être physiques. Un modèle de stress est jugé pertinent lorsqu'il est assez intense pour activer l'axe corticotrope ou/et le système nerveux sympathique (Kajantie & Phillips, 2006).

Les stresseurs psychosociaux les plus couramment utilisés sont ceux basés sur la prise de parole en public ou la performance de tâches mentales, comme par exemple des exercices mathématiques (Earle *et al.*, 1999) effectués dans un laps de temps précis et/ou sous la pression de l'investigateur. Le modèle le plus connu est le « Trier Social Stress Test » (Kirschbaum *et al.*, 1993). Ce test consiste à faire tout d'abord parler le sujet de ses compétences durant 5 min puis à le soumettre à une tâche arithmétique devant un public de quelques personnes tout en étant filmé.

Parmi les stresseurs physiques, l'épreuve au froid ou « cold pressor test » consistant à plonger sa main durant quelques minutes dans un bac d'eau glacée (Duncko *et al.*, 2007) ou l'exercice physique par exemple (Deuster *et al.*, 1998) sont connus pour entraîner une activation de l'axe corticotrope et/ou du système nerveux sympathique.

1.2. Modèles de stress chez le rongeur

Chez le rat ou la souris, de très nombreux modèles de stress ont été développés sur la base de stresseurs psychologiques, physiques ou mixtes.

1.2.1. Stresseurs physiques

Parmi les stresseurs purement physiques classiquement utilisés chez les rongeurs de laboratoire, on trouve le stress opératoire consistant à opérer un animal (Varma *et al.*, 1999) et donc à engendrer des dommages tissulaires et une hémorragie limitée. L'hémorragie seule constitue un autre stresseur physique lors duquel une quantité conséquente de sang est prélevée à l'animal (Dayas *et al.*, 2001). Enfin, on peut également citer l'injection de produit toxique comme la formaline (Pacak, 2000), le LiCl (Rinaman, 1999a) ou le LPS (Valles *et al.*, 2000) ou le placement du rongeur dans un caisson hypobare (Simler *et al.*, 2007) comme autres stresseurs physiques souvent utilisés.

1.2.2. Stresseurs mixtes, psychologiques et physiques

Il est parfois difficile de classer les stresseurs entre physiques et psychologiques. Certains stresseurs présentent les caractéristiques à la fois d'un stresseur physique et d'un stresseur psychologique, la menace pour l'homéostasie est alors réelle mais il existe également une menace prédite. C'est le cas des stresseurs comme la nage forcée dans l'eau froide, les chocs électriques à la patte ou le stress de froid. La nage forcée dans l'eau froide (Figure 18) consiste à placer le rat ou la souris dans un bac d'eau froide pendant une dizaine de minutes (Dal-Zotto *et al.*, 2000). Lors du stress de chocs électriques à la patte (Figure 19), l'animal est placé dans un compartiment dont le sol est électrifié et reçoit des chocs électriques réguliers durant quelques minutes (Retana-Marquez *et al.*, 2003). Le stress de froid consiste à placer l'animal dans une chambre froide à 4 °C (Dronjak *et al.*, 2004). Le fait d'être immergé dans l'eau froide, de subir des chocs électriques et d'être dans un environnement froid sont des stresseurs physiques mais le fait de ne pouvoir s'échapper de cet environnement néfaste engendre un stress psychologique important (Sawchenko *et al.*, 2000; Dayas *et al.*, 2001).

Figure 18. Illustration d'un stress de nage forcée chez le rat.

Figure 19. Illustration d'un stress de choc électrique à la patte chez le rat

1.2.3. Stresseurs psychologiques

Certains stresseurs psychologiques impliquent un aspect physique engendrant une confusion concernant leur classement en tant que stresseurs psychologiques. Par exemple, la manipulation des animaux par les investigateurs (Kvetnansky *et al.*, 1992), le stress de contention et d'immobilisation sont des stresseurs incluant une limitation du mouvement des animaux. Le stress de contention consiste à placer dans un tube en plastique (Figure 20), un grillage ou encore un cône en plastique souple ajusté à son corps (Buynitsky & Mostofsky, 2009) et le stress d'immobilisation consiste à attacher les pattes et le cou de l'animal par des sangles en

métal (Ricart-Jane *et al.*, 2002). La composante physique de ces stresseurs n'est pas à l'origine du stress car elle ne constitue pas une menace réelle de l'homéostasie. Par contre, lors de l'exposition à ces stresseurs, le fait de ne pas pouvoir s'échapper est à l'origine d'un stress psychologique pour l'animal (Dayas *et al.*, 2001).

Figure 20. Illustration d'un stress de contention chez le rat.

1.2.4. Stresseurs sociaux

Parmi les stresseurs psychologiques, les stresseurs sociaux sont classés à part et méritent une attention particulière. La plupart de modèles de stress psychologiques et physiques sont limités car ils ne représentent pas de situations rencontrées en milieu naturel et les résultats obtenus peuvent être critiquables.

Le contexte social est à l'origine de stress important chez l'homme et les animaux vivant en société, comme le rat. Chez de nombreuses espèces, la capacité à gérer les défis sociaux au sein de leur habitat naturel détermine largement la survie de l'individu et des mécanismes de défenses envers les semblables sont mis en place pour cela. La mise en échec de ces mécanismes de défense est à l'origine de stress psychologique intense. Les modèles de stress impliquant une interaction sociale sont donc éthologiquement pertinents car ils miment des situations naturelles et sont très efficaces (Blanchard *et al.*, 2001).

Les 2 principaux modèles de stress sociaux sont la défaite sociale et la subordination dans un système appelé « Visible Burrow System » (VBS). La défaite sociale consiste à placer le rat à stresser, appelé rat intrus, dans la cage d'un rat plus gros, entraîné à être dominant, appelé rat résident (Meerlo *et al.*, 1996c). Rapidement, le résident impose son statut de dominant et met en situation de soumission l'intrus, c'est la défaite sociale de l'intrus. La défaite sociale reproduit donc le stress pouvant être engendré dans les situations d'établissement et de maintenance de hiérarchie sociale. Le VBS est un modèle encore plus proche de la réalité car il reproduit les conditions naturelles de vie des rats (Tamashiro *et al.*, 2007). Le VBS est un terrier fait de plastique opaque et divisé en différentes salles et tunnels, où sont répartis des mangeoires et des

points d'eau (Figure 21). Une colonie de 4 mâles et 2 femelles est hébergée au sein du VBS et les mâles présents dans le VBS sont donc en compétition lors de la recherche de nourriture, d'eau, de partenaire sexuelle. Le stress issu du VBS est donc dérivé des interactions naturelles entre les différents rats et ne nécessite pas l'intervention d'un manipulateur. Une hiérarchie entre les mâles se met rapidement en place avec un mâle dominant et 3 subordonnés. Les rats subordonnés sont caractérisés comme plus stressés que le rat dominant.

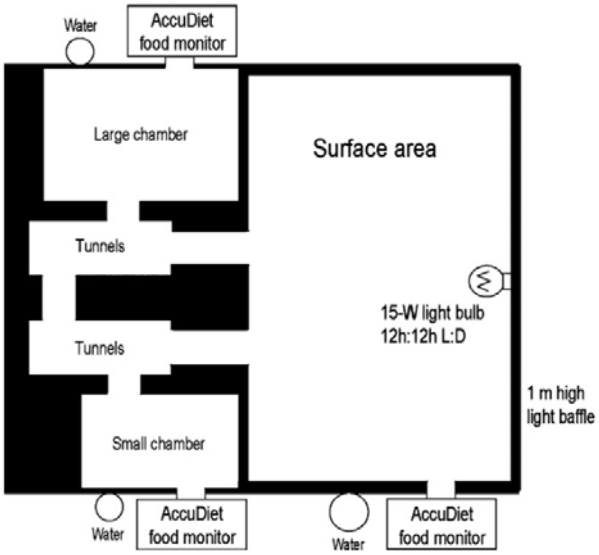


Figure 21. Schéma d'un terrier artificiel utilisé pour le stresseur social « Visible Burrow System ».

1.2.5. Intensité du stresseur

Les stresseurs sont d'intensité variable, de faible à très sévère. Les stresseurs les plus faibles sont la manipulation ou le pincement à la queue et sont considérés comme anxiolytique car ils induisent une diminution de l'anxiété (Meerlo *et al.*, 1999; Maslova *et al.*, 2002; Sinno *et al.*, 2009). Les stresseurs les plus sévères sont souvent physiques et sociaux, comme par exemple l'injection de toxines ou la défaite sociale, mais des stresseurs psychologiques comme l'immobilisation peuvent également être très intenses (Koolhaas *et al.*, 1997; Valles *et al.*, 2000; Marquez *et al.*, 2002).

1.3. Modèles de stress chez les animaux d'élevage, exemple de la poule

Il existe également des modèles expérimentaux de stress chez les animaux de rente comme les poules, les vaches et les cochons. Dans la plupart des cas, les modèles de stress ont pour objectif de reproduire des conditions stressantes d'élevage et possèdent donc des composantes

mixtes physiques, psychologiques et sociales. Chez la poule[12], la chaleur (Debut *et al.*, 2003), le transport (Debut *et al.*, 2003), la contention (Korte *et al.*, 1997; Bedanova *et al.*, 2007) et la modification des conditions d'hébergement (nombre de poules par cage, enclos versus cage, etc.) (Cheng & Fahey, 2009) sont des stresseurs classiques.

2. Application du stresseur dans le temps

2.1. Application aiguë ou chronique

Expérimentalement, le stresseur peut être appliqué de manière aiguë c'est-à-dire une seule fois, de manière discontinue et limitée dans le temps. L'application aiguë est à opposer à l'application chronique lorsque le stresseur est appliqué soit de manière intermittente mais répétée dans le temps sur une longue période, soit de façon continue dans le temps. Entre l'application aiguë et chronique, certains stresseurs peuvent être appliqués de manière répétée, c'est-à-dire de façon intermittente mais répétée un nombre restreint de fois (2 à 3). Néanmoins, l'application répétée est souvent considérée comme aiguë.

Chez l'homme, il est difficile d'appliquer en laboratoire un stresseur de manière chronique car nous avons vu que le stress a des effets délétères lorsqu'il devient chronique. Pour étudier le stress chronique chez l'homme, l'utilisation de questionnaires (« Life Stress Inventory, Perceived Stress Scale » ou « Social Readjustment Rating Scale » (Noble, 2002)) permet de sélectionner des individus dont la vie quotidienne est une source continue de stress.

2.2. L'habituation au stress

Chez l'animal, l'application répétée du même stresseur (homotypique) tel que la contention (Girotti *et al.*, 2006; Jaferi & Bhatnagar, 2006), l'immobilisation (Garcia *et al.*, 2000), le froid (Bhatnagar & Meaney, 1995), la manipulation (Dobrakovova *et al.*, 1993), entraîne un phénomène d'habituation. L'habituation dans la neurobiologie du stress se réfère à la réduction des réponses physiologiques de l'axe corticotrope induites par la répétition de l'exposition à un stresseur homotypique en comparaison avec les réponses importantes induites par l'exposition aiguë à ce stress (Grissom & Bhatnagar, 2009). L'activation de l'axe corticotrope est métaboliquement coûteuse et peut être délétère si elle devient excessive. Réduire cette activation lors de l'exposition à un agent stressant non nocif par nature est donc adaptatif pour

[12] L'extrait de levure que nous allons étudier par la suite, a montré un effet anti-stress chez la poule, c'est pourquoi cet exemple est toujours choisi concernant l'étude du stress chez les animaux d'élevage.

l'organisme. Généralement nocif, les stresseurs physiques n'engendrent habituellement pas d'habituation. L'habituation à un agent stressant psychologique appliqué de manière répétée est fonction de l'intensité de cet agent et du nombre de répétitions : plus un stresseur est faible, plus l'habituation est rapide et certains stresseurs psychologiques très intenses n'engendrent pas d'habituation (Cyr & Romero, 2009; Grissom & Bhatnagar, 2009).

Le processus d'habituation est dû à des mécanismes complexes impliquant d'une part les mécanismes de rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes (Jaferi *et al.*, 2003; Jaferi & Bhatnagar, 2006) et d'autre part l'activation de circuits spécifiques du système limbique liés à l'apprentissage et à la mémoire par l'intermédiaire du PVN et du thalamus (Herman *et al.*, 2003; Patel & Hillard, 2008; Grissom & Bhatnagar, 2009). L'axe sympathique n'est pas sensible à l'habituation (Kvetnansky *et al.*, 1995; Makino *et al.*, 2002; Sabban & Serova, 2007). Ce phénomène semble être dû au fait qu'une élévation aiguë des glucocorticoïdes inhibe la réponse catécholaminergique au stress alors qu'une élévation chronique diminue cette inhibition (Kvetnansky *et al.*, 1995; Makino *et al.*, 2002).

Afin d'étudier les effets du stress à long terme, il est utile d'avoir des modèles expérimentaux de stress chronique n'induisant pas d'habituation, mais ces modèles sont restreints. L'exposition répétée à des stresseurs de types physiques comme l'hémorragie (Smith *et al.*, 1988) et certains stresseurs à la fois physiques et psychologiques comme les chocs électriques à la patte (Pitman *et al.*, 1990) n'induisent pas d'habituation. Les stresseurs sociaux considérés comme plus éthologiques comme le VBS (Tamashiro *et al.*, 2007) ou la défaite sociale (Keeney *et al.*, 2001; Keeney *et al.*, 2006; Barnum *et al.*, 2007) ne sont également pas sensibles à l'habituation. Pour ne pas induire d'habituation, une méthode consiste à appliquer de manière répétée des stresseurs hétérotypiques. Ce modèle est appelé stress chronique variable (SCV) et consiste à l'application aléatoire et imprévisible d'une variété de stresseurs d'intensité moyenne. L'aspect imprévisible du type de stress, de sa durée et du moment auquel il est appliqué prévient l'habituation du rongeur au stress. Ce modèle est à l'origine un modèle animal de la dépression humaine car son application engendre les symptômes classiques de l'état dépressif (perte de poids, hyperactivation de l'axe corticotrope, etc.) (Willner, 2005).

2.3. Le phénomène de facilitation

L'application d'un stresseur de manière chronique, qu'il induise (Bhatnagar & Dallman, 1998; Bhatnagar & Vining, 2003; Tauchi *et al.*, 2008) ou non une habituation (Marti *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2007), permet d'augmenter la sensibilité des systèmes de

stress et ainsi d'accroitre la réponse à un nouvel agent stressant. Ce phénomène est appelé facilitation (Dallman & Jones, 1973). La facilitation n'est probablement pas due à des modifications du rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes car la surrénalectomie et l'administration constante de glucocorticoïdes de remplacement ne modifie pas ce phénomène (Akana *et al.*, 1996). En outre, des changements dans l'expression de CRF et d'AVP au niveau du PVN de l'hypothalamus et la régulation des récepteurs à ces 2 neuropeptides semblent jouer un rôle dans l'hypersensibilité à un nouveau stresseur dans le cadre d'un stress chronique (Aguilera, 1998). Il est également possible que la facilitation soit modulée par une action des glucocorticoïdes au niveau de la synthèse de CRF dans le noyau central de l'amygdale (Akana & Dallman, 1997; Dallman, 2009; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Toutefois, les mécanismes de la facilitation ne sont pas encore clairement élucidés.

3. Les marqueurs de stress

Les marqueurs de stress sont nombreux. Chez l'animal (rongeurs, animaux de rente), les marqueurs invasifs sont largement utilisés alors que chez l'homme, les marqueurs non invasifs sont préférés.

3.1. Principaux marqueurs de stress

Les médiateurs de l'activation des axes corticotrope et sympathique peuvent être considérés comme des marqueurs de stress. Chez l'animal, les concentrations plasmatiques de corticostérone, d'ACTH, de catécholamines, d'AVP et d'oxytocine et l'expression de neurotransmetteurs comme le CRF, l'AVP et la noradrénaline dans divers zones du cerveau sont souvent utilisés (Hargreaves, 1990; Marti & Armario, 1998; Mormede *et al.*, 2007). Chez l'homme, le cortisol salivaire est généralement mesuré pour évaluer le stress car son prélèvement est non invasif (Rosmond *et al.*, 1998; Duncko *et al.*, 2007).

Pour étudier l'effet du stress, il est également possible de mesurer différents facteurs issus de la régulation par le stress de systèmes de l'organisme comme le système cardiovasculaire et immunitaire ou le métabolisme du glucose en dosant les concentrations plasmatiques de cytokines et de glucose ou en mesurant le rythme cardiaque (Hargreaves, 1990). En cas de stress chronique, des modifications morphologiques peuvent apparaître et l'évaluation du poids corporel, des glandes surrénales, du thymus (Figure 3) peuvent être des indices intéressants de l'état de stress de l'animal (Selye, 1976).

Enfin, le stress engendre des modifications comportementales. Le stress induit notamment une augmentation du niveau d'anxiété et des tests comportementaux ont été élaborés pour le mettre en évidence chez le rongeur comme le test de l'« open field » ou de l'« elevated-plus maze »[13] (Schmitt & Hiemke, 1998; Prut & Belzung, 2003).

3.2. Particularités de la poule, notion du picage

Les marqueurs de stress classiques chez les volailles sont la concentration plasmatique de corticostérone mais également le rapport du nombre d'hétérophiles sur lymphocytes du sang total[14] (Gross & Siegel, 1983; de Jong *et al.*, 2002; Post *et al.*, 2003), indice de l'immunosuppression induite par le stress.

D'un point de vue comportemental, la survenue de comportements anormaux indiquant un mal être peut être un marqueur de stress. Dans les élevages de volailles, le comportement jugé anormal le plus fréquent et le plus gênant est le picage. Chez une poule, le picage est un comportement consistant à donner des coups de bec, voire à arracher les plumes de ses congénères. Il peut être divisé en 2 catégories, le picage des plumes (« feather pecking ») et le picage agressif (« aggressive pecking ») (Sedlackova *et al.*, 2004; Buitenhuis *et al.*, 2009). Bien que ces 2 formes de picage soient différentes dans leur motivation et leur réalisation, elles sont à l'origine d'une diminution du bien-être due à des blessures et à une hausse de la mortalité dans les élevages (Beaumont *et al.*, 2010). Le picage des plumes est orienté vers la croupe, la queue ou l'abdomen du congénère et consiste en des picages répétés tirant les plumes, n'entraînant généralement pas de réactions de l'animal piqué mais pouvant aboutir à l'arrachage des plumes (Figure 22). L'origine de ce picage n'est pas claire mais il se pourrait que ce comportement soit issu d'une redirection du picage au sol (Rodenburg *et al.*, 2004). Le picage agressif est dirigé vers la tête et le cou, il est vigoureux et rapide et induit une fuite de l'animal piqué. Ce picage est connecté à l'établissement de la hiérarchie au sein des élevages, (Sedlackova *et al.*, 2004) car les animaux haut en hiérarchie initient le plus grand nombre de picage agressif (Buitenhuis *et al.*, 2009). De nombreux facteurs influencent le picage, comme le statut nutritionnel,

[13] Le test de l'open field est décrit dans la partie II de ce document. L'elevated-plus maze ou labyrinthe en croix surélevé est un dispositif surélevé en forme de croix dont 2 bras opposés sont fermés, les autres étant ouverts sur le vide et donc anxiogènes. Les animaux sont placés au centre de la croix durant quelques minutes et le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans les bras ouverts sont corrélés au niveau d'anxiété.

[14] Ce ratio correspond au nombre de leucocytes de types hétérophiles (granulocytes) sur le nombre de leucocytes de type lymphocytes comptés sur 100 cellules ou 1 ml de sang total. C'est un indicateur de stress à long terme très robuste car il présente une variabilité très faible et n'est pas sensible au stress induit par les manipulations nécessaires à la prise de sang.

l'environnement physique, des facteurs sociaux, des facteurs génétiques, l'âge, etc. (Hughes & Duncan, 1972). Mais le picage peut également être une conséquence du stress et sa fréquence est augmentée suite à un stress (El-Lethey *et al.*, 2000; Buitenhuis *et al.*, 2004).

Figure 22. Poule dont les plumes ont été arrachées par picage de ses congénères.

4. Les agents anti-stress

4.1. Médicaments anti-stress

De nombreux médicaments anxiolytiques et d'autres médicaments affectant les récepteurs aux catécholamines, au GABA, aux opioïdes et à la sérotonine notamment, modulent la réponse neuroendocrine au stress et peuvent donc être considérés comme anti-stress (Van de Kar & Blair, 1999; Carrasco & Van de Kar, 2003). Nous avons vu que les systèmes catécholaminergiques, GABAergiques, opioïdergiques et sérotoninergiques modulent l'axe corticotrope et sympathique. Ces médicaments peuvent inhiber la sécrétion d'un ou plusieurs neurotransmetteurs ou hormones impliqués dans la réponse au stress sans inhiber complètement cette réponse (Van de Kar & Blair, 1999).

Prenons l'exemple du diazépam, un anxiolytique de la grande famille des benzodiazépines. Les benzodiazépines agissent sur le système GABAergique. Ils se fixent aux récepteurs $GABA_A$ augmentant ainsi l'activité centrale inhibitrice des neurones GABA. Au niveau de la réponse au stress, le diazépam module notamment l'anxiété induite par le stress et l'activation de l'axe corticotrope. Ainsi, des doses à partir 0,5 mg/kg de diazépam permettent de produire des effets anxiolytiques sur une variété de mesures comportementales de l'anxiété lors de tests comme l'open-field ou l'elevated-plus-maze (Rex *et al.*, 1996; Schmitt & Hiemke, 1998; Bert *et al.*, 2001; Ballard *et al.*, 2005). Des doses de 5 à 10 mg/kg de diazépam permettent de diminuer l'élévation de la corticostérone suite au stress alors que des doses en dessous de 3 mg/kg sont inefficaces sur ce paramètre (Kalman *et al.*, 1997; Bernet *et al.*, 2000; Salman *et al.*, 2000). Par

contre, dès 1 mg/kg, l'administration de diazépam permet de diminuer le pic d'ACTH suite au stress (Bernet *et al.*, 2000).

4.2. Produits anti-stress issus de l'alimentation

La barrière hémato-encéphalique est sélectivement perméable à une large variété de substances biologiquement actives. Les acides aminés peuvent pénétrer dans le cerveau grâce à différents transporteurs (Pardridge, 1986) et de nombreux facteurs nutritionnels sont impliqués dans le processus de régulation et d'adaptation au stress par l'organisme (Freedman *et al.*, 1986; Wurtman, 1987; Lieberman, 2003). La tyrosine et la phénylalanine sont des précurseurs des catécholamines et le tryptophane est précurseur de la sérotonine. Il peut donc exister un lien direct entre les apports nutritionnels et la biosynthèse de ces neuromédiateurs. En outre, les systèmes sérotoninergiques, GABAergiques, opioïdergiques et catécholaminergiques centraux sont des cibles privilégiées des médicaments anti-stress (Van de Kar & Blair, 1999; Kent *et al.*, 2002; Carrasco & Van de Kar, 2003) et des peptides issus du catabolisme digestif des protéines ou directement présents dans les protéines natives des aliments peuvent avoir une action agoniste ou antagoniste sur des récepteurs au sein de ces systèmes et induire ainsi des effets anti-stress. Par exemple, certains peptides issus du lait ont une activité opioïdergique (Teschemacher *et al.*, 1997) ou des peptides de poissons peuvent moduler l'activité centrale du GABA (Bernet *et al.*, 2000) induisant alors une diminution du stress.

Les différents modèles de stress développés depuis Selye ont permis de mettre en évidence les effets du stress sur de nombreux paramètres physiologiques et comportementaux. En particulier, il a été expérimentalement mis en évidence que le stress influence le comportement alimentaire.

C. STRESS ET COMPORTEMENT ALIMENTAIRE

Le comportement alimentaire désigne l'ensemble des conduites d'un individu vis-à-vis de la consommation d'aliments. La principale fonction physiologique de ce comportement est d'assurer l'apport des substrats énergétiques et des composés biochimiques nécessaires à l'ensemble des cellules de l'organisme. Le comportement alimentaire se caractérise par des épisodes discontinus de prise alimentaire suivant une variation circadienne avec une consommation durant la période active (le jour pour les espèces diurnes comme l'homme et la

nuit pour les espèces nocturnes comme le rat) et une période de jeûne durant la phase de repos (Le Magnen & Tallon, 1966). Pendant la période d'alimentation, la prise alimentaire est épisodique chez la plupart des espèces. Chez l'animal, l'intervalle entre 2 prises alimentaires est un des facteurs régulant le niveau énergétique, chez l'homme la répartition des épisodes de prise alimentaire est influencée par les normes sociales qui codifient le nombre et parfois la composition des prises alimentaires.

Afin de mieux comprendre les processus physiologiques qui stimulent et inhibent la consommation alimentaire, il est nécessaire de définir les termes de faim, satiété et rassasiement (Blundell *et al.*, 2010). La faim pousse à manger. C'est un déterminant majeur de l'heure du repas, de la nature des aliments ingérés et de leur quantité. L'ingestion de nourriture fait progressivement diminuer la sensation de faim mais divers processus contribuent à stopper de façon prématurée la prise alimentaire. L'ensemble de ces processus constitue le rassasiement, sensation initiant l'arrêt de la prise alimentaire et la fin d'un repas. La satiété est une sensation qui se développe une fois le repas terminé. En fonction de son importance, la satiété tend à repousser l'heure du repas suivant et à diminuer la prise alimentaire au cours de celui-ci. Le rassasiement et la satiété correspondent à 2 facettes d'un même processus continu d'intensité variable au cours du temps en fonction de la nature du repas, des habitudes alimentaires, de l'individu, etc. L'état rassasié qui commence dès le début du repas, augmente pour faire place à la sensation de satiété une fois le repas terminé. Pendant la période interprandiale, on passe de la satiété à la faim lorsque les nutriments disponibles après absorption ne suffisent plus à satisfaire la demande métabolique de l'organisme (Blundell *et al.*, 2010).

Le comportement alimentaire est une conduite complexe qui au-delà d'être contrôlée par des facteurs physiologiques, est contrôlée par de nombreux facteurs externes. Parmi ceux-ci, on peut citer les facteurs relatifs à l'environnement, la disponibilité des aliments ou les facteurs socioculturels. L'exposition à des stresseurs constitue un important facteur environnemental perturbant le comportement alimentaire.

1. Notions de contrôle du comportement alimentaire

Le contrôle homéostatique physiologique du comportement alimentaire se situe au niveau du cerveau. Le NTS du tronc cérébral et l'ARC de l'hypothalamus constituent les principaux centres impliqués dans ca contrôle de la prise alimentaire (Figure 23) (Berthoud, 2002).

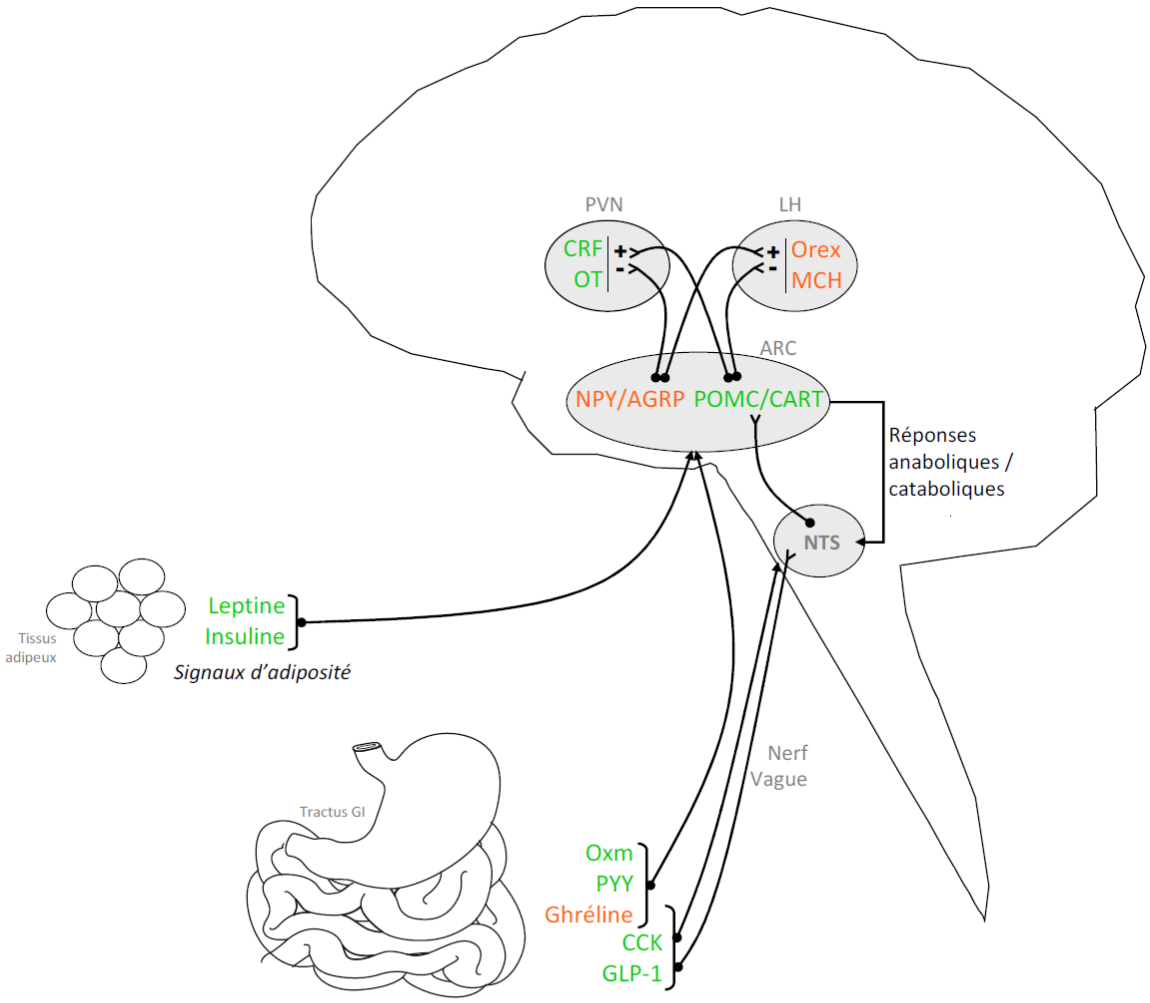


Figure 23. Représentation schématique des principales voies de régulation de la prise alimentaire. *Le NTS du tronc cérébral et l'ARC de l'hypothalamus constituent les principaux centres de régulation de la prise alimentaire. Les hormones gastro-intestinales (cholécystokinine (CCK) et « glucagon like peptide-1 » (GLP-1)) peuvent moduler l'activité du NTS par voie humorale ou via le nerf vague permettant une régulation de la prise alimentaire à court terme. La ghréline, le peptide YY (PYY) et l'oxyntomoduline (Oxm) sécrétées par le tractus gastro-intestinal et les signaux d'adiposité que sont la leptine (sécrétée pas le tissus adipeux) et l'insuline (sécrétée par le pancréas) régulent l'activité de l'ARC. Les neurones NYP/AgRP et POMC/CART de l'ARC via des projections vers le LH et le PVN induisent des réponses anorexigènes ou orexigènes grâce à des messagers secondaires que sont le CRF, l'oxytocine (OT), le MCH et les orexines (Orex). En vert, les peptides anorexigènes et en rouge, les peptides orexigènes. (Adaptée d'après Valassi et al., 2008)*

1.1. Contrôle de la prise alimentaire à court terme : rôle du noyau du faisceau solitaire

Le NTS reçoit la majeure partie des informations sensorielles issues du système cardio-vasculaire, de l'appareil respiratoire et du tractus digestif. Ces informations sont véhiculées par les nerfs crâniens et en particulier par le nerf vague. Le NTS, grâce a de fortes connexions avec

l'area postrema et le noyau moteur dorsal du nerf vague, constitue alors un centre privilégié de contrôle du repas à court terme (Schwartz, 2006).

Le NTS intègre les signaux pré et post-absorptifs transmis par le nerf vague ou par voie humorale. Il est activé suite aux différents types de stimuli conduisant au rassasiement durant un repas, incluant l'augmentation du volume gastrique (Powley & Phillips, 2004). Le NTS et le nerf vague contiennent des récepteurs pour un grand nombre d'hormones secrété durant la digestion (Schwartz, 2006). Par exemple, la cholécystokinine (CCK) et le « glucagon like peptide-1 » (GLP-1), hormones anorexigènes produites par l'intestin durant le repas, constituent des signaux de rassasiement intégrés par le NTS. La CCK et le GLP-1 inhibent la vidange gastrique et la CCK active également le NTS par voie humorale ou via le nerf vague (Huda *et al.*, 2006).

Le NTS comportent 3 principales populations de neurones impliqués dans le contrôle du comportement alimentaire : des neurones sécrétant comme neurotransmetteurs des catécholamines, le GLP-1 ou la POMC. Les neurones noradrénergiques sont activés suite aux stimulations mécaniques qui surviennent durant un repas et participent aux conséquences anorexigènes de celles-ci (Willing & Berthoud, 1997; Rinaman, 2003). Les neurones adrénergiques participeraient à la médiation de l'effet anorexigène de la CCK (Grill & Smith, 1988; Rinaman, 2003). Les neurones GLP-1 sont impliqués dans les mécanismes d'aversion gustative conditionnée (Rinaman, 1999b; Kinzig *et al.*, 2002) mais également dans la satiété et le rassasiement grâce à leurs projections vers le PVN de l'hypothalamus (Larsen *et al.*, 1997; Vrang *et al.*, 2003). Enfin, les neurones POMC du NTS sont très différents de ceux de l'ARC car ils ne co-localisent pas avec des neurones sécrétant le peptide apparenté à agouti (AgRP), un peptide antagoniste de l'α-MSH dont la POMC est précurseur. De plus, les régulateurs des neurones POMC de l'ARC et du NTS sont différents. Au sein du NTS, la CCK active fortement les neurones POMC et la leptine a un pouvoir anorexigène synergique (Cone, 2005).

1.2. Contrôle à moyen/long terme du comportement alimentaire : rôle de l'ARC

L'ARC constitue le chef de file des noyaux hypothalamiques dans le contrôle de la prise alimentaire (Valassi *et al.*, 2008). Il contient 2 groupes interconnectés de neurones aux propriétés antagonistes (Bagnol *et al.*, 1999), les neurones anorexigènes POMC/CART (pour « cocaine-and-amphetamine-related transcript ») et les neurones orexigènes NPY/AgRP (pour neuropeptide Y). Ces neurones projettent vers de nombreux autres noyaux centraux (Jobst *et al.*, 2004) notamment vers le PVN, dont les neurones sécrètent des substances anorexigènes comme

le CRF (Heinrichs & Richard, 1999) ou l'oxytocine (Gimpl & Fahrenholz, 2001), et l'aire hypothalamique latérale dont les neurones sécrètent la « melanin concentrating hormone » (MCH) et les orexines, des molécules orexigènes (Williams *et al.*, 2004). Les neurones POMC de l'ARC projettent également vers le NTS (Cone, 2005).

Le gène POMC exprime l'α-MSH, un peptide anorexigène (Ellacott & Cone, 2006). Le peptide CART est un peptide également anorexigène (Kristensen *et al.*, 1998) co-exprimé presque totalement dans les neurones POMC de l'ARC (Valassi *et al.*, 2008), justifiant la simplification de neurones POMC/CART en neurones POMC. Les neurones contenant le NPY présentent une co-expression quasi totale avec l'AgRP dans l'ARC (Broberger *et al.*, 1998). Ce sont 2 puissants neuropeptides orexigènes du système nerveux central (Williams *et al.*, 2004). L'AgRP est un antagoniste de l' α-MSH (Ollmann *et al.*, 1997) or les neurones POMC et NPY/AgRP projettent vers les mêmes régions véhiculant donc des messages opposés (Bagnol *et al.*, 1999; Cone, 2005). En outre, les neurones NPY possèdent des projections vers les neurones POMC permettant une inhibition de ces derniers (Cowley *et al.*, 2001) (Figure 24).

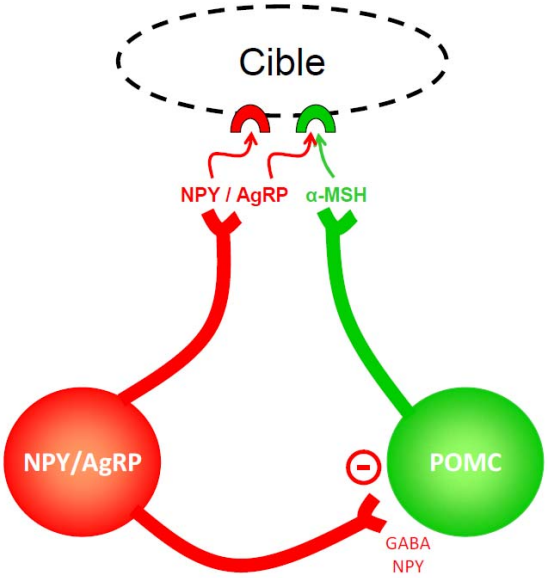


Figure 24. Interactions entre les neurones NPY/AgRP et POMC au sein du noyau arqué de l'hypothalamus.

(Adaptée d'après Cowley et al., 2001)

En raison de sa position, adjacent au 3ème ventricule, l'ARC est un site privilégié pour le suivi des teneurs sanguines en nutriments et hormones circulantes permettant une modulation de l'activité des neurones POMC et NPY/AgRP (Cone *et al.*, 2001). Par exemple une augmentation de la concentration plasmatique de glucose induit une activation des neurones POMC (Cone *et al.*, 2001; Fioramonti *et al.*, 2007). En outre la leptine et l'insuline sont des hormones sécrétées respectivement par les adipocytes et le pancréas et dont le taux circulant est corrélé à la masse adipeuse de l'organisme, ce sont donc des signaux d'adiposité constituant des régulateurs à long terme de l'homéostasie énergétique (Woods *et al.*, 1998). La leptine et l'insuline sont anorexigènes et activent les neurones POMC et inhibent les neurones NPY de l'ARC (Cone *et*

al., 2001). Enfin, les peptides gastro-intestinaux sont susceptibles d'agir sur l'ARC engendrant des messages orexigènes (ghréline) ou anorexigènes (peptides YY, oxyntomoduline) (Cowley, 2003; Stanley *et al.*, 2005).

1.3. Au-delà du contrôle homéostatique de la prise alimentaire

Dans certaines conditions, le contrôle homéostatique de la prise alimentaire peut être dépassé par des signaux non homéostatiques liés à l'hédonisme dont le but, conscient ou inconscient, est la recherche d'une récompense généralement génératrice de plaisir (d'où son appellation de « reward » en anglais) (Berthoud, 2004). L'hédonisme se définit traditionnellement comme l'association de 3 phénomènes comportementaux (Berridge, 2004). La première phase, indispensable à la reconnaissance ultérieure de l'aliment et à l'activation des autres circuits neuronaux impliqués dans l'hédonisme, est la phase d'apprentissage, dite « learning ». Cette phase implique principalement le noyau central de l'amygdale. L'aspect de motivation de l'hédonisme, ou « wanting », comprend l'élaboration de la stratégie visant à atteindre la valeur hédonique associée au stimulus. Même si cette démarche semble largement volontaire et donc consciente, il existe également une part inconsciente, dite « incentive salience ». Cet aspect de l'hédonisme met en jeu les connexions dopaminergiques entre l'aire ventrale tégmentaire et le noyau accumbens. Le troisième aspect de l'hédonisme est le « liking ». Il illustre le plaisir conscient ou inconscient associé à un stimulus. Il implique les neurones GABA et le système opioïdergique du noyau accumbens. Le contrôle de la prise alimentaire par ce système peut se synthétiser par la figure 25. En plus d'être des acteurs importants du contrôle homéostatique de la prise alimentaire, l'insuline et la leptine inhibent la prise alimentaire par une modulation de voies dopaminergiques et opioïdergiques des centres de l'hédonisme (Figlewicz & Benoit, 2009).

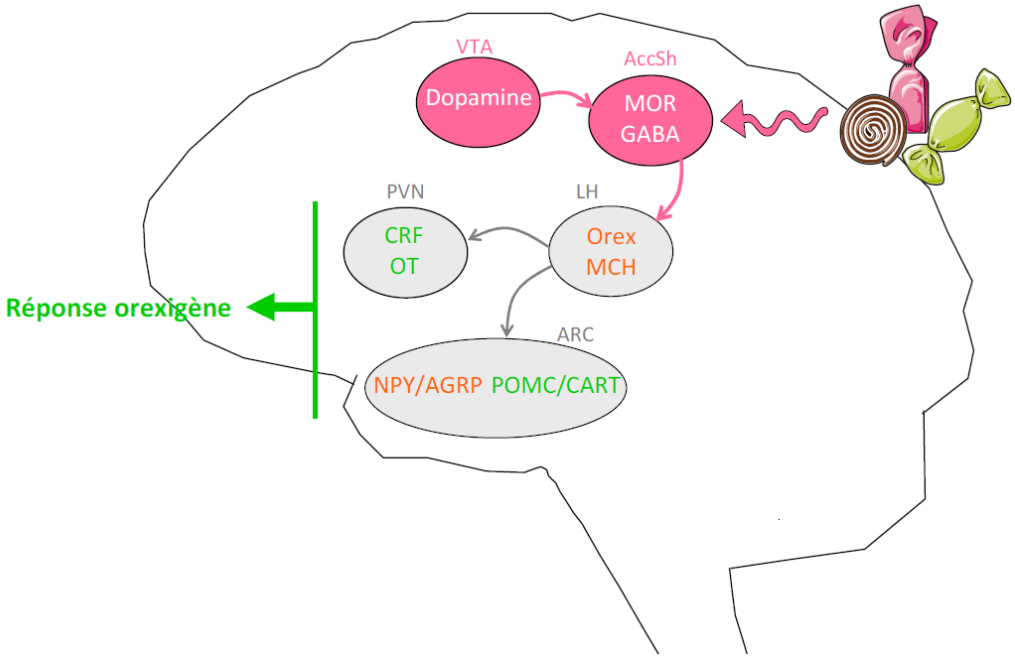


Figure 25. Régulation schématique de la prise alimentaire par le système de l'hédonisme.

Les neurones du noyau accumbens (Acc) reçoivent des projections corticales ou des régions olfactives quant à la valeur hédonique des aliments relative au liking. Les récepteurs μ aux opioïdes et les neurones GABAergiques de l'Acc sont alors activés et activent à leur tour les neurones orexines du LH. Les neurones orexines du LH projettent vers d'autres noyaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire comme l'ARC ou le PVN permettant d'induire une réponse orexigène. En réponse à la valeur hédonique relative au wanting, les neurones dopamine du VTA projettent également vers l'Acc mais il a été montré que l'effet orexigène de la dopamine est totalement séparé du liking et le rôle exact de la dopamine reste cependant complexe.

2. Relations entre stress et prise alimentaire

Nous avons vu précédemment que lors de l'application d'un stresseur, la réponse adaptative engendrait une redirection de l'énergie vers les tissus impliqués dans la réponse de stress mais également une inhibition des dépenses énergétiques nécessaires à d'autres fonctions comme par exemple se nourrir (Kyrou & Tsigos, 2009). Ainsi, fondamentalement, le stress engendre une inhibition de la prise alimentaire. Toutefois, l'association entre stress et prise alimentaire n'est pas aussi simple que cela et ce, aussi bien chez l'homme que lors d'études chez le rongeur.

2.1. Stress et prise alimentaire chez l'homme

Les effets du stress sur la prise alimentaire chez l'homme sont caractérisés par une grande variabilité interindividuelle (Greeno & Wing, 1994; Torres & Nowson, 2007). Ainsi, certaines personnes mangent plus lorsqu'elles sont stressées, d'autres au contraire ne peuvent rien consommer et une troisième catégorie semble ne pas modifier ses habitudes alimentaires.

Lors d'une étude au cours de laquelle des étudiants américains devaient répondre à des questionnaires concernant leurs habitudes alimentaires et le stress, 46 % des femmes et 17 % des hommes ont rapporté augmenter leur consommation alimentaire lors de périodes de stress, 37 % des femmes et 54 % des hommes ont rapporté la diminuer et 17 % des femmes et 29 % des hommes ont rapporté ne pas changer leur habitudes alimentaires (Zellner *et al.*, 2006). La restriction alimentaire est plus importante chez les femmes et joue un rôle important dans la modulation de la prise alimentaire par le stress. En effet, 71 % des individus rapportant une augmentation de la prise alimentaire dans des situations stressantes sont restreints alors que seuls 35 % le sont chez les personnes rapportant diminuer leur prise alimentaire. De plus 73 % des étudiants rapportant une augmentation de la prise alimentaire dans des situations stressantes ont indiqué qu'ils mangeaient en priorité des aliments qu'ils évitaient le reste du temps, comme par exemple les aliments gras et sucrés ou salés (comme le chocolat et les chips) (Zellner *et al.*, 2006). Une étude similaire a abouti approximativement aux mêmes résultats avec 41,7 % des participants affirmant manger plus et 38,8 % affirmant manger moins lors de périodes stressantes, avec pour tous, une préférence pour les aliments types « snack » (Oliver & Wardle, 1999).

Ces résultats ont été confirmés dans le cas d'études prospectives en conditions de vie réelle et d'études en laboratoire. En effet, lors d'une étude prospective suivant des individus sur leur lieu de travail, lors des périodes stressantes où le travail est intense, la consommation d'aliments riches en énergie, gras et/ou sucrés, est augmentée et une augmentation plus importante est observée chez les personnes en restriction alimentaire (Wardle *et al.*, 2000). En laboratoire, des stresseurs aigus tels que la préparation d'un exposé oral (Oliver *et al.*, 2000) et l'impossibilité de résoudre des anagrammes ou des jeux mathématiques insolubles (Zellner *et al.*, 2006; Habhab *et al.*, 2009) induisent une augmentation de la consommation d'aliments gras et sucrés bien que des aliments considérés meilleurs pour la santé soient également disponibles. Cette augmentation est particulièrement remarquable chez les individus vulnérables comme les personnes présentant une désinhibition alimentaire[15] (Olivier *et al.*, 2003; Rutters *et al.*, 2009a) et les personnes en restriction alimentaire[16] (Habhab *et al.*, 2009). Le lien entre le stress et la restriction et/ou la désinhibition alimentaire peut s'expliquer par une hyperactivité de l'axe

[15] La désinhibition est la tendance à la surconsommation dans un environnement obésogène (Bryant EJ, King NA & Blundell JE (2008) Disinhibition: its effects on appetite and weight regulation. *Obes Rev* **9**, 409-419.).

[16] La restriction cognitive est la tendance à restreindre volontairement sa prise alimentaire dans le but de contrôler son poids (Stunkard AJ & Messick S (1985) The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom Res* **29**, 71-83.).

corticotrope mis en évidence par un taux basal élevé de cortisol chez ces individus (Rutters *et al.*, 2009b).

En résumé, chez l'homme, les différences interindividuelles sont à l'origine de différentes réponses concernant la prise alimentaire lors de situations stressantes (Greeno & Wing, 1994). Les femmes semblent plus vulnérables que les hommes à une augmentation de la consommation suite au stress (Zellner *et al.*, 2006). Le fait d'être en restriction et/ou en désinhibition alimentaire sont parmi les facteurs de vulnérabilité entraînant une augmentation de la prise alimentaire en cas de stress (Greeno & Wing, 1994; Wallis & Hetherington, 2004; Rutters *et al.*, 2009a; Rutters *et al.*, 2009b; Wallis & Hetherington, 2009). De plus, de nombreuses études montrent que le stress entraîne une préférence pour les aliments palatables[17] gras et sucrés qu'importe la modification de la prise alimentaire globale (Oliver & Wardle, 1999; Oliver *et al.*, 2000; Gibson, 2006; Zellner *et al.*, 2006; Warne, 2009).

2.2. Stress et prise alimentaire chez le rongeur

Chez le rongeur, la relation entre stress et prise alimentaire semble moins sensible aux différences interindividuelles car dans la grande majorité des études, le stress engendre une diminution de la prise alimentaire. Toutefois, les régimes et aliments proposés modifient la réponse ingestive au stress.

2.2.1. Effets du stress sur la prise alimentaire d'aliments standards

Si l'on considère la prise alimentaire d'aliments standards[18], l'intensité et le type de stresseur mais également le rythme circadien modulent l'inhibition de la prise alimentaire liée au stress.

2.2.1.1. Effet de l'intensité et du type de stresseur

De manière aiguë, un stress peu intense, comme le stress de pincement de la queue (Antelman *et al.*, 1975; Nemeroff *et al.*, 1978; Samarghandian *et al.*, 2003) ou de manipulation (Badiani *et al.*, 1996) entraîne une augmentation de la prise alimentaire très transitoire (30 min). Par contre, l'application aiguë d'un stresseur d'intensité moyenne à forte induit une inhibition de la prise alimentaire chez le rat et la souris. Ainsi, des stresseurs moyens tels que la contention

[17] Se dit d'un aliment qui procure une sensation agréable lors de sa consommation.

[18] Les expressions « aliment standard » et « régime standard » qualifient les aliments ou régimes de composition standard type croquettes, spécialement formulés pour l'alimentation des rats ou souris.

(Rybkin *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2002b; Tabarin *et al.*, 2007), la nage forcée (Diane *et al.*, 2008) ou plus intenses comme le stress d'immobilisation (Valles *et al.*, 2000; Marquez *et al.*, 2002; Ricart-Jane *et al.*, 2002), le choc électrique à la patte (Marquez *et al.*, 2002), la défaite sociale (Meerlo *et al.*, 1996c; Meerlo *et al.*, 1997) ou l'injection de LPS (Valles *et al.*, 2000) entraînent une inhibition de la prise alimentaire dans les heures suivant la fin de l'exposition au stresseur.

L'importance quantitative de l'inhibition de la prise alimentaire semble être fonction de l'intensité du stresseur. Pour augmenter l'intensité d'un stresseur, il est par exemple possible d'augmenter le temps d'exposition, la force appliquée ou la concentration du produit injecté. Ainsi, en augmentant le temps d'exposition au stress d'immobilisation de 20 min à 6 h ou en augmentant la concentration de LPS injecté de 50 à 1000 µg/kg, la diminution de la prise alimentaire durant les 24 h suivantes est plus importante (Valles *et al.*, 2000). Toutefois, le type de stresseur est également très important car si l'intensité est bien corrélée à l'inhibition de la prise alimentaire pour les stresseurs physiques, celle-ci ne l'est qu'au-delà d'un certain seuil pour les stresseurs psychologiques puisqu'on ne trouve pas de différence dans l'inhibition de la prise alimentaire entre un stress d'immobilisation de 20 min et de 2 h (Valles *et al.*, 2000). Ainsi, pour un stresseur psychologique, l'inhibition de la prise alimentaire n'est un marqueur de l'intensité du stress que pour les stresseurs d'intensité moyenne à forte (Marquez *et al.*, 2002).

La durée de l'inhibition de la prise alimentaire semble également être fonction de l'intensité du stresseur. En effet, l'application aiguë du stress de contention entraîne une diminution de la prise alimentaire durant les 24 h suivantes mais l'effet disparaît ensuite (Rybkin *et al.*, 1997), alors que l'application aiguë d'un stresseur plus intense comme l'immobilisation entraîne une diminution de la prise alimentaire lors des 24 h suivant l'exposition au stresseur mais également jusqu'à 5 jours après la fin de celle-ci (Valles *et al.*, 2000; Marquez *et al.*, 2002). Le type de stresseur est très important car l'inhibition de la prise alimentaire suite à l'application d'un stresseur physique bien qu'intense comme l'injection de LPS, disparaît dans les 48 h (Valles *et al.*, 2000).

Ces résultats se retrouvent dans le cadre d'une exposition chronique aux stresseurs. Lorsqu'un même stresseur est appliqué de manière chronique, nous avons vu qu'une habituation au stress est possible et que plus un stresseur est intense, plus l'habituation est longue à se mettre en place. Ainsi, un stresseur intense appliqué de manière chronique, tel que l'immobilisation, entraîne une inhibition de la prise alimentaire plus forte qu'un stresseur d'intensité moyenne tel que la contention (Armario *et al.*, 1990; Marti *et al.*, 1994). Si le stresseur est d'intensité inférieure, comme certains paradigmes de contention, l'habituation

entraîne une disparition de l'inhibition de la prise alimentaire liée au stress (Krahn *et al.*, 1990; Marti *et al.*, 1994; Ely *et al.*, 1997).

2.2.1.2. Effet du rythme circadien

Le cycle circadien a également un effet sur la modulation de la prise alimentaire liée au stress. En effet, l'activité de l'axe corticotrope est soumise à un rythme circadien et la réponse à un stresseur est par voie de conséquence également soumise à ce rythme. La libération d'ACTH et de corticostérone est plus importante lorsque le stresseur est appliqué en début de phase diurne, période correspondant aux concentrations plasmatiques d'ACTH et de corticostérone minimum (Bradbury *et al.*, 1991; Sage *et al.*, 2001).

De plus, la prise alimentaire est également soumise à un rythme circadien avec, chez le rat, la majorité de la prise alimentaire se faisant lors de la période nocturne (Le Magnen & Tallon, 1966). Il a été mis en évidence que l'application d'un stress de contention en début de période diurne induit une diminution de la prise alimentaire durant les 2 h suivantes mais surtout durant les 2 premières heures du cycle nocturne (Rybkin *et al.*, 1997; Smagin *et al.*, 1999) alors que l'application en fin de période diurne induit une diminution uniquement durant les 2 h suivantes correspondant aux 2 premières heures du cycle nocturne (Rybkin *et al.*, 1997). La période d'accessibilité à l'aliment est également décisive. Harris *et al.* (Harris *et al.*, 2002b) ont montré que lorsque les rats sont nourris uniquement durant la période nocturne, l'application du stress de contention lors de la période nocturne ou diurne entraîne une diminution de la prise alimentaire sur 24 h alors que lorsque les rats sont nourris uniquement lors de la période diurne, le stress de contention n'a pas d'effet sur la prise alimentaire qu'il soit appliqué durant la nuit ou le jour. Bien que ces divergences soient difficilement explicables, il est important d'en tenir compte lors de l'étude de l'impact d'un stresseur sur la prise alimentaire.

Ces résultats sont valables lorsque les animaux sont nourris avec des régimes standards, mais de nombreuses études montrent que le régime influence également la relation entre stress et prise alimentaire.

2.2.2. Effet du type de régimes sur la modulation de la prise alimentaire induite par le stress

2.2.2.1. Modulation de la réponse de stress par le régime

Il a été mis en évidence que l'administration chronique d'un régime riche en lipides entraîne une augmentation de la réponse à l'exposition aiguë à un stresseur par rapport à un régime standard, avec en particulier une activation exagérée de l'axe corticotrope.

Ainsi un régime hyperlipidique (HL) donné à des rats durant quelques semaines entraîne, suite à un stress aigu de contention, une augmentation plus importante et plus longue de la concentration de marqueurs plasmatiques de stress comme la corticostérone, l'ACTH ou le glucose par rapport à un régime standard (Tannenbaum *et al.*, 1997; Kamara *et al.*, 1998) (Figure 26). Des résultats similaires se retrouvent avec d'autres types de stresseurs comme la nage forcée dans l'eau tiède (Pascoe *et al.*, 1991) ou l'injection de sérum physiologique accompagné d'un changement de cage (Legendre & Harris, 2006). La durée d'administration du régime HL ne semble pas avoir d'influence car les résultats sont quasiment identiques après 1 ou 12 semaines de régime HL (Tannenbaum *et al.*, 1997) et 4 jours semblent être suffisant pour obtenir une stimulation de la réponse de stress (Legendre & Harris, 2006).

Il a également été mis en évidence chez le rat que l'administration chronique (Tannenbaum *et al.*, 1997; Kamara *et al.*, 1998) ou aigu (Brindley *et al.*, 1981) d'un régime HL ou l'injection intraveineuse d'acides gras libres (Widmaier *et al.*, 1992; Widmaier *et al.*, 1995) entraînent une activation de l'axe corticotrope associée à une augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone. Tannenbaum *et al.* (Tannenbaum *et al.*, 1997) estiment alors que l'administration d'un régime riche en lipides peut être considérée comme un stresseur et que l'augmentation de la réponse à un agent stressant correspond au phénomène de facilitation (paragraphe I.B.2.2.2.4). Les mécanismes par lesquelles les régimes HL induisent un stress ne sont toutefois pas connus (Ulrich-Lai *et al.*, 2007; Kinzig *et al.*, 2008; Warne, 2009).

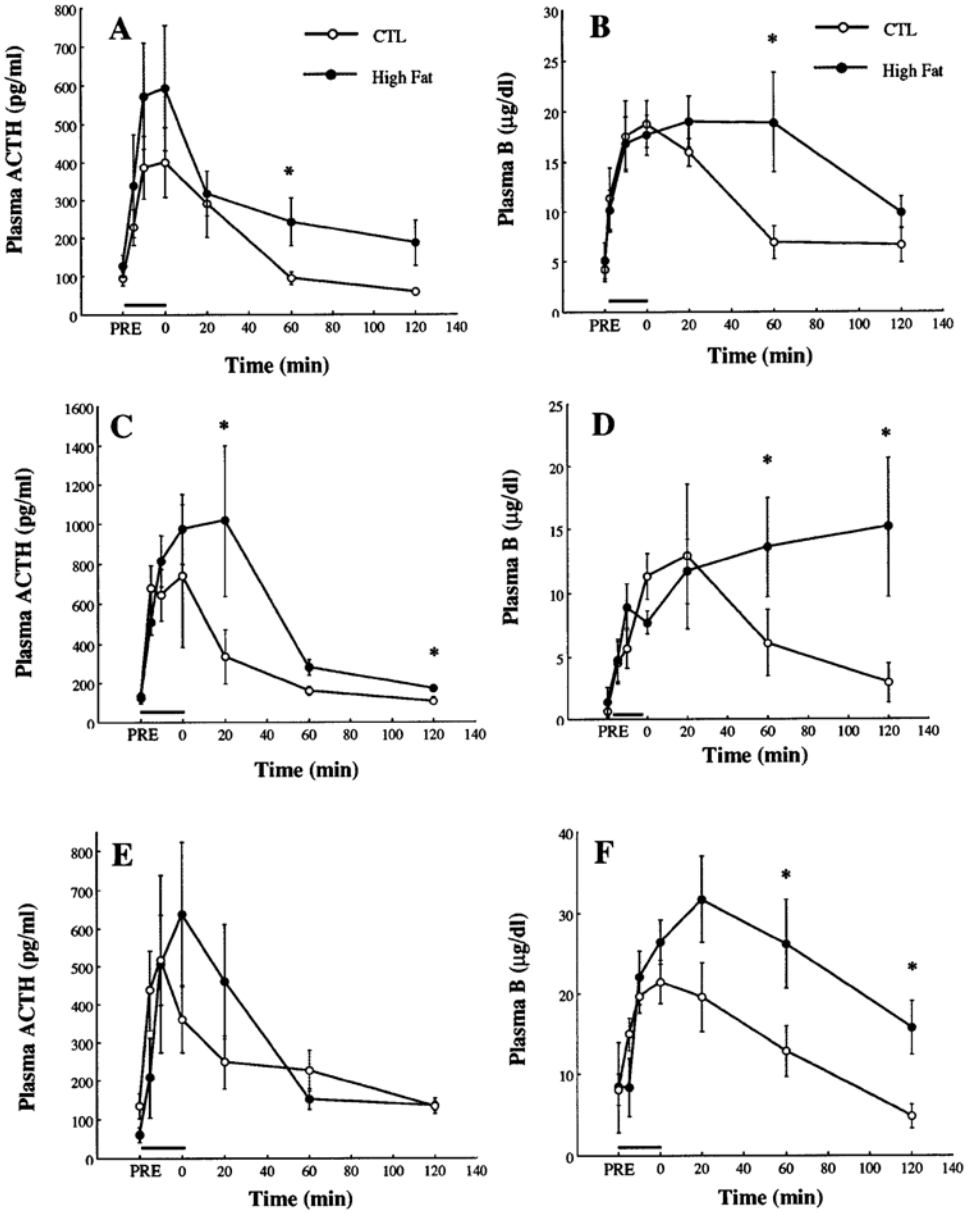


Figure 26. Augmentation de la réponse à un stress de contention par l'administration d'un régime monotone hyperlipidique.

*Concentration plasmatique d'ACTH (colonne de gauche) et de corticosterone (B) (colonne de droite) avant, pendant et suite à un stress de contention de 20 min appliqués chez des rats nourris par un régime hyperlipidique (High Fat) ou type Chow (CTL) durant 1 (A et B), 9 (C et D) et 12 semaines (E et F). * Indique une différence significative entre les groupes (P < 0,05). (D'après Tannenbaum et al., 2007)*

Par contre, la réponse exacerbée de l'axe corticotrope suite à un stresseur aigu ou chronique par les régimes HL ne se retrouve pas lorsque les animaux ont le choix de consommer ces régimes.

Ainsi, il a été montré que lorsque des rats ont le choix de consommer soit un régime standard, soit un régime composé de saindoux durant 7 jours avant l'exposition au stresseur, ils ne présentent plus une augmentation mais une diminution de la réponse de l'axe corticotrope (corticostérone et ACTH) à un stress aigu de contention par rapport aux rats consommant le

régime standard seul ou un régime obtenu par mélange de régime standard et de saindoux dans les mêmes proportions que celles choisies par les rats (la Fleur *et al.*, 2005) (Figure 27). Ainsi, ce n'est pas la consommation de calories provenant d'aliments gras qui diminue la réponse de stress mais le fait que les rats aient le choix de cette consommation. De manière similaire, si des rats ont le choix de consommer quotidiennement en accès limitée une solution de saccharose ou son équivalent gustatif n'apportant pas de calories, la saccharine, la réponse de l'axe corticotrope (corticostérone, CRF dans le PVN) à un stress aigu de contention est diminuée par rapport aux animaux n'ayant que le régime standard à disposition (Ulrich-Lai *et al.*, 2007).

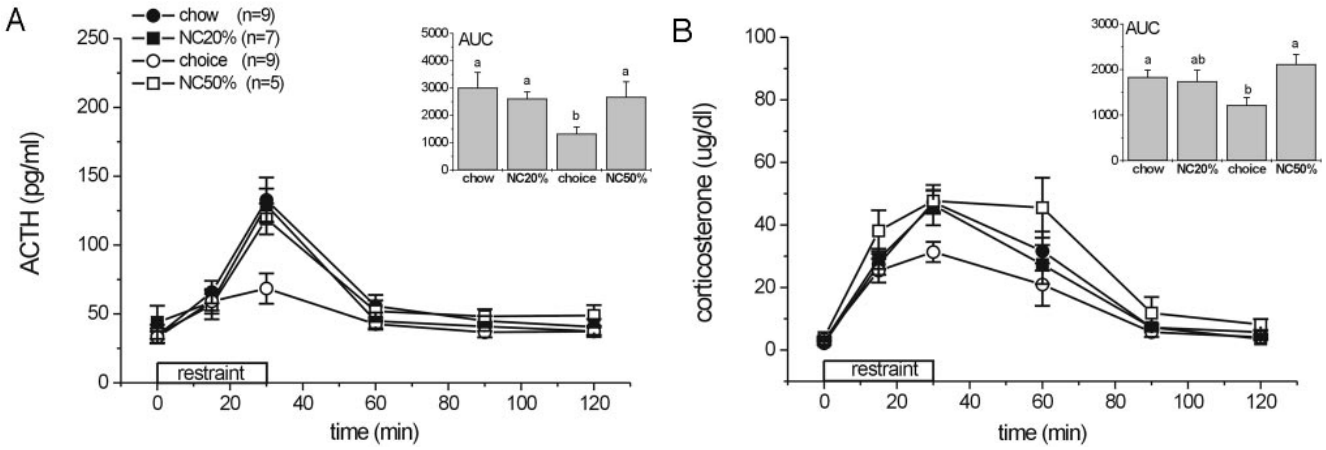


Figure 27. Atténuation de la réponse à un stress de contention par l'administration d'un régime composé d'un choix entre un aliment standard et des aliments palatables (saindoux et saccharose). *Concentration plasmatique d'ACTH (A) et de corticostérone (B) avant, pendant et suite à un stress de contention de 30 min et aire sous la courbe. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les groupes (P < 0,05). Les différents régimes sont donnés durant 7 jours : le groupe Chow ne reçoit que du régime standard, le groupe NC20 % reçoit un mélange sans choix de Chow et de saindoux (20 % de l'énergie fournie par le saindoux), le groupe « choice » a le choix entre une mangeoire de Chow et une mangeoire de saindoux, le groupe NC50 % reçoit un mélange sans choix de Chow et de saindoux (50 % de l'énergie fournie par le saindoux) correspondant à la consommation du groupe « choice ». (D'après la Fleur et al., 2005)*

Des études similaires étudiant les effets du choix entre un régime standard seul ou accompagné d'un régime gras et/ou sucré sur la réponse à un stress aigu de contention ont abouti aux mêmes conclusions (Ulrich-Lai *et al.*, 2007; Kinzig *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2009) et il a de plus été montré que diminuer l'accessibilité à ce régime à 1 ou 2 h par jour permet de potentialiser cet effet (Ulrich-Lai *et al.*, 2007; Kinzig *et al.*, 2008). Ces résultats ont été retrouvés lors de l'application d'un stress répété (5 jours de contention) (Pecoraro *et al.*, 2004) ou chronique (stress de froid continu sur 4 jours) (Bell *et al.*, 2002).

2.2.2.2. Effets du stress sur la consommation d'aliments palatables

Dans les quelques études où un régime HL est proposé sans choix, les résultats sont la plupart du temps identiques entre les groupes recevant le régime HL et les groupes recevant le régime standard. Ainsi, si le stress n'a pas d'effet sur la consommation du régime standard, la consommation du régime HL n'est pas non plus modifiée (Michel *et al.*, 2005; Garcia-Diaz *et al.*, 2007) alors que si le stress induit une diminution de la consommation de régime standard, la consommation du régime HL est également diminuée (Harris *et al.*, 1998; Legendre & Harris, 2006) parfois même de manière plus importante, suggérant une réponse au stresseur exagérée (Harris *et al.*, 1998).

Dans les études incluant un choix, après 5 jours de stress de contention, les rats diminuent leur consommation de régime standard entraînant une diminution de la prise alimentaire globale sur 24 h par rapport aux animaux non stressés, mais maintiennent une consommation de saindoux et de saccharose constante induisant une augmentation de la proportion de l'apport de calories par les aliments palatables par rapport aux animaux non stressés (Pecoraro *et al.*, 2004). Lorsque le choix entre un régime composé de graisse végétale sucrée et un régime standard *ad libitum* est donné, un stress aigu de contention entraîne une diminution de la prise alimentaire globale due à une diminution de la consommation des 2 régimes alors que si l'accès au régime palatable est limité, il n'y a pas de diminution de consommation de ce régime ce qui permet de voir disparaître la diminution de prise alimentaire globale induite par le stress (Kinzig *et al.*, 2008).

Le choix entre 3 régimes, hyperlipidique (45 % L/E), hyperprotéique (HP ; 40 % P/E) et hyperglucidique (HG ; 70 % G/E), chez des souris soumises à un stress chronique variable entraîne une augmentation de la prise alimentaire par rapport aux souris non stressées et cette augmentation est due à une large augmentation de la consommation du régime HL compensant la diminution de la consommation des régimes HG et HP (Teegarden & Bale, 2008). Lorsqu'un choix entre glucides, lipides et protéines est possible grâce à la disponibilité de régimes dont l'énergie est fournie uniquement par un macronutriment, l'application d'un stress de contention répété (3 jours) induit une diminution de la prise alimentaire due à une diminution de la consommation de glucides sans modifier la consommation de lipides et en augmentant légèrement la consommation de protéines (Harris *et al.*, 2000). Toutefois, avec un autre type de stresseur, la nage forcée, la consommation des 3 macronutriments est identiquement diminuée (Diane *et al.*, 2008). Néanmoins, ces études où les macronutriments sont proposés pures peuvent être mises dans une case à part des autres études citées. En effet, lors de ces études, aucun régime complet standard n'est proposé en plus des régimes mono-macronutriments. Or aucun

régime à base d'un seul macronutriment n'est suffisant pour l'animal, et on ne considère alors plus le choix entre un aliment palatable et un régime standard.

Les résultats concernant la consommation du régime habituel palatable suite au stress sont donc contradictoires avec une augmentation ou une diminution de l'aliment palatable du régime. Ces divergences sont vraisemblablement dues aux différences de palatabilité entre les aliments, aux différences entre les types de stress et peut être également aux différences entre les souches d'animaux. Il semble toutefois que l'ingestion d'aliments palatables soit moins sensible à la diminution de la prise alimentaire liée au stress et que la provision durant une période de temps limitée induit une augmentation de la consommation malgré l'exposition au stress.

De nombreuses expérimentations ont étudié la consommation d'aliments palatables lors de tests ponctuels de consommation de courte durée (< 2 h) effectués après l'application du stresseur. Parmi ces expérimentations, on compte de nombreuses études sur le stress chronique variable. Une des caractéristiques de ce type de stress est de mimer les symptômes de la dépression chez l'homme, notamment l'anhédonie[19]. Une diminution de la consommation et/ou de la préférence pour le saccharose lors d'un test de consommation est un moyen d'identifier ce symptôme. Ainsi il a été mis en évidence que le SCV engendre une diminution de la consommation de saccharose et/ou de la préférence pour le saccharose lors de présentation d'un choix entre une bouteille d'eau enrichie en saccharose accompagnée ou non d'une bouteille d'eau, durant ou à la fin du protocole de stress (Duncko *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Dalla *et al.*, 2005; Grippo *et al.*, 2005). Toutefois, cet effet n'est pas systématiquement reproductible (Matthews *et al.*, 1995; Forbes *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1997; Harro *et al.*, 2001) et des critiques concernant la validité de ce test sont fréquentes. Il semble que si la consommation de saccharose est rapportée au poids de l'animal, les effets du stress sont annulés (Matthews *et al.*, 1995; Forbes *et al.*, 1996; Harro *et al.*, 2001) car le SCV engendre une diminution importante du poids corporel (Willner, 1997).

La consommation d'aliments palatables types Froot Loops®[20] lors de tests de consommation de 3 min a également été évaluée suite à différents protocoles de stress. Ainsi, le SCV entraîne une diminution de la consommation de ces biscuits sucrés lorsque les rats sont nourris ou à jeun (Gamaro *et al.*, 2003a). Par contre, il a été mis en évidence qu'un stress de contention appliqué de manière chronique entraîne une augmentation de la consommation de Froot Loops® lors de test de consommation de 3 min appliqués dans un état nourri (Ely *et al.*, 1997; Silveira *et al.*,

[19] L'anhédonie est la réduction de la capacité à éprouver du plaisir quelqu'il soit (Fawcett J, Clark DC, Scheftner WA & Gibbons RD (1983) Assessing anhedonia in psychiatric patients. *Arch Gen Psychiatry* **40**, 79-84.).

[20] Les Froot Loops® sont des céréales sucrés en forme d'anneau et au goût de fruits à consommer au petit-déjeuner.

2000). Enfin, un stress aigu de contention ne modifie pas l'ingestion de Froot Loops® (Ely *et al.*, 1997) et un stress aigu d'immobilisation diminue la consommation d'aliments palatables types crackers au miel, fromage et cookies (Zylan & Brown, 1996).

Ainsi, les résultats concernant l'effet de l'exposition à un stresseur chronique et aigu sur la consommation d'aliments palatables proposés sur des périodes de moins de 2 h de manière très ponctuelle, sont divergents avec parfois une diminution, parfois une augmentation et souvent peu d'effet.

En résumé, la comparaison des études sur l'effet du stress sur la prise alimentaire chez le rongeur est difficile car chaque protocole est unique, les aliments proposés sont souvent différents et la souche de rat ou souris (Meerlo *et al.*, 1997; Pothion *et al.*, 2004; Michel *et al.*, 2005) ainsi que l'élevage duquel les animaux sont issus (Pecoraro *et al.*, 2006) (du fait de la grande vulnérabilité au stress des jeunes animaux (Charmandari *et al.*, 2003)) peuvent moduler l'effet du stress sur la prise alimentaire. Toutefois, nous pouvons conclure que le stress induit une inhibition de la prise alimentaire lorsque seuls des aliments standards sont disponibles, cette inhibition étant fonction de l'intensité du stresseur. Si les animaux sont nourris avec un régime hyperlipidique monotone, la réponse de stress est augmentée car l'administration de ce régime semble être considérée comme un stresseur. L'inhibition de la prise alimentaire par le stress est donc identique entre les conditions de régime HL et standard. Par contre, si le régime est divers avec le choix entre un régime standard et des aliments palatables gras et/ou sucrés alors la réponse de stress est diminuée et les animaux consomment préférentiellement l'aliment palatable engendrant une prise alimentaire stable ou augmentée suite au stress. Le fait de proposer un accès limité à l'aliment palatable durant quelques heures chaque jour permet de potentialiser cet effet. Ce choix de consommer préférentiellement des aliments palatables en cas de stress se retrouve chez l'homme. Dallman et al. (Dallman *et al.*, 2005) expliquent cet effet grâce à la théorie de l'aliment réconfort : en cas de stress, l'ingestion d'aliments palatables sources de plaisir permet de limiter les effets du stress. Ce phénomène pourrait participer à la prise de poids possiblement liée au stress.

2.3. Stress et poids corporel

2.3.1. Chez l'homme

Nous avons vu que l'exposition au stress entraîne plutôt une préférence pour les aliments riches en énergie ce qui suggère une possible régulation du gain de poids par le stress. Plusieurs études épidémiologiques ont montré le lien entre stress et gain de poids. Une étude prospective

sur 5867 paires de jumeaux a montré qu'un niveau élevé de stress prédisait un gain de poids important lors des 6 années suivantes (Korkeila *et al.*, 1998). Une corrélation entre l'intensité du stress au travail et un IMC élevé a été mise en évidence dans une étude finlandaise incluant 45810 fonctionnaires (Kouvonen *et al.*, 2005). Par contre, si la prise alimentaire induite par le stress contribue au développement de l'obésité, les individus obèses devraient consommer plus suite au stress que les individus minces, or ce n'est pas systématiquement le cas (Reznick & Balch, 1977; Slochower *et al.*, 1981; Ruderman, 1983; Pine, 1985; Rosenfield & Stevenson, 1988). Ainsi, le stress est corrélé au poids mais l'augmentation de la prise alimentaire n'explique pas à elle seule ce lien. En outre, il a été mis en évidence qu'il existe une très forte corrélation entre les taux plasmatiques de cortisol, l'adiposité abdominale et l'obésité (Bjorntorp, 1996; Bjorntorp, 2001). Il est possible que l'association d'une augmentation de la consommation d'aliments palatables et une hyperactivité de l'axe corticotrope soient à l'origine de l'augmentation du gain de poids liée au stress.

2.3.2. Chez le rongeur

Lorsque les rongeurs reçoivent un régime standard et sont soumis à un stresseur aigu d'intensité moyenne à sévère induisant une diminution de la prise alimentaire, leur gain de poids est souvent également affecté (Meerlo *et al.*, 1996b; Rybkin *et al.*, 1997; Valles *et al.*, 2000; Diane *et al.*, 2008). Généralement, cette diminution de gain de poids n'est pas rattrapée durant les jours suivant l'exposition au stresseur et les animaux stressés gardent alors un poids plus faible que les animaux non stressés (Meerlo *et al.*, 1996b; Rybkin *et al.*, 1997; Valles *et al.*, 2000). L'application chronique ou répétée d'un stresseur entraîne une diminution du gain de poids qu'il y ait (Armario *et al.*, 1990; Ricart-Jane *et al.*, 2002) ou non (Gamaro *et al.*, 2003b; Bartolomucci *et al.*, 2004; Tauchi *et al.*, 2008) une diminution de la prise alimentaire. D'autres facteurs interviennent en plus de la diminution de la prise alimentaire dans la balance énergétique pour expliquer la diminution du gain de poids liée au stress. Il a été mis en évidence qu'un stress aigu ou chronique entraîne une augmentation de la dépense énergétique, une oxydation préférentielle des acides gras (Harris *et al.*, 2006; Garcia-Diaz *et al.*, 2007) et une augmentation de la température corporelle (Harris *et al.*, 2002a; Olivier *et al.*, 2003; Bhatnagar *et al.*, 2006; Garcia-Diaz *et al.*, 2007).

Les animaux nourris avec un régime HL monotone présentent une augmentation du poids par rapport aux animaux nourris avec un régime standard (Harris *et al.*, 1998; Legendre & Harris, 2006), cette augmentation étant due à une augmentation de tissu adipeux (Harris *et al.*, 1998;

Michel *et al.*, 2005; Garcia-Diaz *et al.*, 2007) mais aussi parfois à une augmentation de la masse maigre (Harris *et al.*, 1998). Malgré cela, la diminution de la prise alimentaire induite par un stress répété (3 jours) engendre une diminution du gain de poids (Harris *et al.*, 1998; Legendre & Harris, 2006). Lorsqu'il n'y a pas de diminution de la prise alimentaire, il n'y a pas de diminution de poids (Michel *et al.*, 2005; Garcia-Diaz *et al.*, 2007). Au vu du petit nombre d'études concernées, on ne peut pas savoir si, comme pour les régimes standards, la diminution du poids peut survenir sans diminution de prise alimentaire.

Par contre, lorsqu'un choix entre le régime standard et des aliments riches en énergie et palatables est possible, les animaux présentent généralement un poids basal identique aux animaux nourris avec le régime standard mais présentent néanmoins une augmentation de la masse de tissu adipeux (Bell *et al.*, 2002; la Fleur *et al.*, 2005; Fachin *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2009). Les résultats concernant la diminution du poids suite au stress dans le cadre d'une alimentation à choix sont divergents. En effet, certaines études mettent en évidence une diminution plus faible du poids suite à un stress répété ou chronique grâce à la mise à disposition d'un choix d'aliments ou de régimes palatables (Pecoraro *et al.*, 2004; Teegarden & Bale, 2008) alors que d'autres ne montrent aucune différence (Bell *et al.*, 2002; Ulrich-Lai *et al.*, 2007; Fachin *et al.*, 2008).

En somme, le stress induit chez le rongeur une diminution de la prise alimentaire d'aliments standards mais une motivation à consommer des aliments palatables lorsque ceux-ci sont disponibles et ce phénomène se retrouve également chez l'homme. Cette modulation de la prise alimentaire par le stress participe à la modulation du poids mais ne l'explique pas à elle seule.

3. Mécanismes impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids par le stress

Des mécanismes vraisemblablement différents sont impliqués dans l'augmentation de la prise alimentaire induite par des stresseurs de faible intensité, la diminution de la prise alimentaire induite par des stresseurs d'intensité moyenne à élevée dans le cadre d'un régime standard monotone et dans l'augmentation de la consommation d'aliments palatables suite au stress.

3.1. Augmentation de la prise alimentaire suite à l'exposition à un stresseur de faible intensité

Le stress de pincement à la queue entraîne une augmentation transitoire et brève de la prise alimentaire et il semble que les systèmes opioïdergiques et dopaminergiques soit impliqués dans cette hyperphagie puisque l'injection d'antagonistes de ces peptides bloquent cet effet (Antelman & Szechtman, 1975; Morley *et al.*, 1983; Samarghandian *et al.*, 2003).

L'exposition au stress induit une augmentation de la libération d'α-MSH au niveau central et périphérique (Liu *et al.*, 2007). Or l'α-MSH est un peptide satiétogène (Cone, 2005). Il a été mis en évidence qu'un stresseur de faible intensité, le stress de manipulation, induit une augmentation des taux et de l'affinité d'auto-anticorps réactifs à l'α-MSH et cette augmentation est corrélée avec une augmentation de la prise alimentaire (Sinno *et al.*, 2009). Il est suggéré que l'augmentation de l'affinité de ces anticorps puissent inhiber les réponses comportementales induites par l'α-MSH grâce à une neutralisation de cette dernière (Sinno *et al.*, 2009), expliquant l'augmentation de la prise alimentaire induite par le stress de manipulation (Badiani *et al.*, 1996). Le fait qu'un stresseur faible induise une augmentation des auto-anticorps réactifs à l'α-MSH chez le rat ainsi que la modification de la quantité de ces anticorps chez des patients atteints de troubles du comportement alimentaire pourraient suggérer une possible relation entre le stress et l'apparition de ces pathologies (Fetissov *et al.*, 2002; Fetissov *et al.*, 2008).

3.2. Diminution de la prise alimentaire induite par le stress

La diminution de la prise alimentaire induite par le stress est principalement régulée par le CRF, acteur principal de l'axe corticotrope et neuropeptide anorexigène. Toutefois, d'autres mécanismes impliqués dans la réponse de stress sont susceptibles d'induire une inhibition de la prise alimentaire.

3.2.1. Le CRF

3.2.1.1. Le CRF : un neuropeptide anorexigène

Les corps cellulaires de neurones CRF sont principalement présents dans le PVN et le noyau central de l'amygdale et de nombreuses projections vers l'hypothalamus, le tronc cérébral, le NTS et le LC/NA existent (Heinrichs & Richard, 1999; Richard *et al.*, 2002). Les récepteurs au CRF (CRF1 et CRF2) sont également largement exprimés à travers tout le système nerveux central. Cette large distribution va de paire avec les nombreuses fonctions de ce peptide (*cf.* I.A.3.2.4.1). Le CRF est un neuropeptide anorexigène et il participe plus particulièrement à

l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress. Il a été mis en évidence que l'injection intracérébroventriculaire (icv) de CRF induit une diminution de la prise alimentaire (Krahn *et al.*, 1990; Benoit *et al.*, 2000) et que l'anorexie induite par un stress aigu peut être évitée par l'administration icv d'antagonistes aux récepteurs du CRF (Krahn *et al.*, 1986; Smagin *et al.*, 1999). Les sites d'action de l'effet anorexigène du CRF ne sont pas entièrement déterminés mais le PVN, l'ARC et le noyau ventromédial de l'hypothalamus semblent être impliqués (Heinrichs & Richard, 1999). L'injection centrale d'antagonistes sélectifs du CRF1 et du CRF2 annule la diminution de la prise alimentaire induite par le stress (Hotta *et al.*, 1999; Pelleymounter *et al.*, 2000; Cullen *et al.*, 2001; Sekino *et al.*, 2004) suggérant une implication des 2 récepteurs dans l'hypophagie liée au stress. Le CRF1 est principalement exprimé dans le PVN et l'ARC tandis que CRF2 est exprimé dans le noyau ventromédial de l'hypothalamus, le NTS et l'area postrema (Van Pett *et al.*, 2000), tous ces sites étant impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire.

3.2.1.2. Voies d'action de l'effet anorexigène du CRF

Bien que les voies d'action de l'effet anorexigène du CRF ne soient pas clairement déterminées, plusieurs hypothèses existent grâce notamment à l'utilisation d'antagonistes de CRF.

Les neurones POMC et NPY de l'ARC présentent d'importantes projections vers les neurones CRF du PVN et réciproquement (Fekete *et al.*, 2000). L'effet anorexigène du CRF semble en partie résulter d'un contrôle inhibiteur des neurones NPY. En effet, l'effet orexigène du NPY est atténué par l'administration centrale de CRF (Morley *et al.*, 1987) et l'injection d'antagonistes non spécifiques des récepteurs au CRF dans le PVN potentialise significativement la stimulation de la prise alimentaire induite par l'injection de NPY dans le même noyau (Heinrichs *et al.*, 1993). Le système mélanocortique semble également impliqué dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress. Ainsi, les neurones POMC de l'ARC sont activés suite à un stresseur psychologique et l'injection d'antagonistes des récepteurs aux mélanocortines atténue l'inhibition de la prise alimentaire liée au stress suggérant un rôle des neurones POMC dans l'anorexie induite par le stress (Vergoni *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2007). L'ARC est pourvu de récepteurs CRF1 et les neurones CRF de nombreuses régions projettent vers l'ARC près des neurones POMC (Tranchand-Bunel *et al.*, 1987; Mountjoy *et al.*, 1994; Heinrichs & Richard, 1999) suggérant une modulation des neurones POMC de l'ARC par le CRF (Heinrichs & Richard, 1999). Toutefois il est également possible que le CRF soit un médiateur du système mélanocortique car les neurones CRF du PVN possèdent des récepteurs MCR4 (Bloom *et al.*, 1982) et sont innervés par les terminaisons nerveuses sécrétant de l'α-

MSH (Liposits *et al.*, 1988). En outre, l'injection d'antagonistes des récepteurs au CRF limite l'effet anorexigène d'agonistes des mélanocortines (Lu *et al.*, 2003).

L'oxytocine est un neuropeptide exprimé dans la zone magnocellulaire du PVN et du noyau supraoptique de l'hypothalamus. L'oxytocine possède des effets centraux anorexigènes (Hillebrand *et al.*, 2002) et influence la vidange gastrique et la mobilité gastro-intestinale (Rogers & Hermann, 1987; Mizuno *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 2000). Les récepteurs CRF1 et 2 sont exprimés dans les neurones oxytocine du PVN et du noyau supraoptique (Arima & Aguilera, 2000) et il a été mis en évidence qu'un traitement par des antagonistes de l'oxytocine bloque les effets anorexigènes du CRF (Olson *et al.*, 1991). L'oxytocine pourrait donc être un médiateur de l'effet hypophagique du CRF.

De plus, l'inhibition du système parasympathique par le CRF est à l'origine d'une inhibition de la vidange gastrique (Stengel & Tache, 2009) pouvant induire des signaux de rassasiement intégrés par le NTS (Traub *et al.*, 1996; Willing & Berthoud, 1997; Rinaman *et al.*, 1998). Le relâchement du muscle lisse gastro-intestinal grâce à l'adrénaline et la diminution conséquente de l'activité motrice du tube digestif (Pocock & Richards, 2004) participe également à ce phénomène.

Le CRF intervient également dans la régulation de la dépense énergétique notamment par une augmentation de la température corporelle. La thermogénèse est régulée par l'oxydation mitochondriale au sein du tissu adipeux brun, par le rythme cardiaque et par la contraction des muscles squelettiques grâce à l'activation d'efférences sympathiques spécifiques par des neurones thermosensibles du système nerveux central (Morrison *et al.*, 2008). L'injection de CRF entraîne une augmentation de la thermogénèse grâce à une action cardiaque et au niveau du tissu adipeux brun (LeFeuvre *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 2001; Cerri & Morrison, 2006). Cette action semble être régulée au niveau du noyau dorsomédial et de la région préoptique de l'hypothalamus (Cerri & Morrison, 2006). En plus d'augmenter la dépense énergétique, la thermogenèse est synonyme d'une élévation de la température corporelle, pouvant contribuer à la sensation de satiété (Brobeck, 1997).

3.2.2. La noradrénaline centrale

La noradrénaline libérée centralement par les neurones du système LC/NA suite au stress est susceptible d'inhiber la prise alimentaire (Halford, 2001). L'activation des neurones

noradrénergiques au niveau du NTS pourraient participer à la médiation de l'effet anorexigène de la CCK au niveau du NTS (Grill & Smith, 1988; Rinaman, 2003).

3.2.3. Augmentation du glucose plasmatique

Le stress entraîne une augmentation du glucose plasmatique grâce à une augmentation de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse par la libération périphérique d'adrénaline (Nonogaki, 2000) et de glucocorticoïdes (Sapolsky *et al.*, 2000). L'ARC est sensible aux concentrations de glucose circulant (Ibrahim *et al.*, 2003) et une augmentation du glucose plasmatique active les neurones POMC (Cone *et al.*, 2001) et/ou inhibe les neurones NPY (Burdakov *et al.*, 2005; Fioramonti *et al.*, 2007) menant à l'hypophagie.

3.2.4. Interactions du système de stress avec des peptides impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire

De nombreuses études ont mis en évidence des liaisons entre le système de régulation centrale du stress et des neuropeptides impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire sans pour autant toujours démontrer un rôle précis dans la modulation de la prise alimentaire par le stress.

La MCH orexigène induit une activation de l'axe corticotrope (Hervieu, 2003). Une injection centrale de MCH entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques basales d'ACTH (Jezova *et al.*, 1992) et le CRF induit *in vitro* une inhibition de la MCH (Parkes & Vale, 1992).

Une interaction entre le CRF et le système de contrôle de la prise alimentaire par la ghréline existe également. Les afférences des neurones CRF exprime la ghréline (Cowley, 2003) et des injections périphériques et centrales de ghréline induisent une augmentation de l'expression hypothalamique de CRF (Asakawa *et al.*, 2001; Johnstone *et al.*, 2005). De plus des interactions fonctionnelles du CRF et de la ghréline au niveau de la mobilité gastro-intestinale ont été mises en évidence (Asakawa *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005).

La leptine entraîne une augmentation de la libération, de la concentration et de l'expression d'ARNm codant le CRF dans le PVN (Huang *et al.*, 1998) et un traitement aux antagonistes du CRF entraîne une atténuation de l'effet inhibiteur de la leptine sur la prise alimentaire (Gardner *et al.*, 1998; Uehara *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 2001) suggérant un rôle important du CRF dans le contrôle de la prise alimentaire par la leptine. De plus, les glucocorticoïdes induisent une augmentation de la libération de leptine (Miell *et al.*, 1996; Spinedi & Gaillard, 1998; Kyrou *et al.*, 2006) pouvant alors participer à l'effet hypophagique du stress.

L'adrénaline périphérique et la noradrénaline libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques induisent une inhibition de la libération d'insuline par le pancréas (Campfield & Smith, 1983; Zakrzewska *et al.*, 1999; Nonogaki, 2000). Par contre les glucocorticoïdes peuvent induire une augmentation de l'insuline plasmatique (Strack *et al.*, 1995; Zakrzewska *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2000; la Fleur *et al.*, 2004). Ces actions contradictoires expliquent les effets contradictoires du stress sur les concentrations plasmatiques d'insuline avec parfois une augmentation (Ricart-Jane *et al.*, 2002; Rai *et al.*, 2003a), une diminution (Makino *et al.*, 2000; Romeo *et al.*, 2007a; Diane *et al.*, 2008) ou aucun effet (Rebuffe-Scrive *et al.*, 1992; Garcia-Diaz *et al.*, 2007). Ainsi, dans le cadre d'une augmentation de l'insuline suite au stress, cette hormone pourrait également participer à l'hypophagie liée au stress.

3.2.5. Particularités du stress par injection de LPS

Il est à noter que l'injection de LPS induit une anorexie dont l'origine est apparemment différente de celle induite par un autre stresseur. Ainsi, il semble que les cytokines pro-inflammatoires libérées périphériquement suite à une injection de LPS chez le rat ou la souris (Konsman *et al.*, 2008) soient les régulateurs de l'anorexie induite par le LPS. Les mécanismes par lesquels les cytokines pro-inflammatoires agissent au niveau central pour moduler la prise alimentaire ne sont pas encore totalement élucidés mais il est possible que cet effet passe par l'intermédiaire de l'activation de l'enzyme cyclooxygenase-2 au niveau des cellules épithéliales de la barrière hémato-encéphalique par les cytokines et par la libération centrale consécutive de prostaglandines E2 (PGE2). Les PGE2 pourraient ensuite, via l'activation de neurones sérotoninergique du noyau raphé, activer les neurones POMC de l'ARC et induire une diminution de la prise alimentaire (Asarian & Langhans, 2010).

3.3. Diminution de la réponse de stress par l'ingestion d'aliments palatables

Tout comme la consommation de drogues, l'ingestion d'aliments palatables active les centres de l'hédonisme que sont le noyau accumbens et le noyau central de l'amygdale et la libération de dopamines, d'opioïdes et d'endocannabinoïdes au niveau central (Kelley *et al.*, 2005; Cota *et al.*, 2006). La stimulation répétée des voies de l'hédonisme par des aliments palatables pourrait engendrer des adaptations neurobiologiques augmentant la fréquence des pulsions alimentaires (Kelley *et al.*, 2000; Volkow & Wise, 2005). L'accès limité à ces aliments semble renforcer cet effet avec une augmentation de la consommation et une augmentation de la libération de dopamine (Bello *et al.*, 2003; Rada *et al.*, 2005). L'activation de l'axe corticotrope en cas de stress entraîne, entre autre, une libération de dopamine et d'opioïdes (Kalivas & Duffy, 1995;

Barrot *et al.*, 1999; Drolet *et al.*, 2001; Tsigos & Chrousos, 2002) permettant de limiter la réponse de stress. Ainsi, l'ingestion d'aliments palatables pourrait potentialiser cet effet et atténuer la réponse de stress grâce à une libération soutenue d'opioïdes et de dopamine (Nanni *et al.*, 2003; Adam & Epel, 2007).

Le stress entraîne une augmentation de la libération et de la synthèse de sérotonine au niveau central (Chaouloff *et al.*, 1999). Bien que le rôle exact de la sérotonine dans le stress ne soit pas clairement défini, il semble que la sérotonine participe à la réponse adaptative du stress notamment à l'état d'éveil et à l'activité induits par le stress (Chaouloff *et al.*, 1999). Beaucoup d'aliments palatables sont riches en glucides et pauvres en protéines or il est possible que ces aliments permettent un apport central préférentiel en tryptophane, acide aminé précurseur de la sérotonine. Avec de tels aliments, le taux plasmatique d'insuline est élevé, or l'insuline induit une redirection des acides aminés neutres à longue chaîne (AALC) vers les muscles squelettiques à l'exception du tryptophane qui est alors disponible pour le cerveau (Fernstrom & Wurtman, 1971; Curzon *et al.*, 1985; Wurtman, 1987). Avec un aliment riche en protéines, le taux plasmatique d'insuline n'est pas élevé et le ratio tryptophane sur AALC disponible pour le cerveau est faible. L'apport de tryptophane au niveau central pourrait permettre d'optimiser les fonctions sérotoninergiques et donc d'optimiser la réponse de stress. Ainsi, l'ingestion d'aliments palatables riches en glucides et pauvres en protéines pourrait participer à faciliter la réponse sérotoninergique du stress.

Le nerf vague peut également être activé par l'ingestion de glucides (Mei, 1978) ou de lipides (Randich *et al.*, 2001) et cette activation peut induire une activation de noyaux centraux. Ainsi, en plus d'activer les centres de l'hédonisme, l'ingestion d'aliments palatables activent de nombreux noyaux centraux impliqués dans la régulation de l'axe corticotrope comme le NTS, l'aire ventrale tégmentaire et le cortex préfrontal (Pecoraro & Dallman, 2005; Warne *et al.*, 2007). Ces régions peuvent agir sur le PVN de l'hypothalamus et moduler l'expression de CRF et par conséquent la réponse de stress. Lors d'un choix alimentaire, l'ingestion d'aliments palatables peut être plus épisodique que par rapport à un régime monotone, et cela pourrait induire des réponses vagales et donc centrales différentes comme par exemple des signaux renseignant une disponibilité énergétique suffisante pour répondre au stress (Warne, 2009).

3.4. Rôles des glucocorticoïdes dans la stimulation de la prise alimentaire induite par le stress

Les glucocorticoïdes modulent la prise alimentaire car l'absence de glucocorticoïdes endogènes induit par surrénalectomie entraîne une diminution de prise alimentaire (Cohn *et al.*,

1955; King *et al.*, 1983; Dallman *et al.*, 1995; Santana *et al.*, 1995; Bhatnagar *et al.*, 2000; la Fleur *et al.*, 2004) et l'administration de glucocorticoïdes entraîne une augmentation de la prise alimentaire (Tataranni *et al.*, 1996; Zakrzewska *et al.*, 1999). Mais les glucocorticoïdes semblent préférentiellement induire une ingestion d'aliments palatables (Dallman *et al.*, 2004b; Warne, 2009).

3.4.1. Existence de 2 voies de contrôle de la prise alimentaire par les glucocorticoïdes

Des études utilisant des rats surrénalectomisés ont mis en évidence que l'absence de glucocorticoïdes endogènes induit une légère diminution de la prise alimentaire d'aliments standards pouvant être renversée par un apport systémique de glucocorticoïdes (Cohn *et al.*, 1955; King *et al.*, 1983; Santana *et al.*, 1995). Des rats surrénalectomisés ayant le choix entre un régime standard et du saindoux (la Fleur *et al.*, 2004), du saccharose (Bell *et al.*, 2000) ou de la saccharine (Bhatnagar *et al.*, 2000) diminuent préférentiellement leur consommation d'aliments palatables et un traitement aux glucocorticoïdes permet d'augmenter la consommation de saindoux, de saccharose ou de saccharine de manière dose-dépendante (la Fleur *et al.*, 2004).

Ces résultats suggèrent que l'action des glucocorticoïdes sur la prise alimentaire est notamment basée sur une augmentation de la prise alimentaire et sur l'induction de la motivation à manger des aliments palatables (la Fleur, 2006; Dallman, 2009). Des actions similaires des glucocorticoïdes sont également connues concernant des comportements non-alimentaires nécessitant une motivation à l'action comme par exemple la recherche de drogues (Deroche *et al.*, 1997; Goeders, 2002).

La stimulation de la prise alimentaire par les glucocorticoïdes semble donc impliquer à la fois des voies de contrôle homéostatique (augmentation de l'ingestion d'aliments standards) et des voies de contrôle non homéostatique impliquant les voies de l'hédonisme (choix pour les aliments palatables) (Nieuwenhuizen & Rutters, 2008).

3.4.2. Mécanismes homéostatiques de contrôle de la prise alimentaire par les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes induisent une inhibition de l'expression de CRF dans le PVN dont résulte une levée de l'inhibition de la prise alimentaire induite par le CRF (Nieuwenhuizen & Rutters, 2008). De plus, ils agissent au niveau central sur les neurones NPY de l'ARC. Un traitement aux glucocorticoïdes induit une augmentation de l'expression d'ARNm codant le NPY dans l'ARC (Akabayashi *et al.*, 1994; Larsen *et al.*, 1994; Dallman *et al.*, 1995) ainsi qu'une augmentation de l'expression de gène codant le récepteur au NPY, Y1 (Larsen *et al.*,

1994), chez des rats surrénalectomisés mais également une augmentation de l'expression de NPY dans l'hypothalamus chez des rats normaux (Zakrzewska *et al.*, 1999). L'action orexigène des glucocorticoïdes pourrait donc être régulée par une inhibition du CRF induisant une levée de son action anorexigène notamment grâce à une diminution de l'inhibition des neurones NPY et/ou par un effet stimulateur direct des glucocorticoïdes sur les neurones NPY de l'ARC.

Les glucocorticoïdes interagissent également avec l'action et la sécrétion d'insuline. L'administration de glucocorticoïdes chez des rats surrénalectomisés (Strack *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 2000; la Fleur *et al.*, 2004) ou non (Zakrzewska *et al.*, 1999) induit une augmentation de l'insuline plasmatique. De plus, un traitement ou un niveau basal élevé de glucocorticoïdes, comme chez les individus atteints du syndrome de Cushing[21], induit un état de résistance à l'insuline (Chavez *et al.*, 1997; Widjaja *et al.*, 1998; van Dijk *et al.*, 2003; Binnert *et al.*, 2004; Charmandari *et al.*, 2005). L'axe corticotrope interfère également avec la libération de leptine. Les glucocorticoïdes stimulent la libération de leptine (Miell *et al.*, 1996) et un traitement chronique aux glucocorticoïdes (Zakrzewska *et al.*, 1997) induit une résistance à la leptine. Cette résistante à la leptine pourrait être induite indirectement par l'effet des glucocorticoïdes sur l'insuline (Widjaja *et al.*, 1998).

En somme, les glucocorticoïdes induiraient une augmentation de la prise alimentaire via une inhibition du CRF et une stimulation des neurones orexigènes NPY. Cet effet peut être partiellement contrebalancé à court terme par les signaux de satiété que sont l'insuline et la leptine et les effets anorexigènes de l'axe corticotrope (essentiellement le CRF) mais de manière chronique, un taux élevé de glucocorticoïdes induit une résistance à l'insuline et la leptine et une diminution de la libération du CRF altérant ces signaux anorexigènes.

3.4.3. Mécanismes non homéostatiques impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire par les glucocorticoïdes

Les systèmes impliqués dans la réponse de stress interagissent avec les systèmes impliqués dans l'hédonisme (Kyrou *et al.*, 2006). Ainsi, il a été mis en évidence que le stress entraîne une augmentation de la sensibilité aux drogues, comme la cocaïne (Goeders, 2002). Les glucocorticoïdes participent à ce renforcement négatif car la surrénalectomie renverse complètement ces effets (Goeders & Guerin, 1996a) et que l'administration de glucocorticoïdes

[21] Le syndrome de Cushing correspond à une hypercortisolémie chronique causant les principaux symptômes suivants : adiposité viscérale accrue, résistance à l'insuline, dyslipidémie, hypertension et problèmes cardiovasculaires (Nieuwenhuizen AG & Rutters F (2008) The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiol Behav* **94**, 169-177.).

les exagère (Goeders & Guerin, 1996b; Mantsch *et al.*, 1998). La dépendance à la consommation d'aliments palatables peut se rapprocher de la dépendance aux drogues suggérant des mécanismes de régulations similaires (Volkow & Wise, 2005) et une possible interaction entre les glucocorticoïdes, le système de l'hédonisme et l'ingestion d'aliments palatables.

En l'absence de stress, les glucocorticoïdes stimulent l'ingestion d'aliments palatables de façon dose dépendante (Bell *et al.*, 2000; Bhatnagar *et al.*, 2000; la Fleur *et al.*, 2004). Il a été mis en évidence que les glucocorticoïdes pouvaient moduler l'activité et la transmission du système dopaminergique du noyau accumbens (Rivet *et al.*, 1989; Deroche *et al.*, 1995; Barrot *et al.*, 2001; Czyrak *et al.*, 2003; Dallman *et al.*, 2006). Les glucocorticoïdes joueraient donc dans le « wanting » et plus particulièrement la partie inconsciente de la motivation à manger (« incentive salience ») (Dallman *et al.*, 2006; Adam & Epel, 2007; Nieuwenhuizen & Rutters, 2008).

Les glucocorticoïdes sont également susceptibles de moduler le système opioïdergique et les mécanismes du « liking ». Ainsi, une augmentation de l'expression des récepteurs μ aux opioïdes et donc la sensibilité aux opioïdes est modulée par les glucocorticoïdes (Yoshida *et al.*, 2005).

Enfin, les glucocorticoïdes sont impliqués dans les mécanismes de « learning » (Roozendaal *et al.*, 2009). En effet, le stress et les glucocorticoïdes (mais également la noradrénaline) induisent des mécanismes de consolidation de la mémoire au niveau de noyau central de l'amygdale (Roozendaal *et al.*, 1996; Roozendaal *et al.*, 1999; Roozendaal *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2004; Fietta & Fietta, 2007; Roozendaal *et al.*, 2008). Cet effet semble être en partie modulé par l'augmentation de l'expression et la libération de CRF induite par les glucocorticoïdes au niveau du noyau central de l'amygdale (Dallman *et al.*, 2006; Kyrou *et al.*, 2006; Dallman, 2009).

En résumé, les aliments palatables diminuent la réponse de stress probablement grâce à une libération d'opioïdes et de dopamine au niveau central. Cet effet est potentialisé par l'accès limité à ces aliments. Lors du stress, les mécanismes de mémorisation et d'apprentissage (« learning ») permettent d'intégrer cet effet anti-stress des aliments palatables et les glucocorticoïdes libérés lors du stress induisent, grâce à des mécanismes de renforcement, une pulsion (« wanting ») pour ces aliments. La résistance à l'insuline, mais aussi à la leptine, induite par les glucocorticoïdes en cas de stress permet de lever l'inhibition de ces signaux sur le système hédonique (Figlewicz & Benoit, 2009) et grâce à l'augmentation de la sensibilité des mécanismes impliqués dans le « liking », une préférence pour les aliments palatables est induite par les glucocorticoïdes lors du stress.

Le fait de proposer de manière très ponctuelle des aliments palatables (*cf.* I.C.2.2.2.2) lors de tests de courte durée ne permet pas à ces mécanismes de se mettre en place (pas d'apprentissage de l'effet positif sur le stress des aliments palatables) et donc il est cohérent que le stress n'induise pas d'augmentation de la consommation lors de ces tests.

3.5. Stress et modulation du poids

3.5.1. Le stress induit à court terme une diminution du gain de poids

Dans les modèles animaux de stress, les mécanismes induits par un stresseur aigu impliquent une diminution du gain de poids. En effet, les réponses adaptatives que sont la diminution de la prise alimentaire, l'augmentation de la disponibilité en nutriments (grâce à l'effet des catécholamines et des glucocorticoïdes sur la lipolyse et des glucocorticoïdes sur la libération d'acides aminés) ainsi que l'augmentation de la dépense énergétique engendrent une diminution du gain de poids chez les rongeurs. Toutefois, l'apport d'aliments palatables permet, dans certaines conditions, de limiter ou d'éviter la diminution de la prise alimentaire et par conséquent la diminution du gain de poids.

3.5.2. Stress chronique et élévation persistante de glucocorticoïdes

De manière aiguë, les glucocorticoïdes induisent indéniablement une augmentation de la lipolyse (de Mazancourt *et al.*, 1990; Djurhuus *et al.*, 2002), directement (Xu *et al.*, 2009) ou grâce à une augmentation de la lipolyse induite par les catécholamines (Macfarlane *et al.*, 2008). Cependant, l'effet chronique des glucocorticoïdes est moins évident. Les individus atteints du syndrome de Cushing présentent une augmentation de l'adiposité viscérale (Wajchenberg *et al.*, 1995) semblant antagoniste d'un effet lipolytique des glucocorticoïdes.

Tout comme pour l'ingestion d'aliments palatables, l'insuline semble avoir un effet modulateur de l'action lipolytique des glucocorticoïdes (Dallman *et al.*, 2004a). L'insuline est un puissant inhibiteur de la lipolyse au sein du tissu adipeux (Magkos *et al.*) et il a été mis en évidence qu'un niveau élevé d'insuline est susceptible d'inhiber l'effet lipolytique des glucocorticoïdes (Ottosson *et al.*, 2000). L'augmentation chronique des glucocorticoïdes peut être accompagnée d'une augmentation du niveau plasmatique d'insuline (Strack *et al.*, 1995; Zakrzewska *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2000; la Fleur *et al.*, 2004). En outre, les patients atteints du syndrome de Cushing (Widjaja *et al.*, 1998) présentent une hyperinsulinémie pouvant expliquer la modulation de l'effet lipolytique de glucocorticoïdes dans ces conditions.

La lipolyse induite par l'élévation chronique des taux de glucocorticoïdes semble donc être inhibée en présence d'insuline. L'excès de glucocorticoïdes et d'insuline entraîne alors une inhibition de la mobilisation et favorise l'accumulation de lipides soit directement par stimulation de la lipoprotéine lipase soit indirectement par une inhibition de l'effet lipolytique de l'hormone de croissance et des hormones stéroïdes sexuelles (Ottosson *et al.*, 2000; Bjorntorp, 2001). L'effet préférentiel de l'excès chronique de glucocorticoïdes sur l'accumulation de graisse viscérale (Rebuffe-Scrive *et al.*, 1992; Franco-Colin *et al.*, 2000) pourrait résulter d'une augmentation du nombre de cellules par unité de masse, d'une irrigation sanguine plus importante engendrant un apport de glucocorticoïdes plus important et d'un nombre plus élevé de récepteurs GR dans le tissu viscéral par rapport aux tissus périphériques (Leibel *et al.*, 1989; Franco-Colin *et al.*, 2000; Miller & O'Callaghan, 2002).

L'ingestion d'aliments palatables induit une augmentation de la sécrétion d'insuline mais également une augmentation du tissu adipeux viscéral (Bell *et al.*, 2002; la Fleur *et al.*, 2005; Fachin *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2009) optimisant alors les effets de l'excès chronique de glucocorticoïdes.

Les lipides du tissu adipeux viscéral sont utilisés comme source d'énergie pour le cerveau et comme substrats pour la néoglucogenèse hépatique alors que le tissu adipeux périphérique est une source d'énergie préférentielle pour les muscles (Peters *et al.*, 2004). Dallman *et al.* (Dallman *et al.*, 2005) supposent que l'augmentation de l'adiposité viscérale peut être reconnue par le cerveau comme un signal métabolique qui indiquerait une disponibilité de substrats mobilisables en cas de stress important, et induirait alors une réponse de stress diminuée en raison des stocks pré-existants importants.

3.5.3. Implications dans l'obésité chez l'homme

Chez l'homme, l'augmentation de glucocorticoïdes due au stress et la disponibilité d'aliments palatables induit une consommation de ces aliments palatables, permettant de limiter la réponse de stress. L'augmentation de la consommation d'aliments riches en gras et en sucres participent alors à l'augmentation de l'adiposité viscérale induite par l'excès de glucocorticoïdes et d'insuline et l'augmentation d'adiposité viscérale amortie à son tour la réponse de stress (Dallman *et al.*, 2003; Dallman *et al.*, 2005; Dallman *et al.*, 2006; Torres & Nowson, 2007).

Ces effets sont une adaptation de l'évolution pour faire face au de stress. La motivation à manger préférentiellement des aliments riches et le stockage de l'énergie induite par les glucocorticoïdes en cas de disponibilité alimentaire importante est un atout pour affronter les situations de stress futures. Si les aliments ne sont plus autant disponibles, les concentrations

plasmatiques d'insuline sont basses et les glucocorticoïdes mobilisent alors l'énergie stockée (Dallman *et al.*, 2005). Toutefois, dans notre société actuelle, la disponibilité en aliments riches en lipides et en sucres est importante et constante et le niveau de stress perçu est élevé. Dans ces conditions, les effets des glucocorticoïdes ne sont plus bénéfiques mais deviennent délétères car ils résultent en une augmentation de l'adiposité viscérale, à une augmentation de l'insuline menant à une obésité pathologique (Bjorntorp, 2001).

II. TRAVAUX PERSONNELS

OBJECTIFS DES TRAVAUX PERSONNELS

Ce travail de thèse a été initié dans le but d'objectiver chez le rat l'effet anti-stress d'un extrait de levure appelé exl2006 et commercialisé par la société Lesaffre Feed Additive en tant que complément alimentaire nutritionnel pour les porcs et les volailles. Avant le début de ce travail, cet extrait de levure a montré des propriétés anti-stress lors d'études chez la poulette et le rat. En effet, l'administration de l'exl2006 à des poulettes futures pondeuses a permis de limiter le phénomène de picage induit par les stress chroniques de retrait de la litière et de restriction alimentaire. De même, l'administration de l'exl2006 à des rats mâles Wistar a permis de supprimer l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu de nage forcée sans avoir d'effet sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone[22].

L'exl2006 ayant montré dans les études antérieures, un effet particulier sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress, il nous a semblé pertinent d'utiliser, dans un premier temps, ce paramètre comme marqueur principal de stress dans le cas des modèles aigus de stress de nage forcée et de contention. Cependant l'effet anti-stress de l'exl2006 n'étant pas probant, de nouveaux modèles de stress se rapprochant de ceux appliqués chez la poule ont été mis en place. Chez la poule, les stresseurs testés ont induit une augmentation du picage. Or le picage est un phénomène social orienté vers les congénères et pouvant être dépendant de la hiérarchie établie au sein de l'élevage. Le modèle de stress de défaite sociale a donc été choisi afin d'intégrer une composante sociale dans l'étude de l'effet anti-stress de l'exl2006 chez le rat. Enfin, les stresseurs appliqués chez la poule étant chroniques, nous avons développé un modèle de stress chronique chez le rat.

Parallèlement aux études concernant directement l'effet anti-stress de l'exl2006, l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress et les mécanismes sous-jacents ont été étudiés. En effet, afin d'étudier l'effet d'un produit potentiellement anti-stress sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress, il est important d'en caractériser l'effet dans différents modèles de stress. En outre, nous avons vu que la relation entre le stress et la prise alimentaire participe au développement du surpoids et de l'obésité chez l'homme. La compréhension des modulations de la prise alimentaire induite par le stress grâce à des modèles chez le rongeur est une étape nécessaire dans la compréhension des mécanismes à l'origine de cette relation complexe. Nous avons vu que chez le rongeur, la prise alimentaire est modifiée en fonction de l'intensité du

[22] Thèse d'Abdoulaye Diane « Stress, axe corticotrope et caractéristiques nutritionnelles et métaboliques », 2006.

stress et du choix alimentaire proposé. La réponse immédiate à un stresseur, dans le cadre d'une alimentation standard monotone, est une diminution de la prise alimentaire. Cette anorexie induite par le stress est mise en évidence lors de nombreux modèles de stress aigus et chroniques chez le rat et la souris, mais les mécanismes à l'origine de celle-ci ne sont pas encore clairement identifiés.

La première partie des travaux de cette thèse vise à valider les différents modèles de stress mis en place et à étudier l'inhibition de la prise alimentaire induite par ces différents paradigmes de stress d'un point de vue quantitatif et mécanistique. Dans la seconde partie des travaux, les résultats concernant l'effet anti-stress de l'exl2006 lors de l'application des modèles de stress décrits précédemment sont présentés.

A. ETUDE DE L'INHIBITION DE LA PRISE ALIMENTAIRE INDUITE PAR LE STRESS CHEZ LE RAT

1. Introduction

Dans le cadre d'un régime standard monotone, un stress aigu (Meerlo *et al.*, 1996c; Rybkin *et al.*, 1997; Diane *et al.*, 2008) ou chronique (Armario *et al.*, 1984; Armario *et al.*, 1990; Marti *et al.*, 1994) inhibe la prise alimentaire chez le rat. Néanmoins, les mécanismes précis responsables de cette inhibition ne sont pas complètement élucidés. Notre objectif est donc d'étudier l'effet de différents modèles de stress sur l'inhibition de la prise alimentaire chez le rat et de comprendre quels en sont les mécanismes.

Afin d'étudier l'effet anti-stress de l'exl2006, nous avons développé 3 modèles de stress aigus et un modèle de stress chronique. Parmi les modèles de stress aigus, nous avons étudié 2 stresseurs psychologiques, la nage forcée et la contention[23], et un stresseur social, la défaite sociale. En cas de stress chronique, l'habituation au stress peut entraîner une diminution de l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress (Krahn *et al.*, 1990; Dal-Zotto *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2008). Le modèle de stress chronique variable (SCV)

[23] Les expérimentations concernant l'effet du stress aigu de contention et du stress aigu de nage forcée sur la modulation de la prise alimentaire ont fait l'objet d'un article présenté en annexe 2 et en cours de soumission.

consistant à appliquer de manière aléatoire une variété de stress d'intensité moyenne permet d'éviter cette habituation. En tant que modèle de la dépression humaine, ce modèle a largement été étudié chez le rongeur. Bien qu'il induise une diminution systématique du gain de poids (Kim *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2007), l'impact du SCV sur la prise alimentaire a peu été étudié[24].

Après validation des modèles de stress grâce à l'utilisation de marqueurs de stress classiques (concentrations plasmatiques de corticostérone, d'ACTH, de glucose, niveau d'anxiété), nous avons déterminé leurs effets sur la prise alimentaire. Généralement, l'évaluation des modulations de la prise alimentaire suite à l'exposition à un stresseur est réalisée uniquement de manière quantitative (mesures des quantités ingérées). Or une analyse qualitative permet d'apporter des éléments importants pour la compréhension des mécanismes de contrôle du comportement alimentaire. Ainsi, pour les modèles de stress aigus de nage forcée et de contention, après avoir mis en évidence une inhibition de la prise alimentaire induite par le stress, la prise alimentaire est mesurée en continu afin de construire les profils de prise alimentaire et de structure des repas. De plus, lors de la 1ère heure de prise alimentaire suite au stress, la séquence comportementale de satiété est déterminée. Pour des contraintes de temps, nous n'avons pas évalué la séquence comportementale de satiété et les profils de structure des repas pour le stress aigu de défaite sociale et le SCV. Le CRF semble jouer un rôle prépondérant dans la relation entre stress et prise alimentaire puisque c'est le premier acteur de l'activation de l'axe corticotrope dans la réponse de stress et que son action anorexigène est impliquée dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress. Les neurones NPY/AgRP et POMC de l'ARC sont parmi les acteurs principaux du contrôle central de la prise alimentaire et leur implication dans la modulation du comportement alimentaire par le stress reste à approfondir. Les rôles de la leptine et de l'insuline sont également à déterminer. En effet, l'insuline et la leptine constituent des régulateurs de l'homéostasie énergétique dont l'effet est relayé par les neurones POMC et NPY/AgRP de l'ARC et il a été mis en évidence des interrelations entre la leptine et le CRF. Dans chacun des modèles de stress, les expressions hypothalamiques de CRF, de NPY et de POMC et les concentrations plasmatiques de leptine et d'insuline sont donc évaluées.

[24] L'expérimentation concernant l'effet du SCV sur la modulation de la prise alimentaire et le poids a fait l'objet d'un article présenté en annexe 3 et en cours de soumission.

2. Matériels et méthodes

2.1. Animaux et régimes

Des rats Wistar mâles (Harlan, Ganat, France) sont installés en cages individuelles dans une pièce d'hébergement à la température (23 ± 1 °C) et l'humidité régulées (55 ± 3 %). La mise en cage individuelle permet de mesurer de manière précise la prise alimentaire de chaque rat. Le poids des animaux à l'arrivée au laboratoire est compris entre 275 et 300 g excepté pour les animaux inclus dans l'étude sur le modèle de stress de défaite sociale où le poids des animaux est compris entre 200 et 225 g. Pour ce modèle, les animaux stressés sont confrontés à des animaux dominants plus gros et un poids plus faible des animaux stressés permet de garantir cette dominance. Pour les modèles de stress aigus, le cycle lumineux 12 h/12 h est inversé afin de pouvoir appliquer le stress et réaliser des mesures régulières de prise alimentaire durant la période nocturne. Pour le modèle de SCV, le cycle lumineux est maintenu normal puisque la prise alimentaire est mesurée uniquement sur 24 h et les différents stresseurs sont appliqués aléatoirement le jour ou la nuit.

Les animaux sont nourris avec un régime monotone standard appelé « P14 » (Tableau 4). Ce régime standard AIN 93M (Reeves *et al.*, 1993; Bensaid *et al.*, 2003) est supplémenté en minéraux et vitamines et fournit 14,6 kJ/g (UPEA, INRA, Jouy-en-Josas, France). Il contient 14 % de l'énergie sous forme de protéines, 76 % sous forme de glucides et 10 % sous forme de lipides.

Tableau 4. Composition et valeur énergétique du régime standard « P14 ».

Ingrédients (g/kg)	
Protéines totales de lait	140
Saccharose	100
Amidon	622
Sels minéraux AIN 93M	35
Vitamines AIN 93M	10
Huile de soja	40
Cellulose	50
Choline	2,3
Total	1000
Valeur énergétique (kJ/g)	14,6
P/E	14
L/E	10
G/E	76

Le régime est fourni sous forme semi-liquide (eau/régime en poudre, 1:1) pour minimiser le gaspillage et les mangeoires sont remplies quotidiennement avec de la nourriture fraîche. Le régime est disponible *ad libitum*, excepté durant les 2 h précédant l'exposition au stresseur et pendant l'exposition en elle-même dans le cas des modèles de stress aigus. Pour le modèle de SCV, le régime est disponible *ad libitum*. L'eau est fournie *ad libitum*.

Les rats sont adaptés aux conditions du laboratoire et au protocole alimentaire durant 10 jours avant le début des expérimentations.

2.2. Modèles de stress

Trois modèles de stress aigus et un modèle de stress chronique sont étudiés grâce à plusieurs expérimentations. Dans chaque expérimentation, chaque groupe d'animaux est divisé en 2 sous-groupes : stressé et témoin non stressé. Chaque modèle de stress a donc un groupe témoin qui lui est propre. Pour les modèles de stress aigus, le stress est appliqué 30 min après le début de la phase nocturne.

2.2.1. Le stress de nage forcée

Le protocole de stress de nage forcée utilisée est une version modifiée du protocole de Diane *et al.* (Diane *et al.*, 2008) déjà mis en place au laboratoire. Le stress de nage forcée consiste à placer les rats durant 10 min dans un bac d'eau à 25 °C installé dans une pièce différente de leur pièce d'hébergement et en période nocturne (Figure 18). Les rats sont ensuite soigneusement séchés à l'aide d'une serviette avant d'être ramenés dans leur cage. Les animaux non stressés sont laissés dans leur cage sans nourriture ni eau jusqu'au retour des animaux stressés.

2.2.2. Le stress de contention

Notre modèle de stress de contention est basé sur celui de Harris *et al.* (Harris *et al.*, 2002b). Le stress de contention consiste à placer les rats dans une boîte cylindrique en plastique perforé (6 × 20 cm) durant 3 h dans une pièce différente de leur pièce d'hébergement et en période nocturne (Figure 20). Les animaux non stressés sont placés individuellement dans une cage en plexiglas durant 3 h sans eau ni nourriture, dans une pièce différente de leur pièce d'hébergement et de celle des animaux stressés, en période nocturne. A la fin des 3 h de contention, tous les animaux sont ramenés dans leur cage.

2.2.3. Le stress de défaite sociale

Le stress de défaite sociale utilise le paradigme de résident/intrus. Un rat à stresser, appelé rat intrus, est placé dans la cage d'un rat plus gros et ayant marqué son territoire, appelé rat résident. Le résident a été entraîné à mettre d'autres rats en défaite sociale en quelques minutes. Nous avons étudié le modèle de stress de défaite sociale en modifiant la version décrite par Meerlo *et al.* (Meerlo *et al.*, 1997).

2.2.3.1. Entraînement et sélection des rats résidents

Les rats résidents sont de gros rats Wistar mâles (> 500 g), ce sont des rats de réformes issus d'études précédentes. Ils sont hébergés dans une grande cage en Plexiglas placée dans une pièce différente de celle des rats intrus en cycle lumineux 12 h/12 h inversé et nourris *ad libitum* avec des croquettes. Ces animaux sont hébergés en couple avec une femelle afin d'augmenter leur agressivité face à l'intrusion d'un autre rat sur leur territoire. Lors d'une étude préliminaire, les rats résidents sont entraînés à mettre en défaite sociale des rats intrus naïfs plus jeunes et plus petits. Chaque jour pendant 3 semaines, les femelles sont retirées des cages des rats résidents et un rat intrus y est placé durant 5 min. Seuls les rats résidents mettant en défaite sociale les rats intrus dans ce laps de temps sont sélectionnés. La défaite sociale se caractérise par l'attaque du rat intrus par le rat résident sous forme de morsures dans le dos et le cou puis par l'attitude de soumission du rat intrus. L'attitude de soumission est reconnaissable à la posture allongée sur le dos et immobile du rat intrus (Figure 28A). Nous considérons que la défaite sociale du rat intrus est effective lorsqu'il est immobile sur le dos durant au moins 5 s (Nikulina *et al.*, 2005; Barnum *et al.*, 2007).

2.2.3.2. Le stress de défaite sociale

A partir de 15 min avant l'application du stress et jusqu'à la fin de celui-ci, les femelles des rats résidents sont enlevées de la cage. Chaque rat intrus à stresser est placé dans une cage de résident. Les rats intrus sont mis en défaite sociale en 143 ± 24 s en moyenne. Lorsque la défaite sociale est caractérisée, le rat intrus est placé dans une petite cage métallique à barreaux et cette cage est placée dans la cage du résident pour environ 1 h (le temps total de la mise en défaite sociale et du temps passé dans la cage à barreaux est de 1 h ; Figure 28B). Cette séparation permet des contacts olfactifs, auditifs et visuels mais protège des contacts physiques pouvant blesser les animaux. Après 1 h, les rats intrus sont ramenés dans leur cage.

Les duos résident/intrus sont différents lors de chaque application du stress. Les rats témoins non stressés sont brièvement manipulés puis laissés dans leur cage sans nourriture ni eau durant

le stress de défaite social. Deux jours avant l'application du stresseur, les cages des rats résidents ne sont pas changées afin qu'ils puissent marquer leur territoire.

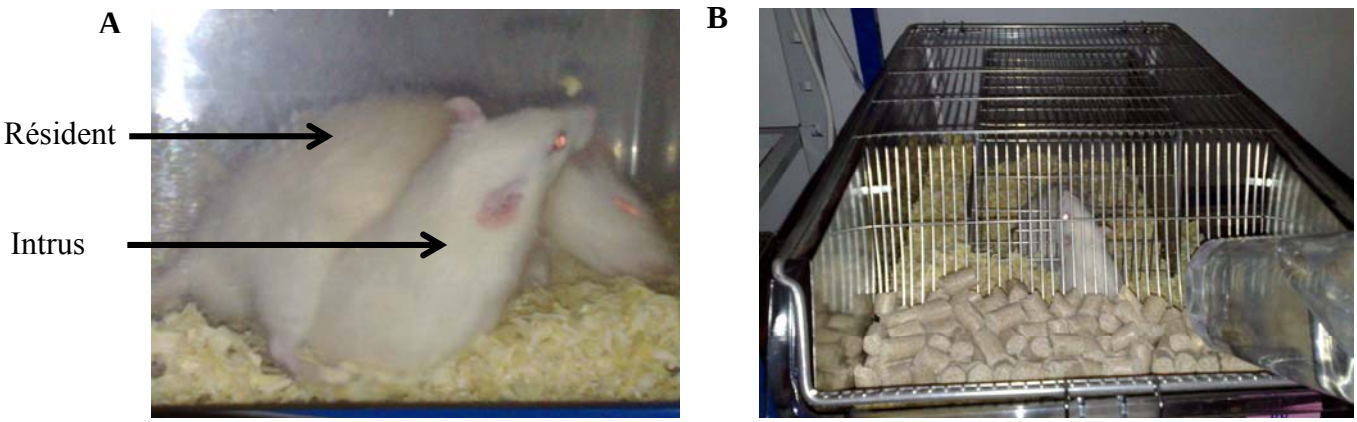


Figure 28. Illustrations d'un stress de défaite sociale chez le rat.

Le rat intrus est mis en défaite sociale par le rat résident lors de la 1ère phase du stress de défaite sociale : on note une attitude de soumission du rat intrus, placé en dessous, par rapport au rat résident (A). Le rat intrus est placé dans une cage métallique dans la cage du rat résident lors de la 2ème phase du stress de défaite (B).

2.2.4. Le stress chronique variable

Le modèle de SCV utilisé est basé sur différents modèles de la littérature (Ortiz *et al.*, 1996; Harro *et al.*, 2001; Ulrich-Lai *et al.*, 2006b; Marin *et al.*, 2007) et adapté aux conditions du laboratoire. Aucun stresseur impliquant une privation de nourriture ou d'eau n'a été inclus puisque nous souhaitions étudier la prise alimentaire.

Durant 13 jours, 1, 2 ou 3 stresseurs sont appliqués de manière aléatoire chaque jour pendant la période nocturne ou la période diurne (Tableau 5). Les stresseurs utilisés sont la contention, la nage forcée dans l'eau froide (18 °C), la nage forcée dans l'eau chaude (25 °C), le changement de cage (le rat est placé dans la cage d'un autre rat), la cage collective/surpopulation (6 rats sont placés dans une cage faite pour 3 rats), la cage collective inclinée (6 rats sont placés dans une cage faite pour 3 rats inclinée de 45 ° par rapport à l'horizontal), la lumière stroboscopique (des flashs de lumière sont émis à une fréquence de 5 flashs/s pendant la phase nocturne), lumière allumée (pendant la phase nocturne) et lumière éteinte (pendant la phase diurne). Chaque stresseur est appliqué selon une durée variable.

Les animaux témoins non stressés sont hébergés dans une pièce différente de celle des animaux stressés car les stresseurs sont appliqués au sein de la pièce d'hébergement.

Tableau 5. Planning du stress chronique variable sur 13 jours.

Jour	Stresseur	Jour	Stresseur
1	Cage collective inclinée 2 h	8	Contention 3 h
	Nage forcée eau froide 5 min		Flash 8 h
	Changement cage 14 h	9	Nage forcée eau chaude 15 min
2	Cage collective/surpopulation 4 h		Lumière off 3 h
	Nage forcée eau chaude 15 min		Cage collective inclinée 3 h
	Lumière on 12 h		Lumière on 12 h
3	Lumière off 2 h	10	Nage forcée eau froide 5 min
	Contention 2 h		Contention 2 h
	Flash 3 h	11	Lumière on 12 h
4	Lumière on 12 h	12	Cage collective inclinée 1 h
5	Cage collective/surpopulation 1 h		Changement cage 15 h
	Flash 4 h		Flash 12 h
6	Nage forcée eau chaude 30 min	13	Contention 3 h
	Contention 2 h		Cage collective/surpopulation 2 h
	Lumière off 3 h		
7	Nage forcée eau froide 5 min		
	Cage collective/surpopulation 2 h		
	Changement cage 14 h		

2.3. Protocoles expérimentaux

2.3.1. Etude des stress aigus de nage forcée et de contention

Ces 2 modèles de stress ont été étudiés de manière semblable et font l'objet d'un article en cours de soumission et présenté en annexe 2. Cette étude est divisée en 2 expériences lors desquelles le stress de nage forcée et le stress de contention sont étudiés grâce à des protocoles similaires, hormis pour les différences inhérentes aux spécificités de chaque stresseur.

2.3.1.1. Validation des modèles de stress et effet du stress aigu sur la prise alimentaire et les neuropeptides impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress

Quarante-huit rats sont inclus pour chaque modèle de stress. Les rats sont divisés en 3 groupes incluant chacun 8 rats stressés et 8 rats témoins non stressé (Figure 29). Dans le 1er groupe, immédiatement après l'exposition au stress, les rats sont soumis au test de l'open field afin d'évaluer leur niveau d'anxiété. Dans le 2ème groupe, les rats sont exposés au stress durant 2 jours consécutifs. La prise alimentaire 1 h (uniquement pour la nage forcée), 3 h, 6 h et 24 h[25] après l'exposition au stress est mesurée (Figure 30). La prise alimentaire est également évaluée

[25] La prise alimentaire à 24 h correspond à la prise alimentaire quotidienne, celle-ci n'est pas exactement mesurée sur 24 h. Toutefois par soucis de simplicité l'expression « prise alimentaire sur 24 h » est utilisée tout au long de ce manuscrit.

durant les 2 jours précédant le stress afin d'obtenir la ligne de base. Le poids et le gain de poids de base et suite au stress sont déterminés. Dans le 3ème groupe, immédiatement après l'exposition au stress, les rats sont euthanasiés par décapitation afin de déterminer les concentrations plasmatiques de corticostérone, d'ACTH, de glucose, d'insuline et de leptine et d'évaluer l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF, la POMC et le NPY.

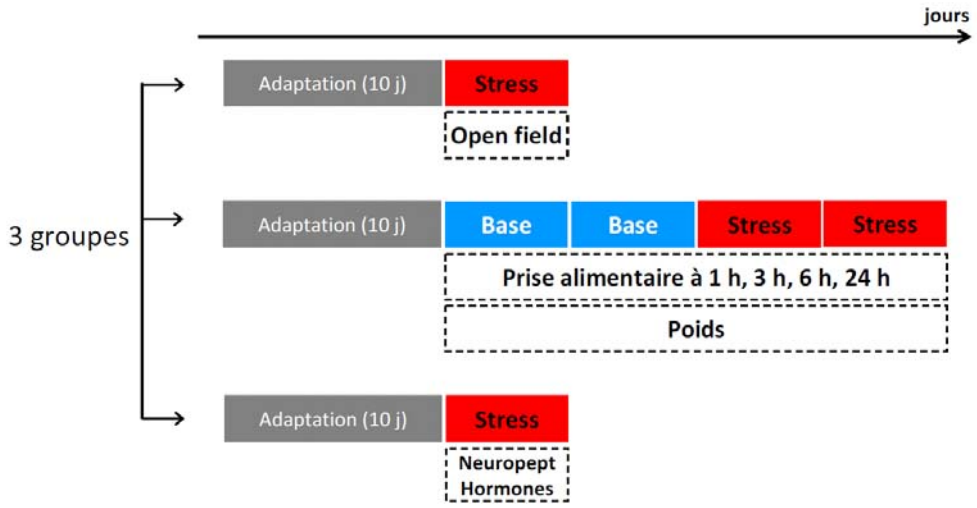


Figure 29. Protocole expérimental pour valider les modèles de stress aigus de contention et de nage forcée et étudier leurs effets sur la prise alimentaire et les neuropeptides impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress.

Neuropept : neuropeptides.

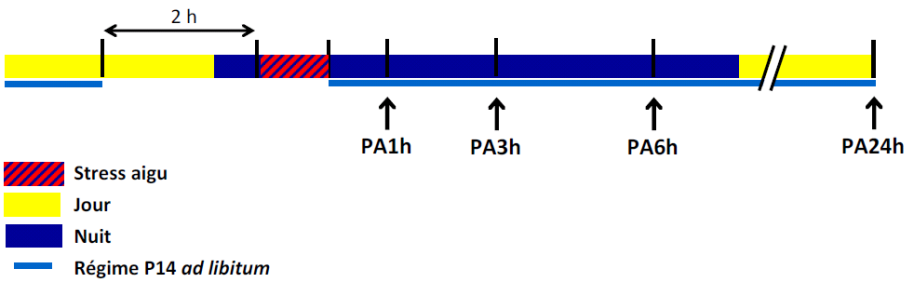


Figure 30. Planning de mesures de la prise alimentaire après l'exposition à un stress aigu de nage forcée, de contention ou de défaite sociale.

2.3.1.2. Effet du stress aigu sur les profils de prise alimentaire et la séquence comportementale de satiété

Quatorze rats sont inclus pour chaque modèle de stress (7 rats stressés et 7 rats témoins non stressés). Les rats sont placés durant 3 jours dans des cages en Plexiglas équipées d'un système d'enregistrement en continu de la prise alimentaire (Figure 31). Les rats sont adaptés à ces nouvelles conditions lors du 1er jour. Lors du 2ème jour, les profils de prise alimentaire de base sont déterminés. Lors du 3ème jour, le stress est appliqué en début de cycle nuit et les profils de

prise alimentaire sont évalués pendant 24 h. En parallèle, la 1ère heure de prise alimentaire après le stress est enregistrée à l'aide d'une caméra vidéo afin d'analyser le comportement des animaux.

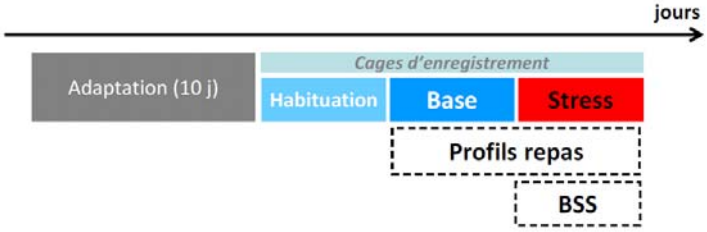


Figure 31. Protocole expérimental pour étudier l'effet des stress aigus de nage forcée et de contention sur les profils de prise alimentaire et la séquence comportementale de satiété.

BSS: séquence comportementale de satiété (« behavioral satiety sequence »).

2.3.2. Etude du stress aigu de défaite sociale

Seize rats sont inclus dans cette étude (8 rats stressés et 8 rats témoins non stressés). Le stress de défaite sociale est appliqué en début de cycle nuit pendant 3 jours consécutifs (Figure 32). Lors du 1er jour, immédiatement après l'exposition au stress, le niveau d'anxiété est évalué grâce au test de l'open field. Lors du 2ème jour, la prise alimentaire 1 h, 3 h, 6h et 24 h après l'exposition au stress (Figure 30) et le poids sont évalués. La prise alimentaire et le poids sont également évalués lors des 2 jours précédant l'exposition au stress afin de déterminer la ligne de base. Lors du 3ème jour, immédiatement après l'exposition au stress, les rats sont euthanasiés par décapitation afin de déterminer les concentrations plasmatiques de corticostérone et d'ACTH et d'évaluer l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF, la POMC et le NPY.

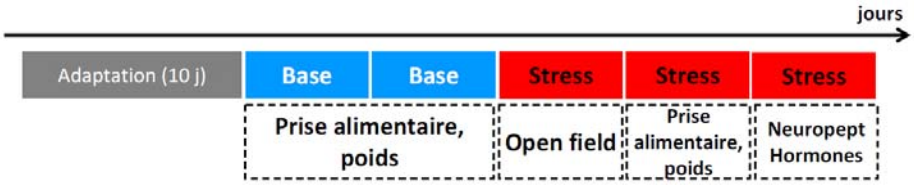


Figure 32. Protocole expérimental pour valider le modèle de stress aigu de défaite sociale et étudier son effet sur la prise alimentaire.

Neuropept : neuropeptides.

2.3.2. Etude du stress chronique variable

Cette étude fait l'objet d'un article en cours de soumission et présenté en annexe 3.

Vingt-quatre rats sont inclus dans cette étude (12 rats stressés et 12 rats témoins non stressés). Deux semaines avant le début du protocole de SCV (ligne de base) et durant les 13 jours d'exposition au SCV, la prise alimentaire sur 24 h et le poids sont évalués quotidiennement

(Figure 33). Douze heures après le dernier stresseur, les rats sont soumis au test d'open field afin d'évaluer leur niveau d'anxiété. Trente-six heures après le dernier stresseur, les animaux sont euthanasiés par décapitation afin de déterminer les concentrations plasmatiques de corticostérone, d'ACTH, d'insuline et de leptine et d'évaluer l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF, la POMC et le NPY. La composition corporelle est également déterminée pour la moitié des animaux (6 rats stressés et 6 rats témoins stressés).

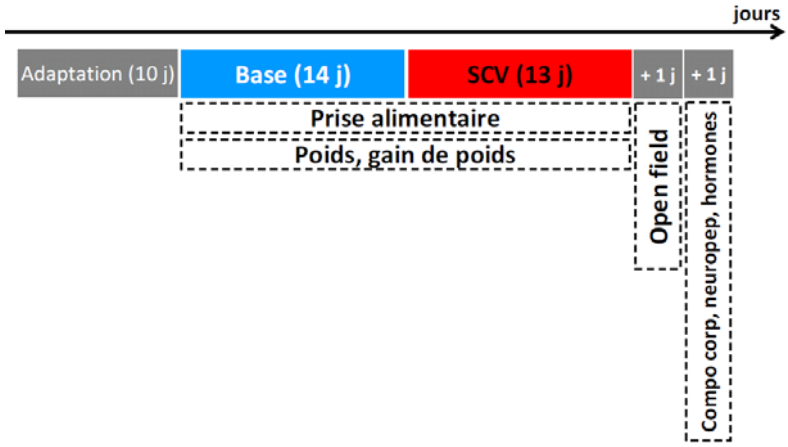


Figure 33. Protocole expérimental pour valider le modèle de stress chronique variable et étudier son effet sur prise alimentaire.

Neuropept : neuropeptides ; compo corp : composition corporelle.

2.4. Variables étudiées

2.4.1. Niveau d'anxiété, test de l'open field

L'open field est un dispositif destiné à évaluer le niveau d'anxiété du rat (Prut & Belzung, 2003). La procédure consiste à soumettre un animal à un environnement inconnu duquel il ne peut pas s'échapper. Il s'agit d'une arène circulaire de 125 cm de diamètre en matière plastique sombre entourée par des parois de 60 cm de hauteur (Figure 34) installée dans une pièce différente de la pièce d'hébergement des animaux mais dont le cycle lumineux est synchronisé avec celle-ci. Le rat est déposé au centre de l'arène puis son comportement est filmé durant 4 min. Lors du visionnage des vidéos, le fond de l'arène de l'open field est virtuellement divisé en différentes cases : un rond central, 4 cases internes autour du centre et 4 cases externes. L'activité du rat est évaluée manuellement à l'aide d'un logiciel d'analyse permettant l'entrée en temps réel de chaque comportement grâce au clavier de l'ordinateur (The Observer XT 9.0). Les paramètres évalués sont les suivants : le nombre de cases traversées, le temps passé dans la zone interne (rond central et cases internes) et la zone externe (cases externes), le nombre de fois où le rat s'est levé sur ses 2 pattes arrière et le temps passé à se toiletter. On considère que le rat est entré dans une case lorsqu'il a mis au moins 3 pattes dans celle-ci.

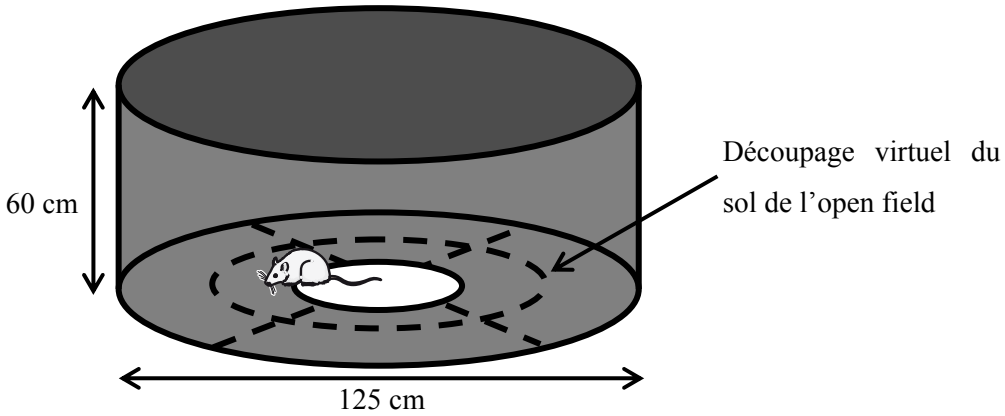


Figure 34. Représentation schématique du dispositif d'open-field vu de profil.

2.4.2. Variables plasmatiques

Les animaux sont euthanasiés par décapitation et le sang du tronc est collecté sur EDTA puis centrifugé à 4 °C. Le plasma est isolé et conservé au congélateur à - 20 °C pour la détermination ultérieure des variables plasmatiques.

Les concentrations plasmatiques de corticostérone et d'ACTH ainsi que les concentrations plasmatiques de leptine et d'insuline sont déterminées grâce à l'utilisation de kits spécifiques (respectivement « Rat stress hormone panel » et « Rat endocrine panel » de Linco Research, St. Charles, MI, USA) sur le système Bioplex 200 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La concentration plasmatique de glucose est déterminée par une méthode de dosage enzymatique utilisant un kit commercial (Glucose RTU™, Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.4.3. Paramètres hypothalamiques

Après décapitation et ouverture de la boite crânienne, le cerveau est basculé et l'hypothalamus est prélevé à l'aide d'outils stériles puis placé dans un tube contenant 1 ml Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) refroidi rapidement dans de l'azote liquide avant d'être stocké au congélateur à - 80 °C pour la détermination ultérieure des ARNm codant le CRF, le NPY et la POMC.

Après homogénéisation des hypothalamus au broyeur à billes (Tissue lyser, Qiagen, Courtaboeuf, France), les ARN totaux sont extraits et leur quantité est mesurée au spectrophotomètre Nanodrop (Labtek, Paris, France) par mesure de l'absorbance à 260 nm. La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir de 400 ng d'ARN totaux en utilisant un kit spécifique (« High capacity reverse transcription kit », Applied Biosystems, Foster City, CA). Les amorces oligonucléotidiques ont été recherchées grâce au logiciel « Primer Express » et le gène 18S est utilisé pour normaliser la quantité d'ARNm de chaque gène. Des recherches de comparaison de séquences ont permis de vérifier la spécificité de

chaque couple d'oligonucléotides. Les séquences des amorces utilisées sont données dans le tableau 6.

Tableau 6. Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour les amplifications en PCR quantitative.

Gènes cibles	Séquence	
18S	Sens	5'-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3'
	Antisens	5'-GGGTCGGGAGTGGGTAATTT-3'
CRF	Sens	5'-CCGCAGCCGTTGAATTTCTT-3'
	Antisens	5'-TTCTTCACCCATGCGGATCA-3'
POMC	Sens	5'-AGGCCTTTCCCCTAGAGTTCAA-3'
	Antisens	5'-GTCGGCCTTCTCGGTATCC-3'
NPY	Sens	5'-TTTTCCTAGTTTCCCCCCACAT-3'
	Antisens	5'-CCTGGTGGTGGCATGCAT-3'
MOR	Sens	5'-CACGGCTAATACAGTGGATCGA-3'
	Antisens	5'-GGGCAATGGAGCAGTTTCTG-3'

Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées avec un système 7300 de chez Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). Chaque échantillon d'ADNc est amplifiée dans un volume réactionnel de 20 µl contenant 15 µl de mélange SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA) et 500 nM de chaque amorce spécifique d'un gène. Après une étape de dénaturation à 95 °C de 10 min, 40 cycles de PCR sont réalisés 15 s à 95 °C et 1 min à 60 °C. Le cycle seuil (Ct) d'apparition du produit est déterminé en début de phase exponentielle de la PCR. A la fin des cycles de PCR, une courbe de dissociation est réalisée pour analyser les produits et s'affranchir d'éventuelle contamination par de l'ADN génomique ou par la formation de dimères d'amorces. Deux témoins sont également testés lors de la rétrotranscription : un témoin généré sans l'enzyme et un témoin généré sans ARN.

Une efficacité ($E = 10^{-1/pente} - 1$) de PCR est calculée pour chaque couple d'amorces à partir de la pente déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec un « pool » d'ADNc. Tous les ADNc sont amplifiés avec une efficacité supérieure à 98 %, l'expression du gène est calculée selon la formule $2^{-\Delta Ct}$ avec ΔCt = (Ct gène d'intérêt - Ct du gène 18S).

2.4.4. Profils de prise alimentaire

Les profils de prise alimentaire sont déterminés grâce à l'enregistrement en continu du poids des mangeoires. Les mangeoires sont placées sur des capteurs de pression dont la précision est de 0,01 g (Phimesure, Carpentras, France). Le programme d'acquisition informatique permet d'obtenir une mesure toutes les secondes. La prise alimentaire est mesurée pendant la période de présentation de la mangeoire et pour chaque animal, la structure des repas est analysée avec les

critères suivants. Un épisode alimentaire est une prise alimentaire de plus de 0,1 g et d'une durée supérieure à 10 s (Feurte *et al.*, 2002; Bensaid *et al.*, 2003). Deux épisodes alimentaires sont considérés comme 2 repas distincts s'ils sont séparés de plus de 10 min, sinon ils constituent 2 épisodes alimentaires d'un même repas. L'analyse de la séquence alimentaire permet d'extraire les différents paramètres reliés au repas : le nombre de repas, la taille du repas (kJ), la durée du repas (min), la vitesse d'ingestion (kJ/min) et l'intervalle entre 2 repas (min). Ces paramètres sont analysés sur 24 h mais également lors du cycle nuit et durant 1 h et 3 h après l'exposition au stress.

2.4.5. Séquence comportementale de satiété

La technique consiste à filmer les comportements des animaux durant la 1ère heure de prise alimentaire couplé ou non à un stimulus puis à classer ces comportements en différentes catégories pour déterminer la part relative de chaque comportement dans une tranche de temps donnée permettant la construction de courbes d'évolution des différents comportements (Halford *et al.*, 1998; Rodgers *et al.*, 2010).

La séquence comportementale de satiété (BSS pour « behavioral satiety sequence ») est évaluée pendant la 1ère heure de prise alimentaire immédiatement après l'exposition au stress. Les animaux sont alors dans la cage d'enregistrement du profil de prise alimentaire. Une caméra capable de filmer dans le noir est fixée sur un trépied placé en face de la cage en Plexiglas. La caméra est placée de manière à pouvoir identifier le comportement quelque soit l'endroit où l'animal se trouve dans la cage. Le comportement de l'animal est filmé pendant 1 h puis la vidéo est analysée.

L'activité du rat est évaluée manuellement à l'aide d'un logiciel d'analyse permettant l'entrée en temps réel de chaque comportement grâce au clavier de l'ordinateur (The Observer XT 9.0). Les paramètres mesurés lors de l'analyse des vidéos sont la fréquence et la durée totale des comportements suivants : épisode alimentaire, toilettage, repos, locomotion, levée sur les pattes arrière, reniflement (Tableau 7) (Bensaid *et al.*, 2003). La somme des comportements de locomotion, de levée sur les pattes arrière et de reniflement constitue l'activité. Les données recueillies sur 1 h sont regroupées en 12 intervalles de 5 min permettant la construction des BSS. Pour chaque intervalle de 5 min, les temps consacrés aux épisodes alimentaires, au toilettage, au repos et à l'activité sont calculés et représentés sur un graphique permettant l'évaluation des relations temporelles entre ces 4 comportements (Bensaid *et al.*, 2003; Faipoux *et al.*, 2006). Ce graphique constitue la BSS. Une ligne verticale est tracée sur la BSS et

correspond à la transition à partir de laquelle le temps consacré au repos devient prépondérant par rapport aux épisodes alimentaires (Halford *et al.*, 1998).

Tableau 7. Description des comportements recensés lors de l'analyse vidéo de la 1ère heure de prise alimentaire suivant le stress de nage forcée ou de contention.

Comportement	Description
Episode alimentaire	Grignoter, mâcher ou avaler de la nourriture dans la mangeoire ou prise dans les pattes avant
Toilettage	Gratter, lécher ou mordre la fourrure, les moustaches, les pattes, les organes génitaux ou la queue
Levée sur les pattes arrière	Les pattes avant ne touchent plus le sol, position debout sur les pattes arrière, appuyé contre la paroi de la cage ou non
Reniflement	Mouvement de la tête avec le reste du corps immobile, frémissement des vibrisses dirigé vers un aspect de l'environnement
Locomotion	Marcher dans la cage ou se retourner sur place, impliquant un mouvement des 4 pattes
Repos	Position de relaxation assis ou allongé, animal inactif

2.4.6. Poids et composition corporelle

Dans toutes les études, le poids est mesuré chaque jour. Suite au SCV, la composition corporelle des rats est déterminée. Les tissus adipeux sous cutanés, rétropéritonéales et épididymaires sont prélevés et pesés. La carcasse est également pesée afin d'obtenir un indice de la masse maigre de l'animal. Enfin, les glandes surrénales et le thymus sont prélevés puis pesés.

2.5. Analyses statistiques

Les données sont présentées en moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide du logiciel SAS pour Windows (version 9.1; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Une probabilité inférieure à 5 % ($P < 0,05$) est considérée comme significative.

Les résultats sont comparés entre le groupe non stressé et le groupe stressé par un test de Student non pairé (Proc TTest). Lorsque les données sont répétées dans le temps, les résultats sont analysés grâce à une analyse de la variance (ANOVA) en modèle mixte (Proc Mixed). Les effets du groupe (2 niveaux : stressé et non stressé), du temps et de l'interaction entre les 2 sont déterminés. Des comparaisons *post hoc* avec des tests de Tukey permettent la comparaison entre les groupes aux différents temps.

3. Résultats

3.1. Etude des stress aigus de nage forcée et de contention

3.1.1. Validation des modèles de stress de nage forcée et de contention

Des paramètres marqueurs de stress classiques sont mesurés immédiatement après l'application aiguë du stress de nage forcée ou de contention afin de valider nos modèles de stress.

Stress de nage forcée : Aucun paramètre mesuré lors du test de l'open field n'est modifié par l'exposition aiguë au stress de nage forcée (Tableau 8). Le stress de nage forcée induit une augmentation significative de la concentration plasmatique de corticostérone ($P < 0,0001$), d'ACTH ($P = 0,016$) et de glucose ($P = 0,006$; Tableau 9).

Tableau 8. Paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après le stress de nage forcée

	Non stressé	Stressé NF
Nombre de cases traversées	44 ± 2	43 ± 5
Temps passé dans zone externe (s)	191 ± 6	197 ± 5
Temps passé dans zone interne (s)	49 ± 8	43 ± 6
Ratio temps zone interne/externe	0,27 ± 0,04	0,22 ± 0,03
Temps de toilettage (s)	5 ± 3	4 ± 3
Nombre de fois levé sur pattes arrière	25 ± 2	22 ± 3

NF : nage forcée.

Tableau 9. Paramètres plasmatiques et hypothalamiques déterminés après le stress de nage forcée.

		Non stressé	Stressé NF
Variables plasmatiques	Corticostérone (µg/dl)	12 ± 4	36 ± 3 *
	ACTH (pg/ml)	141 ± 72	451 ± 92 *
	Glucose (mg/dl)	84 ± 3	103 ± 6 *
	Insuline (pM)	863 ± 85	444 ± 67 *
	Leptine (pM)	512 ± 76	466 ± 24
Expression hypothalamique des ARNm	CRF (UA)	503 ± 199	458 ± 198
	POMC (UA)	246 ± 60	392 ± 103
	NPY (UA)	283 ± 142	137 ± 52

** Indique une différence significative entre les 2 groupes.NF : nage forcée ; UA : unité arbitraire.*

Stress de contention : L'exposition au stress aigu de contention entraîne une diminution du nombre de cases traversées lors du test de l'open field ($P = 0,015$; Tableau 10). Immédiatement après le stress de contention, les concentrations plasmatiques de corticostérone et d'ACTH sont significativement augmentées ($P = 0,013$ et $P = 0,043$ respectivement). La concentration

plasmatique de glucose est identique chez les rats stressés par contention et chez les rats témoins non stressés (Tableau 11).

Tableau 10. Paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après le stress de contention.

	Non stressé	Stressé CONT
Nombre de cases traversées	48 ± 2	38 ± 2 *
Temps passé dans zone externe (s)	176 ± 7	188 ± 7
Temps passé dans zone interne (s)	64 ± 8	52 ± 8
Ratio temps zone interne/externe	0,39 ± 0,06	0,30 ± 0,06
Temps de toilettage (s)	1,1 ± 0,4	2,8 ± 0,8
Nombre de fois levé sur pattes arrière	25 ± 3	27 ± 2

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. CONT : contention.*

Tableau 11. Paramètres plasmatiques et hypothalamiques déterminés après le stress de contention.

		Non stressé	Stressé CONT
Variables plasmatiques	Corticostérone (µg/dl)	5 ± 3	17 ± 4 *
	ACTH (pg/ml)	13 ± 6	47 ± 13 *
	Glucose (mg/dl)	66 ± 3	70 ± 2
	Insuline (pM)	361 ± 52	411 ± 34
	Leptine (pM)	430 ± 42	456 ± 31
Expression hypothalamique des ARNm	CRF (UA)	771 ± 152	1062 ± 251
	POMC (UA)	154 ± 146	919 ± 217 *
	NPY (UA)	553 ± 247	850 ± 140

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. CONT : contention ; UA : unité arbitraire.*

3.1.2. Mesures de la prise alimentaire et gain de poids

La prise alimentaire et le gain de poids sont évalués lors de 2 jours de mesures de base et lors de 2 jours d'exposition aiguë au stress de nage forcée ou de contention. Aucune différence n'ayant été mise en évidence entre les 2 jours de mesures de base ou entre les 2 jours de mesures suite au stress, les moyennes sur 2 jours sont calculées pour obtenir les valeurs de base et suite au stress. La prise alimentaire est exprimée en kJ.

Stress de nage forcée : La prise alimentaire de base est identique entre les rats stressés et les rats non stressés (Tableau 12). Une diminution significative de la prise alimentaire cumulée de 24 % est mise en évidence 1 h après l'exposition au stress de nage forcée (P = 0,034 ; Figure 35). Par contre, la prise alimentaire cumulée sur 3 h, 6 h et 24 h est identique entre les animaux stressés et non stressés. Lors de la période de base et également après 2 jours de stress de nage forcée, les animaux stressés et non stressés présentent un poids et un gain de poids identique (Tableau 12).

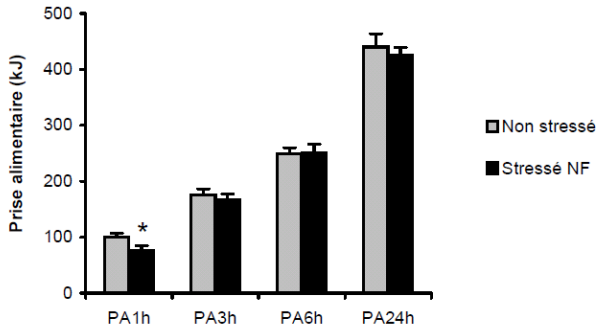


Figure 35. Prise alimentaire mesurée après le stress de nage forcée.

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. NF : nage forcée.*

Tableau 12. Prise alimentaire basale, poids et gain de poids basal et après le stress de nage forcée.

	Non stressé	Stressé NF
PA1h (kJ)	102 ± 9	104 ± 9
PA3h (kJ)	183 ± 14	169 ± 10
PA6h (kJ)	248 ± 13	258 ± 12
PA24h (kJ)	436 ± 24	422 ± 15
Gain de poids basal (g)	4,7 ± 0,9	5,8 ± 0,9
Gain de poids stress (g)	5,1 ± 0,7	3,9 ± 0,5
Poids basal (g)	356 ± 4	352 ± 5
Poids stress (g)	368 ± 5	361 ± 6

Les valeurs de prise alimentaire (PA) et de gain de poids correspondent à la moyenne des 2 jours de base ou de stress. Le poids basal est évalué avant l'exposition au stress et le poids stress est évalué 24 h après la 2ème exposition au stress. NF : nage forcée.

Stress de contention : La prise alimentaire de base est identique entre les animaux stressés et non stressés (Tableau 13). Le stress de contention induit une diminution de la prise alimentaire cumulée mesurée 3 h (- 17 % ; P = 0,002), 6 h (- 14 % ; P = 0,025) et 24 h (- 9 % ; P = 0,034) après la fin de l'exposition au stress (Figure 36). Le gain de poids et le poids des animaux non stressés et stressés sont identiques lors de la période de base. Après 2 jours de stress de contention, il n'y aucune différence entre le poids des animaux stressés et celui des animaux non stressés. Cependant le stress de contention induit une diminution de 42 % du gain de poids (P = 0,005 ; Tableau 13).

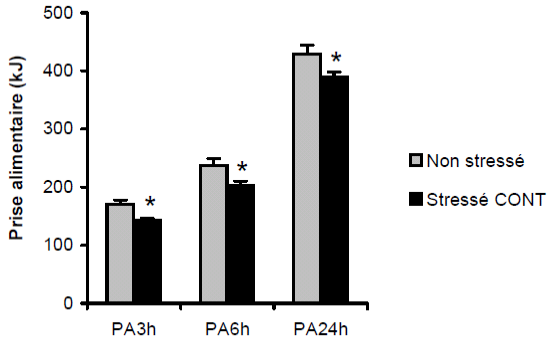


Figure 36. Prise alimentaire mesurée immédiatement après le stress de contention.

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. CONT : contention.*

Tableau 13. Prise alimentaire basale, poids et gain de poids basal et après le stress de contention.

	Non stressé	Stressé CONT
PA3h (kJ)	2000 ± 8	184 ± 7
PA6h (kJ)	257 ± 12	240 ± 9
PA24h (kJ)	438 ± 14	414 ± 13
Gain de poids basal (g)	5,9 ± 0,5	5,2 ± 0,6
Gain de poids stress (g)	4,9 ± 0,5	2,8 ± 0,4 *
Poids basal (g)	377 ± 7	387 ± 7
Poids stress (g)	370 ± 6	375 ± 6

Les valeurs de prise alimentaire (PA) et de gain de poids correspondent à la moyenne des 2 jours de base ou de stress. Le poids basal est évalué avant l'exposition au stress et le poids stress est évalué 24 h après la 2ème exposition au stress. CONT : contention.

3.1.3. Paramètres impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress

L'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF, le NPY et la POMC ainsi que les concentrations plasmatiques de leptine et d'insuline sont évaluées immédiatement après l'exposition aiguë au stress de nage forcée ou de contention afin de déterminer l'implication de ces peptides dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress.

Stress de nage forcée : L'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF, le NPY et la POMC est identique chez les rats exposés au stress aigu de nage forcée et chez les rats non stressés. Le stress de nage forcée induit une diminution de la concentration plasmatique d'insuline (P = 0,0009) sans modifier la concentration plasmatique de leptine (Tableau 9).

Stress de contention : L'expression hypothalamique des ARNm codant la POMC est 6 fois supérieure chez les rats stressés par contention par rapport aux rats non stressés (P = 0,014). Par contre, le stress de contention n'a pas d'effet sur l'expression hypothalamique des ARNm codant le NPY et le CRF. L'application aiguë du stress de contention n'a pas d'effet sur les concentrations plasmatiques de leptine et d'insuline (Tableau 11).

3.1.4. Mesures des profils de prise alimentaire et analyses du comportement

Les animaux sont placés durant 3 jours dans les cages de mesures en continu de la prise alimentaire. Le 2ème jour permet la mesure des profils de prise alimentaire de base et le 3ème permet la mesure des profils de prise alimentaire suite au stress ainsi que l'analyse comportementale de la 1ère heure de prise alimentaire.

Stress de nage forcée : On n'observe aucune différence entre le groupe stressé et le groupe non stressés lors des mesures de base. La figure 37 présente les profils de prise alimentaire cumulée sur 24 h et 2 h. Le stress de nage forcée n'a pas d'effet sur le profil de prise alimentaire

cumulée sur 24 h (effet groupe non significatif ; effet temps P < 0,0001 ; effet groupe × temps P = 0,008). Par contre, les rats stressés présentent une prise alimentaire cumulée pendant la 1ère heure suivant la nage forcée plus faible que les rats non stressés (effet groupe P = 0,014 ; effet temps P < 0,0001; effet groupe × time P < 0,0001). Néanmoins, cette inhibition est compensée dans l'heure suivante. Les paramètres relatifs à la structure du repas sont présentés dans le tableau 14. La prise alimentaire cumulée est diminuée chez les rats stressés uniquement lors de la 1ère heure de mesure (P = 0,015) et le stress de nage forcée induit une diminution significative de la taille du repas pendant cette période (P = 0,029). Aucune autre différence entre les rats non stressés et stressés n'est observée en ce qui concerne les paramètres relatifs au repas mesurés sur 1 h, 3 h, lors du cycle nuit et sur 24 h.

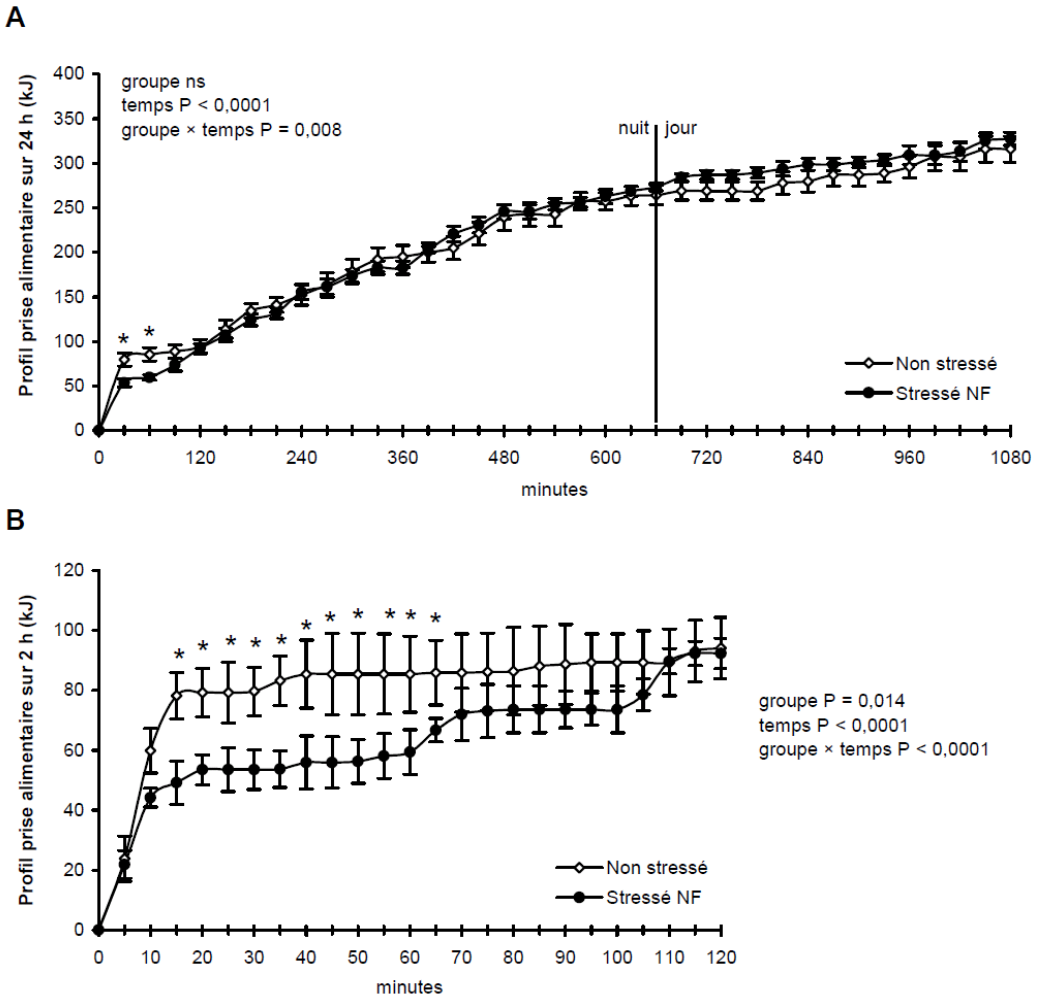


Figure 37. Profils de prise alimentaire obtenus après le stress de nage forcée.

*Les profils de la prise alimentaire pendant 24 h (A) et 2 h (B) sont réalisés à partir de l'enregistrement en continu de la consommation des animaux. * Indique une différence significative entre les 2 groupes. NF : nage forcée.*

Tableau 14. Paramètres relatifs au repas lors de l'enregistrement en continu de la prise alimentaire suite au stress de nage forcée.

		Non stressé	Stressé NF
1 h	Prise alimentaire cumulée (kJ)	83 ± 7	59 ± 5 *
	Nombre de repas	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,3
	Taille moyenne du repas (kJ)	70 ± 8	39 ± 9 *
	Durée moyenne du repas (min)	7,9 ± 1,2	6,3 ± 1,8
	Vitesse moyenne d'ingestion (kJ/min)	7,9 ± 0,8	7,2 ± 1,4
	Intervalle moyen entre les repas (min)	18 ± 2	29 ± 5
3 h	Prise alimentaire cumulée (kJ)	134 ± 8	124 ± 6
	Nombre de repas	4,7 ± 0,6	4,3 ± 0,3
	Taille moyenne du repas (kJ)	33 ± 7	29 ± 2
	Durée moyenne du repas (min)	6,0 ± 1,3	4,8 ± 0,7
	Vitesse moyenne d'ingestion (kJ/min)	7,4 ± 0,5	6,9 ± 1,1
	Intervalle moyen entre les repas (min)	51 ± 15	39 ± 3
Cycle nuit	Prise alimentaire cumulée (kJ)	264 ± 11	273 ± 4
	Nombre de repas	10 ± 1	10 ± 1
	Taille moyenne du repas (kJ)	30 ± 7	27 ± 2
	Durée moyenne du repas (min)	7,2 ± 1,3	5,8 ± 0,6
	Vitesse moyenne d'ingestion (kJ/min)	5,3 ± 0,6	5,9 ± 0,5
	Intervalle moyen entre les repas (min)	63 ± 13	53 ± 3
24 h	Prise alimentaire cumulée (kJ)	346 ± 15	358 ± 12
	Nombre de repas	14 ± 1	14 ± 1
	Taille moyenne du repas (kJ)	27 ± 5	26 ± 1
	Durée moyenne du repas (min)	6,5 ± 0,9	5,4 ± 0,4
	Vitesse moyenne d'ingestion (kJ/min)	5,0 ± 0,5	5,8 ± 0,5
	Intervalle moyen entre les repas (min)	95 ± 16	89 ± 7

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. † Indique une tendance à la différence entre les 2 groupes (P < 0,1). NF : nage forcée.*

Chez les rats non stressés, les 4 comportements de la BSS apparaissent dans un ordre classique et bien défini (Halford *et al.*, 1998; Bensaid *et al.*, 2003; Faipoux *et al.*, 2006) : le rat mange tout d'abord, puis il se toilette et/ou s'active avant de se reposer. Suite au stress de nage forcée, cette séquence n'est pas modifiée (Figure 38). Chez les animaux non stressés et stressés, la transition entre la période consacrée aux épisodes alimentaires et la période de repos (identifiée par le trait vertical) se produit lors du 3ème intervalle de 5 min. Chez les rats stressés, les profils temporels des épisodes alimentaires et du repos sont préservés par rapport aux rats non stressés, néanmoins il semble que le temps consacré aux épisodes alimentaires diminue plus rapidement et que le temps consacré au repos augmente également plus rapidement. La nage forcée induit ainsi une diminution significative de la durée totale des épisodes alimentaires (P = 0,016 ; Figure 39A). Le temps consacré au toilettage augmente plus précocement (2ème intervalle de 5 min) et est maintenu à un niveau élevé jusqu'au 8ème intervalle chez les animaux stressés par rapport aux animaux non stressés. Ainsi, la durée totale du toilettage est 2 fois plus

importante chez les rats stressés par nage forcée par rapport aux rats non stressés (P = 0,003). La fréquence de repos est significativement plus faible (P = 0,021) et la durée totale de repos tend à être plus faible suite au stress de nage forcée (P = 0,08 ; Figure 39).

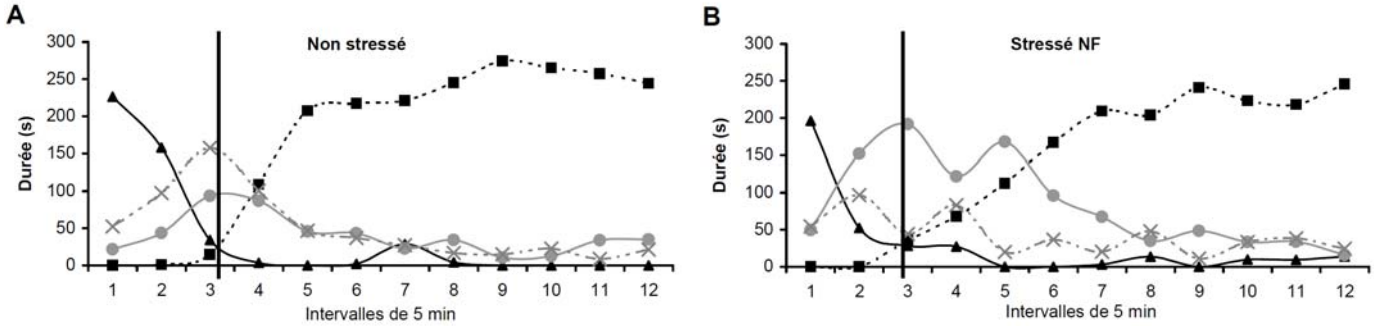


Figure 38. Séquence comportementale de satiété lors de la 1ère heure de prise alimentaire après le stress de nage forcée.

Les séquences comportementales de satiété pour le groupe témoin non stressé (A) et le groupe stressé par nage forcée (B) sont réalisées à partir de l'enregistrement vidéo des comportements des animaux. NF : nage forcée.

Episode alimentaire
Repos
Toilettage
Activité

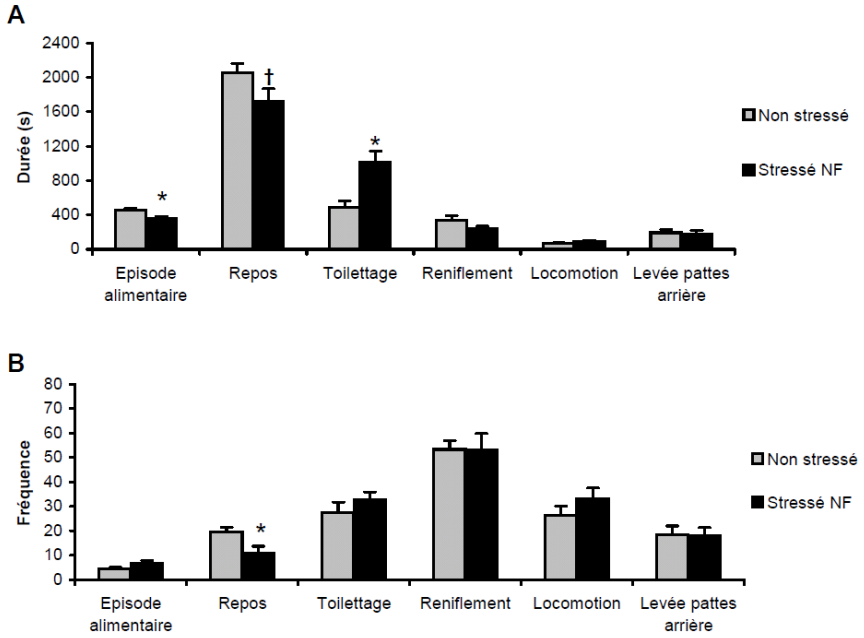


Figure 39. Durée (A) et fréquence (B) des différents comportements recensés lors de la 1ère heure de prise alimentaire après le stress de nage forcée.

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. † Indique une tendance à la différence entre les 2 groupes (P < 0,1). NF : nage forcée.*

Stress de contention : On n'observe aucune différence entre le groupe stressé et le groupe non stressé lors des mesures de base. La figure 40 présente le profil de prise alimentaire cumulée sur 24 h. Suite au stress de contention, les rats stressés présentent une diminution significative de la

prise alimentaire cumulée sur 24 h par rapport aux rats non stressés (effet groupe P < 0,0001 ; effet temps P < 0,0001 ; effet groupe × temps P = 0,0002). Les paramètres relatifs au repas sont présentés dans le tableau 15. Le stress de contention induit une diminution de la prise alimentaire cumulée sur 1 h, 3 h et 24 h (P = 0,010 ; P = 0,028 et P = 0,003 respectivement). Pendant la 1ère heure suivant le stress, aucune différence n'est observée entre les animaux non stressés et stressés concernant les paramètres relatifs au repas. Par contre, dès les 3 premières heures de mesures suite au stress de contention, la taille du repas est significativement diminuée (P= 0,020) et la durée du repas tend à être diminuée (P = 0,083) chez les rats stressés par rapport aux rats non stressés. La réduction de la durée du repas devient significative pendant le cycle nuit (P = 0,036) et le reste pendant les 24 h d'analyses (P = 0,028). La taille du repas est également significativement plus faible suite au stress de contention pendant le cycle nuit et les 24 h d'analyses (P = 0,023 et P = 0,012 respectivement). Aucun autre paramètre relatif au repas n'est modifié par l'exposition aiguë au stress de contention.

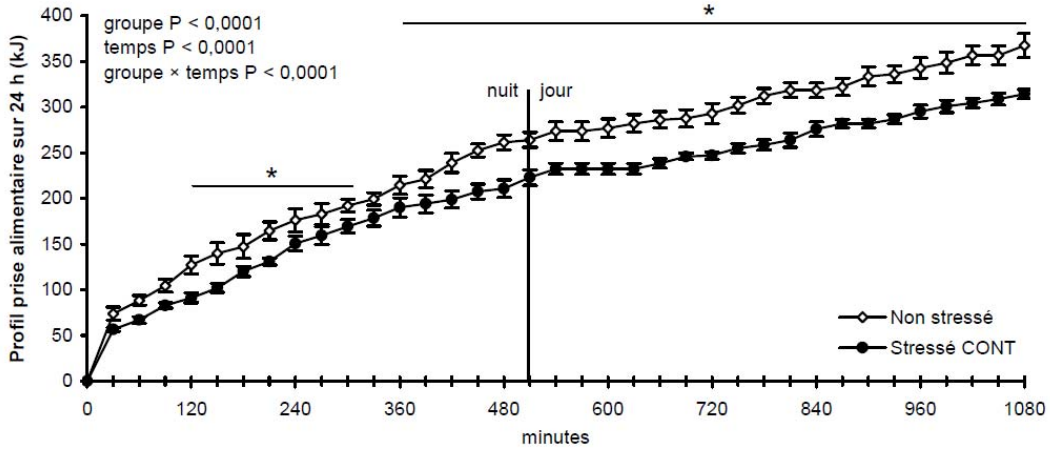


Figure 40. Profil de prise alimentaire obtenu immédiatement après le stress de contention.

*Le profil de la prise alimentaire pendant 24 h est réalisé à partir de l'enregistrement en continu de la consommation des animaux. * Indique une différence significative entre les 2 groupes. CONT : contention.*

Tableau 15. Paramètres relatifs au repas lors de l'enregistrement en continu de la prise alimentaire suite au stress de contention.

		Non stressé	Stressé CONT
1 h	Prise alimentaire cumulée (kJ)	88 ± 7	62 ± 4 *
	Nombre de repas	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,3
	Taille moyenne du repas (kJ)	60 ± 13	38 ± 4
	Durée moyenne du repas (min)	18,3 ± 6,7	9,4 ± 2,3
	Vitesse moyenne d'ingestion (kJ/min)	8,3 ± 1,5	6,0 ± 0,7
	Intervalle moyen entre les repas (min)	4,1 ± 0,7	5,1 ± 0,9
3 h	Prise alimentaire cumulée (kJ)	153 ± 12	120 ± 5 *
	Nombre de repas	4,1 ± 0,6	5,1 ± 0,3
	Taille moyenne du repas (kJ)	39 ± 5	24 ± 2 *
	Durée moyenne du repas (min)	14,6 ± 4,7	5,7 ± 0,6 †
	Vitesse moyenne d'ingestion (kJ/min)	17 ± 4	13 ± 2
	Intervalle moyen entre les repas (min)	3,5 ± 0,5	4,5 ± 0,6
Cycle nuit	Prise alimentaire cumulée (kJ)	267 ± 9	227 ± 10 *
	Nombre de repas	9,1 ± 0,8	10,0 ± 0,8
	Taille moyenne du repas (kJ)	30 ± 2	23 ± 1 *
	Durée moyenne du repas (min)	9,9 ± 1,4	6,3 ± 0,7 *
	Vitesse moyenne d'ingestion (kJ/min)	3,4 ± 0,4	4,0 ± 0,5
	Intervalle moyen entre les repas (min)	46 ± 4	48 ± 4
24 h	Prise alimentaire cumulée (kJ)	367 ± 13	314 ± 5 *
	Nombre de repas	14 ± 1	15 ± 1
	Taille moyenne du repas (kJ)	27 ± 1	21 ± 2 *
	Durée moyenne du repas (min)	8,1 ± 1,0	5,4 ± 0,4 *
	Vitesse moyenne d'ingestion (kJ/min)	3,7 ± 0,5	4,2 ± 0,6
	Intervalle moyen entre les repas (min)	77 ± 6	71 ± 5

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. † Indique une tendance à la différence entre les 2 groupes (P < 0,1). CONT : contention.*

De la même manière qu'après le stress aigu de nage forcée, les 4 comportements de la BSS apparaissent dans un ordre classique et bien défini chez les rats non stressés. Suite au stress de contention, cette séquence n'est pas perturbée (Figure 41). La transition entre la période consacrée aux épisodes alimentaires et la période de repos se produit au niveau du 3ème intervalle de 5 min chez les rats stressés et non stressés. Le profil temporel des épisodes alimentaires n'est pas modifié par le stress alors que le profil temporel de toilettage présente des changements suite à la contention. A partir du 3ème intervalle de 5 min, le temps consacré au toilettage est augmenté chez les animaux stressés pour diminuer lors du 5ème intervalle tout en restant, jusqu'à la fin de l'analyse comportementale, plus élevé que chez les animaux non stressés. Ainsi, la durée totale du toilettage est 2 fois plus importante chez les animaux stressés par rapport aux animaux non stressés (P = 0,024 ; Figure 42). Suite au stress de contention, on observe également une tendance à la diminution de la durée de reniflement (P = 0,06) et une diminution significative de la fréquence de reniflement (P = 0,036) et de repos (P = 0,009 ; Figure 42).

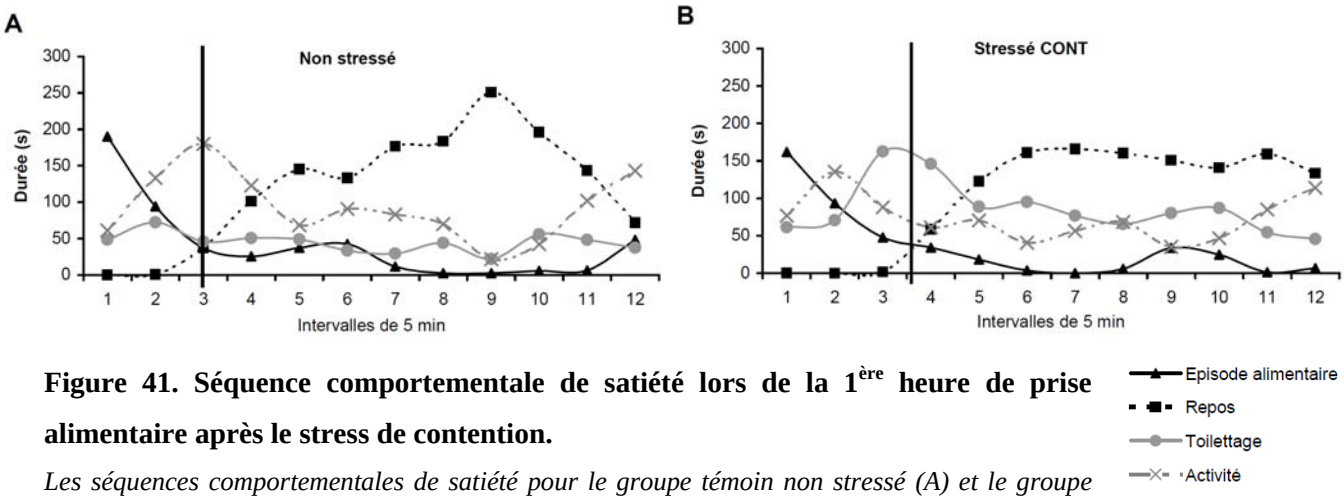


Figure 41. Séquence comportementale de satiété lors de la 1ère heure de prise alimentaire après le stress de contention.

Les séquences comportementales de satiété pour le groupe témoin non stressé (A) et le groupe stressé par contention (B) sont réalisées à partir de l'enregistrement vidéo des comportements des animaux. CONT : contention.

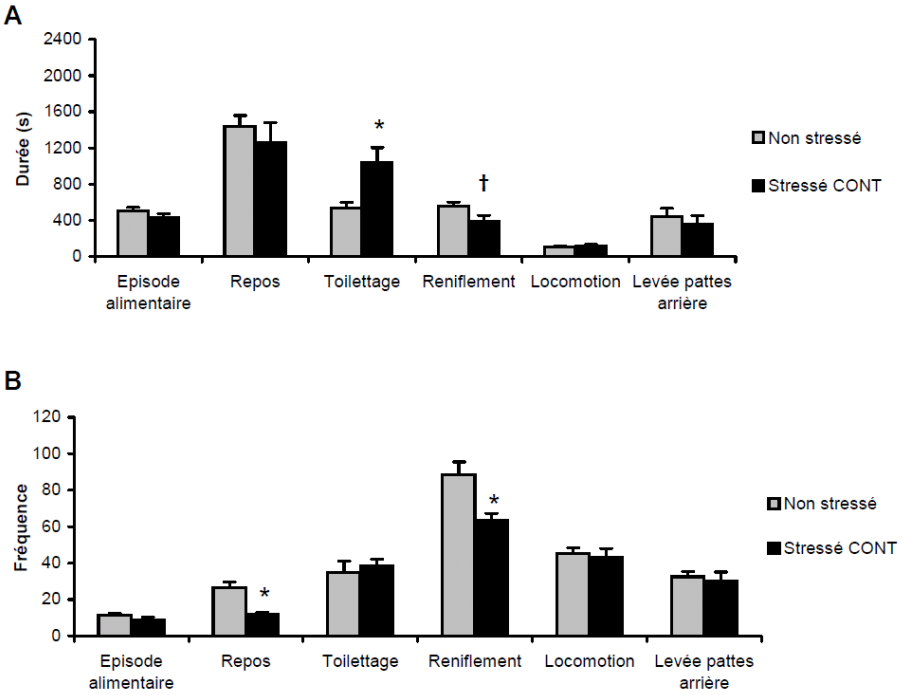


Figure 42. Durée (A) et fréquence (B) des différents comportements recensés lors de la 1ère heure de prise alimentaire après le stress de contention.

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. † Indique une tendance à la différence entre les 2 groupes (P < 0,1). CONT : contention.*

3.2. Etude du stress aigu de défaite sociale

Le stress de défaite sociale est appliqué pendant 3 jours consécutifs. Le niveau d'anxiété est évalué lors du 1er jour, la prise alimentaire est évaluée lors du 2ème jour et les paramètres plasmatiques et hypothalamiques sont déterminés lors du 3ème jour.

3.2.1. Validation du modèle de stress de défaite sociale

Lors du test d'open field, le comportement des animaux non stressés et stressés est identique pour tous les paramètres évalués (Tableau 16). La concentration plasmatique de corticostérone mesurée immédiatement après la défaite sociale est identique dans les 2 groupes (Tableau 17). En ce qui concerne la concentration plasmatique d'ACTH, le dosage n'ayant pas réussi, aucune donnée n'est disponible.

Tableau 16. Paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après le stress de défaite sociale.

	Non stressé	Stressé DS
Nombre de cases traversées	39 ± 4	39 ± 2
Temps passé dans zone externe (s)	176 ± 10	180 ± 6
Temps passé dans zone interne (s)	45 ± 7	41 ± 4
Ratio temps zone interne/externe	0,27 ± 0,05	0,24 ± 0,03
Temps de toilettage (s)	3,7 ± 2,2	12,3 ± 11,3
Nombre de fois levé sur pattes arrière	44 ± 4	40 ± 5

DS : défaite sociale.

Tableau 17. Paramètres plasmatiques et hypothalamiques déterminés après le stress de défaite sociale.

		Non stressé	Stressé DS
Variables plasmatiques	Corticostérone (µg/dl)	17 ± 1	16 ± 2
Expression hypothalamique des ARNm	CRF (UA)	39 ± 6	43 ± 12
	POMC (UA)	200 ± 34	177 ± 24
	NPY (UA)	90 ± 12	59 ± 10

DS : défaite sociale ; UA : unité arbitraire.

3.2.2. Mesures de la prise alimentaire et gain de poids

La prise alimentaire de base est identique entre les 2 groupes (Tableau 18). La prise alimentaire des rats stressés mesurée 1 h et 3 h après le stress de défaite sociale présentent une baisse de 27 % (P = 0,0017) et 21 % (P = 0,0291) respectivement par rapport aux rats non stressés (Figure 43). Cependant, cette baisse ne se maintient pas puisque la prise alimentaire mesurée 6 h et 24 h après l'exposition au stresseur est identique entre les 2 groupes. Le poids et le gain de poids des animaux non stressés et stressés sont identiques à la fin des jours de base. Suite à la défaite sociale, les animaux stressés ont un gain de poids identique aux animaux non stressés (Tableau 18).

Tableau 18. Prise alimentaire basale, poids et gain de poids basal et après le stress de défaite sociale.

	Non stressé	Stressé DS
PA1h (kJ)	74 ± 7	67 ± 7
PA3h (kJ)	143 ± 6	132 ± 9
PA6h (kJ)	197 ± 6	195 ± 15
PA24h (kJ)	362 ± 15	332 ± 19
Gain de poids basal (g)	5,0 ± 0,7	4,3 ± 0,6
Gain de poids stress (g)	4,4 ± 0,7	3,3 ± 1,2
Poids basal (g)	276 ± 7	270 ± 9
Poids stress (g)	286 ± 7	279 ± 10

Les valeurs de prise alimentaire (PA) et de gain de poids de base correspondent à la moyenne des 2 jours de base. Le poids basal est évalué immédiatement avant l'exposition au stress et le poids stress est évalué 24 h après la 2ème exposition au stress de défaite sociale. DS : défaite sociale.

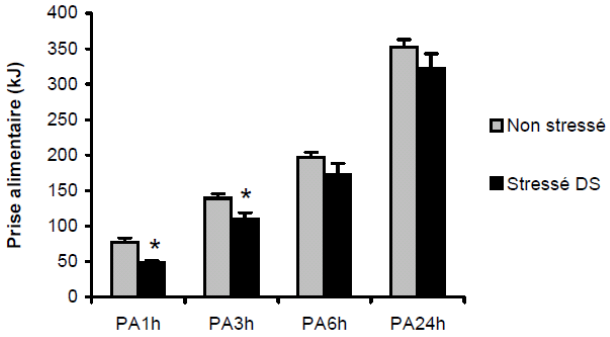


Figure 43. Prise alimentaire mesurée immédiatement après le stress de défaite sociale.

*La prise alimentaire est mesurée après l'exposition au stress lors du 2ème jour d'exposition. * Indique une différence significative entre les 2 groupes. DS : défaite sociale.*

3.2.3. Paramètres impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress

On n'observe aucune différence entre les groupes stressés et non stressés concernant l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF, la POMC et le NPY (Tableau 17).

3.3. Etude du stress chronique variable

Le SCV est appliqué durant 13 jours. La prise alimentaire sur 24 h est mesurée tous les jours. A la fin de l'application du protocole de SCV, le niveau d'anxiété est déterminé ainsi que la composition corporelle et les paramètres plasmatiques et hypothalamiques.

3.3.1. Validation du modèle de stress chronique variable

Le SCV induit une modification du comportement au sein de l'open field (Tableau 19). Les rats exposés au SCV tendent à passer plus de temps dans la zone externe (P = 0,097) et passent significativement moins de temps dans la zone interne de l'arène (P = 0,039). Ainsi, le ratio du

temps passé dans la zone interne sur le temps passé dans la zone externe est réduit de 40 % par le SCV (P = 0,039).

Après 13 jours de SCV, la concentration plasmatique de corticostérone est 2 fois plus élevée chez les animaux stressés par rapport aux animaux non stressés (P = 0,028). Par contre, le SCV n'a pas d'effet sur la concentration plasmatique d'ACTH (Tableau 20).

Le SCV n'a pas d'effet sur le poids des glandes surrénales et du thymus (Tableau 21).

Tableau 19. Paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après 13 jours de SCV.

	Non stressé	Stressé SCV
Nombre de cases traversées	32 ± 2	34 ± 3
Temps passé dans zone externe (s)	233 ± 5	245 ± 4 †
Temps passé dans zone interne (s)	36 ± 5	24 ± 2 *
Ratio temps zone interne/externe	0,16 ± 0,02	0,10 ± 0,01 *
Temps de toilettage (s)	2,3 ± 2,0	5,5 ± 2,9
Nombre de fois levé sur pattes arrière	21 ± 3	22 ± 2

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. † Indique une tendance à la différence entre les 2 groupes (P < 0,1).*

Tableau 20. Paramètres plasmatiques et hypothalamiques déterminés après 13 jours de SCV.

		Non stressé	Stressé SCV
Variables plasmatiques	Corticostérone (µg/dl)	11 ± 3	21 ± 3 *
	ACTH (pg/ml)	67 ± 5	71 ± 8
	Insuline (pM)	962 ± 66	810 ± 79
	Leptine (pM)	990 ± 71	797 ± 77 †
Expression hypothalamique des ARNm	CRF (UA)	147 ± 49	414 ± 83 *
	POMC (UA)	496 ± 109	452 ± 77
	NPY (UA)	398 ± 46	286 ± 27 †

** Indique une différence significative entre les 2 groupes. † Indique une tendance à la différence entre les 2 groupes (P < 0,1). UA : unité arbitraire.*

Tableau 21. Composition corporelle déterminée après 13 jours de SCV.

		Non stressé	Stressé SCV
Poids final (g)		431 ± 7	403 ± 6 *
Tissu adipeux	Rétropéritonéal (g)	15 ± 1	12 ± 1
	Epididymaire (g)	15 ± 1	12 ± 1
	Sous cutané (g)	36 ± 4	25 ± 1 *
	Total (g)	65 ± 6	49 ± 3 *
Carcasse (g)		183 ± 4	182 ± 2
Thymus (mg)		666 ± 53	661 ± 47
Glandes surrénales (mg)		66 ± 3	66 ± 3

La masse de tissu adipeux total correspond à la somme de la masse des tissus adipeux rétropéritonéaux, épididymaires et sous cutanés. Indique une différence significative entre les 2 groupes.*

3.3.2. Mesures de la prise alimentaire et gain de poids

Aucune différence de prise alimentaire sur 24 h n'est observée entre le groupe non stressé et le groupe stressé lors de la période de base (Figure 44A). Par contre, le SCV induit une diminution significative de la prise alimentaire chez les animaux stressés (effet groupe P = 0,0003 ; effet temps P < 0,0001 ; effet groupe × temps P = 0,0003 ; Figure 44B). Ainsi, la prise alimentaire cumulée sur les 13 jours de stress est réduite de 10 % chez les rats stressés par rapport aux rats non stressés (P = 0,0006 ; Tableau 22).

L'évolution du poids est identique entre le groupe non stressé et le groupe stressé lors de la période de base (Figure 45A). Durant le SCV, l'évolution du poids des animaux présente un effet significatif du temps (P < 0,0001) et de l'interaction groupe × temps (P < 0,0001) ainsi qu'une tendance à un effet du groupe (P = 0,070 ; Figure 45B). Ainsi, on observe une diminution significative du poids final des rats stressés (P = 0,006 ; Tableau 21). Les rats stressés présentent alors une diminution de près de 50 % du gain de poids cumulé sur la période de SCV par rapport aux rats non stressés (Tableau 22). De plus, on observe chez les rats stressés une diminution significative de 31 % de la masse de tissu adipeux sous cutané (P = 0,044) et une diminution significative de 25 % de la masse de tissu adipeux total (somme des 3 tissus adipeux prélevés ; P = 0,045 ; Tableau 21).

Tableau 22. Prise alimentaire cumulée et gain de poids cumulé de base et lors du SCV.

	Non stressé	Stressé SCV
Prise alimentaire cumulée basale (kJ)	5240 ± 121	5056 ± 92
Prise alimentaire cumulée SCV (kJ)	4980 ± 105	4449 ± 71 *
Gain de poids cumulé basal (g)	64 ± 2	59 ± 2
Gain de poids cumulé SCV (g)	42 ± 15	22 ± 1 *

*La prise alimentaire et le gain de poids cumulés sont calculés sur les 2 semaines de base précédant l'exposition au SCV et durant l'exposition au SCV. * Indique une différence significative entre les 2 groupes.*

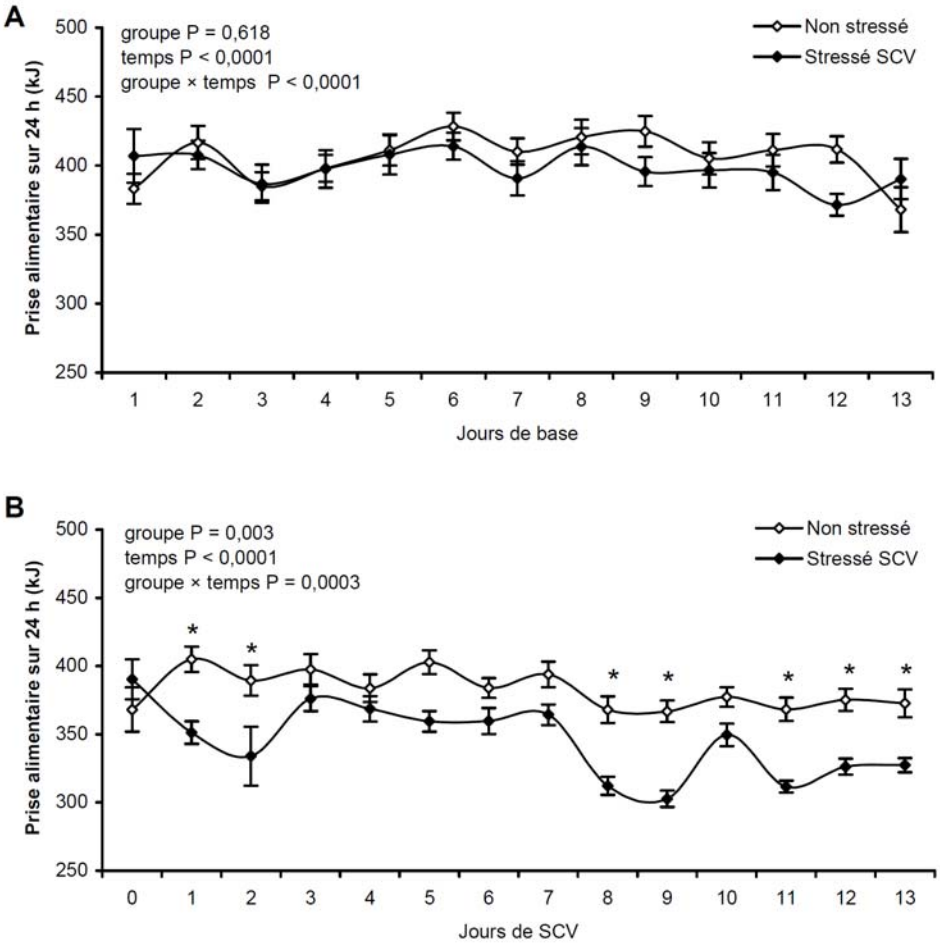


Figure 44. Prise alimentaire sur 24 h mesurée lors du SCV.

*La prise alimentaire sur 24 h est mesurée lors des 2 semaines précédant l'exposition au SCV (A) et lors de l'exposition au SCV (B). * Indique une différence significative entre les 2 groupes. SCV : stress chronique variable.*

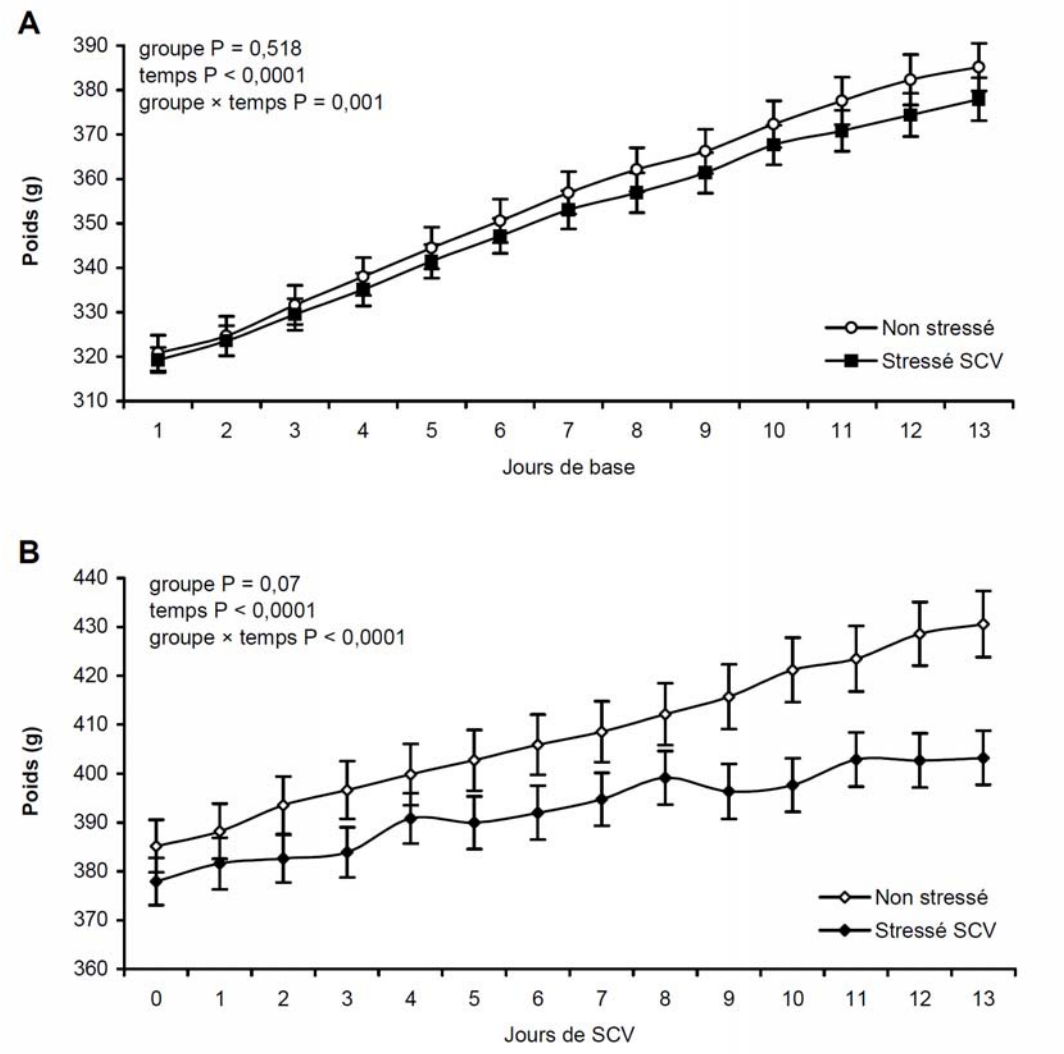


Figure 45. Poids des animaux mesuré lors du SCV.

Le poids des rats est mesuré lors des 2 semaines précédant l'exposition au SCV (A) et lors de l'exposition au SCV (B).

3.3.3. Paramètres impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress

La concentration plasmatique de leptine présente une tendance à la diminution chez les rats stressés par rapport aux rats non stressés (P = 0,084) et la concentration plasmatique d'insuline est identique dans les 2 groupes (Tableau 20).

L'exposition au SCV induit une augmentation significative de l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF (P = 0,041). De plus, l'expression hypothalamique des ARNm codant le NPY tend à être diminuée chez les rats exposés au SCV (P = 0,010). Aucun effet du SCV n'est observé sur l'expression hypothalamique des ARNm codant la POMC (Tableau 20).

4. Discussion

Nous avons étudié 4 modèles de stress. Le but de cette première partie du travail est de décrire les effets de ces modèles sur la prise alimentaire et de comprendre les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress. Notre objectif n'est pas de comparer ces modèles puisque les différences de durées d'application des stresseurs aigus rend difficile voire impossible une telle comparaison. L'utilisation de différents modèles de stress aigus nous a semblé pertinente car elle permet de discriminer les effets liés à la réponse de stress et les effets liés aux procédures en elles-mêmes. Des effets communs aux différents stresseurs suggèrent une réponse liée au stress alors que des effets divergents suggèrent une réponse spécifique du stresseur.

4.1. Validation des modèles de stress

Avant d'étudier les effets de ces modèles sur la prise alimentaire, il est nécessaire de vérifier qu'ils induisent effectivement un stress. Pour cela, nous avons évalué l'activation de l'axe corticotrope grâce à la détermination des concentrations plasmatiques d'ACTH et de corticostérone ainsi que le niveau d'anxiété lors de tests d'open field. La concentration plasmatique de glucose a également été évaluée après les stress de nage forcée et de contention et le poids d'organes sensibles au stress, tel le thymus ou les glandes surrénales, a été déterminé suite au SCV.

L'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone et d'ACTH suite au stress aigus de nage forcée et de contention permet de valider ces modèles. L'augmentation du niveau d'anxiété suite au stress de contention et l'augmentation de la concentration plasmatique de glucose immédiatement après le stress de nage forcée donnent des arguments supplémentaires en faveur de la validation de ces modèles.

La réduction du nombre de cases traversées dans l'open field chez les rats stressés par contention indique une diminution de l'activité caractéristique d'un niveau d'anxiété plus élevé chez ces animaux (Prut & Belzung, 2003). Ce résultat est généralement observé suite au stress aigu de contention (Carli *et al.*, 1989; Kasar *et al.*, 2009). Le stress de nage forcée n'a aucun effet sur le comportement au sein de l'open field. Le test de l'open field est un test mesurant le niveau d'anxiété. En plaçant les rats dans un environnement nouveau, ce test induit un stress. Il est possible que dans certains cas où l'intensité du stress n'est pas importante, le test de l'open field ne soit pas suffisamment sensible pour mettre en évidence des différences entre les

traitements. En revanche, on observe une augmentation des concentrations plasmatiques de corticostérone et d'ACTH suite à l'exposition aux 2 stresseurs. Ces résultats concordent avec ceux publiés dans de nombreuses études sur la contention et le nage forcée (Dal-Zotto *et al.*, 2000; Kelliher *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2002b; Retana-Marquez *et al.*, 2003). Les concentrations plasmatiques de corticostérone et d'ACTH sont plus faibles après le stress de contention par rapport au stress de nage forcée. Ces différences sont vraisemblablement dues aux durées d'application des stresseurs impliquant des horaires de prélèvements d'échantillons de sang différents. Ainsi, suite au stress de contention, les échantillons de sang sont collectés 3 h 30 après le début du cycle nuit alors qu'ils sont collectés 1 h après le début du cycle nuit pour le stress de nage forcée. L'ACTH et la corticostérone présentent des profils de sécrétions pulsatiles et suivent un rythme circadien (Gudmundsson & Carnes, 1997; Lightman, 2008). Le pic de sécrétion de ces hormones se produisant en début de cycle nuit, les échantillons de sang pour le stress de nage forcée ont été prélevés alors que les concentrations basales d'ACTH et de corticostérone étaient toujours élevées. De même, l'heure de prélèvement est probablement à l'origine de la différence d'effets des 2 modèles de stress sur la concentration plasmatique de glucose. Nous avons mis en évidence une augmentation de la glycémie immédiatement après le stress de nage forcée et observé aucun effet après le stress de contention. De nombreuses études ont montré une augmentation des concentrations de glucose aussi bien après la contention que la nage chez des rats nourris *ad libitum* (Armario *et al.*, 1990; Armario *et al.*, 1995; Dal-Zotto *et al.*, 2000; Kelliher *et al.*, 2000). Dans notre étude, les mangeoires sont enlevées des cages 2 h avant l'exposition au stress. Ainsi, lors de la collecte des échantillons de sang, les animaux de l'étude sur le stress de contention sont à jeun depuis 5 h alors que les animaux de l'étude sur le stress de nage forcée le sont depuis seulement 1 h 30. De manière cohérente, la glycémie des rats témoins non stressés du modèle de contention est plus faible (65,8 ± 2,9 mg/dl) que celle des rats témoins non stressés du modèle de nage forcée (83,7 ± 2,6 mg/dl). L'absence d'effet du stress aigu de contention sur la concentration plasmatique de glucose peut s'expliquer par des temps de jeûne différents puisque la libération de glucose peut être réduite en réponse au stress en cas de jeûne (Yamada *et al.*, 1993).

Notre modèle de défaite sociale ne semble pas activer l'axe corticotrope puisqu'aucune différence n'a été observée entre les animaux stressés et les animaux témoins non stressés en ce qui concerne la concentration plasmatique de corticostérone. De plus, le stress de défaite sociale ne modifie pas le niveau d'anxiété mesuré lors du test de l'open field. Ces résultats indiquent que notre modèle ne peut être validé et qu'il n'induit pas de réponse de stress aussi intense que dans la littérature. En effet, le stress de défaite sociale appliqué de manière aiguë ou répétée est

habituellement considéré comme très intense et engendre une augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone (Bhatnagar *et al.*, 2006; Marini *et al.*, 2006; Barnum *et al.*, 2007) et une augmentation des comportements indiquant un niveau d'anxiété élevé au sein de l'open field (Meerlo *et al.*, 1996a; Marini *et al.*, 2006; Kinn *et al.*, 2008). Nous avons utilisé des rats Wistar mâles comme rats résidents et intrus, les résidents étant plus âgés et plus gros que les intrus. Or, dans la plupart des modèles de défaite sociale, les résidents sont des rats de souche Long Evans (Bhatnagar *et al.*, 2006; Marini *et al.*, 2006; Barnum *et al.*, 2007) car cette souche est considérée comme naturellement agressive par rapport aux rats Wistar plus sociaux. Par ailleurs, les rats intrus ont été élevés en cages collectives avant d'arriver au laboratoire, et avaient donc dû déjà faire face à des confrontations sociales avec des individus de leur souche. Ainsi, bien qu'une défaite sociale ait été caractérisée lors de chaque confrontation intrus/résident, il est possible que celle-ci n'ait pas engendrée de stress important. D'autre part, nous avons mesuré la concentration plasmatique de corticostérone lors de la 3ème exposition au stress. L'hypothèse d'une habituation au stress des animaux après 3 répétitions est possible mais peu probable car le stress de défaite sociale n'engendre généralement pas d'habituation (Keeney *et al.*, 2001; Keeney *et al.*, 2006; Barnum *et al.*, 2007).

Notre modèle de SCV induit une augmentation chronique de la concentration plasmatique de corticostérone et une augmentation du niveau d'anxiété mise en évidence par le test de l'open field. Ces résultats suggèrent une hyperactivation de l'axe corticotrope et un état de stress chronique suite à l'exposition au SCV et valident notre modèle.

De nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone suite à l'exposition à un protocole de SCV suggérant une absence d'habituation au stress (Bielajew *et al.*, 2002; Rai *et al.*, 2003b; Marin *et al.*, 2007). De plus, comme dans d'autres études (Ostrander *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2008), le SCV induit une augmentation chronique de l'expression des ARNm codant le CRF au sein de l'hypothalamus. Cette augmentation de CRF donne des arguments supplémentaires en faveur d'une hyperactivation de l'axe corticotrope en réponse au SCV puisque le rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes ne semble plus efficace sur la libération de CRF par l'hypothalamus. Par contre, aucun effet du SCV sur la concentration plasmatique d'ACTH n'a été observé. Une dissociation similaire entre les concentrations plasmatiques de corticostérone et d'ACTH a déjà été mise en évidence suite à l'exposition au SCV (Herman *et al.*, 2001; Ostrander *et al.*, 2006) et plusieurs explications existent. Par exemple, la production et la libération de glucocorticoïdes peuvent être modulées par d'autres facteurs que l'ACTH. Ainsi, l'innervation splanchnique des corticosurrénales permet des variations dissociées de ces 2 hormones (Ulrich-Lai *et al.*, 2006a).

Il a également été montré que le stress chronique peut induire une augmentation de la réceptivité des corticosurrénales à l'ACTH (Riegle, 1973; Armario *et al.*, 1988). Une quantité plus faible d'ACTH peut alors induire une libération élevée de corticostérone lors d'un stress chronique.

Malgré l'hyperactivation de l'axe corticotrope, aucun effet du SCV n'a été observé sur le poids des glandes surrénales et du thymus. Dans la littérature, les effets du SCV sur le poids de ces organes sensibles au stress sont contradictoires. Certaines études observent une augmentation du poids des glandes surrénales et/ou une augmentation du thymus suite à l'exposition au SCV (Gamaro *et al.*, 2003a; Ulrich-Lai *et al.*, 2006b; Choi *et al.*, 2008) alors que d'autres ne mettent aucun effet en évidence (Ostrander *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2007). Il a été montré que plus un stresseur est intense, plus l'augmentation des glandes surrénales (Marti *et al.*, 1994) et l'involution du thymus est importante (Dominguez-Gerpe & Rey-Mendez, 2000). Les protocoles de SCV sont très variables d'une étude à l'autre, il est donc possible que les divergences d'effets du SCV sur les glandes surrénales et le thymus soient dues à des différences dans l'intensité du SCV appliqué. Dans notre étude, les stresseurs d'intensité modérée utilisés ne sont vraisemblablement pas assez intenses ou ne sont pas appliqués assez longtemps pour induire des changements morphologiques de ces 2 organes.

Notre modèle de SCV induit une augmentation du temps passé dans la zone externe au détriment du temps passé dans la zone interne de l'open field. Ce résultat indique une diminution de la motivation à explorer un nouvel environnement due à une augmentation du niveau d'anxiété des rats stressés (Katz *et al.*, 1981). Le SCV est en effet connu pour augmenter l'anxiété des animaux (Katz *et al.*, 1981; Harro *et al.*, 2001).

Suite à la validation des modèles aigus de nage forcée et de contention et du modèle de SCV, l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress a été étudiée dans le cadre d'un régime standard. Malgré l'absence de validation du modèle aigu de stress de défaite sociale, l'effet de ce stress sur la prise alimentaire a été partiellement étudié.

4.2. L'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu semble due à une augmentation du rassasiement

Le stress aigu de contention induit une diminution de la prise alimentaire dès les 3 premières heures suivant l'exposition au stress. Cette diminution n'est pas compensée au cours de la journée entraînant une diminution de la prise alimentaire sur 24 h. Par contre, le stress aigu de nage forcée induit une diminution de la prise alimentaire lors de la 1ère heure suivant l'exposition au stress mais cette diminution est rapidement compensée et la prise alimentaire sur

24 h reste stable. D'autre part, le stress aigu de défaite sociale induit une diminution de la prise alimentaire uniquement durant les 3 premières heures suivant l'exposition au stress, cette diminution étant compensée sur 24 h. En conséquence, le stress de contention induit une diminution du gain poids quotidien contrairement au stress de nage forcée ou de défaite sociale. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans d'autres études où une diminution similaire de la prise alimentaire sur 24 h après le stress de contention (Rybkin *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2002b) et aucun effet de la nage forcée sur la prise alimentaire quotidienne n'ont été observés (Nagaraja & Jeganathan, 2003; Diane *et al.*, 2008). Concernant le stress de défaite sociale, l'effet sur la prise alimentaire a été moins étudié. Il semble que la défaite sociale engendre une diminution de la prise alimentaire quotidienne suivant l'intensité du stress appliqué. En effet, des rats exposés à un stress de défaite sociale de 30 min appliqué de manière aiguë ou répétée durant 8 jours ne modifient pas leur prise alimentaire quotidienne (Bhatnagar *et al.*, 2006) alors que l'application durant 1 ou 2 jours d'un stress de défaite sociale de 1 h induit une diminution de la prise alimentaire quotidienne (Meerlo *et al.*, 1996c). L'absence d'effet du stress de défaite sociale sur la prise alimentaire à 24 h suggère donc que l'intensité du stress engendré par notre modèle n'est pas importante. La mise en place du modèle de stress de défaite sociale n'étant pas aboutie, l'étude de l'effet de ce stress sur la prise alimentaire s'est limitée aux analyses quantitatives.

Les analyses de profils de structure des repas et de la séquence comportementale de satiété suite aux stress de nage forcée et de contention suggèrent que l'exposition aiguë au stress, dans le cadre d'un régime standard, module le comportement alimentaire par une augmentation du rassasiement plutôt que par une augmentation de la satiété ou par d'autres mécanismes inhibant l'appétit. Tout d'abord, l'analyse des profils de structure des repas indique que les 2 modèles de stress induisent une réduction de la prise alimentaire via une réduction de la taille du repas dès la 1ère heure suivant la nage forcée et à partir de 3 h et durant 24 h suivant la contention. Des résultats similaires sont observés suite à l'application d'un stress de contention chez la souris (Tabarin *et al.*, 2007). L'absence d'effet à 1 h lors des analyses de profils de structure des repas et de BSS suite au stress de contention est probablement liée au fait que les animaux témoins non stressés sont déplacés durant 3 h dans une cage différente de leur cage d'hébergement. Ce changement est susceptible de stresser légèrement les rats témoins non stressés et d'atténuer temporairement les différences entre les groupes. L'analyse des profils de structure des repas montre que, suite au stress de contention, la réduction de la taille du repas est associée à une réduction de la durée du repas sans modification de la vitesse d'ingestion. De même, suite au stress de nage forcée, la réduction de la taille du repas lors de la 1ère heure suivant le stress est

également associée à une diminution de la durée des épisodes alimentaires déterminée par l'analyse comportementale, et sans modification de la vitesse d'ingestion. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la contention et la nage forcée n'induisent pas d'augmentation de la satiété mais induisent une augmentation du rassasiement. En effet, une augmentation de la satiété s'observe grâce à une réduction du nombre de repas et une augmentation de l'intervalle entre 2 repas (Castonguay *et al.*, 1986). Les stress de contention et de nage forcée n'induisent pas non plus d'aversion gustative conditionnée ou de malaise puisque la vitesse d'ingestion n'est pas réduite (Feurte *et al.*, 2002; Bensaid *et al.*, 2003). L'analyse de la BSS mène aux mêmes conclusions puisque l'aversion gustative conditionnée ou le malaise s'accompagne de perturbations de la BSS (Halford *et al.*, 1998). Suite aux stress de nage forcée et de contention, la BSS est préservée et les 4 comportements principaux apparaissent de manière classique et prédéfinie : on trouve une prépondérance initiale des épisodes alimentaires avant de laisser place au toilettage et/ou à l'activité pour finir par le repos. Malgré le maintien de l'enchaînement classique des comportements lors de la BSS, le stress aigu modifie certains comportements non alimentaires. Ainsi, les stress aigus de nage forcée et de contention induisent tous 2 une augmentation du toilettage. Le toilettage est augmenté dans des proportions similaires suite à la nage et à la contention ce qui indique que ce comportement est dû au stress proprement dit et non à des caractéristiques spécifiques liées aux stresseurs, comme par exemple le fait d'être mouillé puis essuyé suite à la nage. Le toilettage est un élément important du répertoire comportemental du rongeur. Il joue un rôle fondamental dans l'adaptation au stress et notamment dans la diminution de l'excitation induite par un agent stressant (Sachs, 1988; Spruijt *et al.*, 1992). Ainsi, suite à une exposition aiguë au stress, une augmentation du toilettage est souvent observée (Katz & Roth, 1979; van Erp *et al.*, 1994; Kalueff & Tuohimaa, 2005). L'analyse de la BSS suggère que l'augmentation du toilettage induite par le stress coïncide avec la réduction d'autres comportements, en particulier le repos et l'activité. L'augmentation du toilettage réduit obligatoirement le temps disponible pour les autres comportements et il est donc probable que le toilettage entre en compétition avec la prise alimentaire engendrant une diminution de celle-ci (Rodgers *et al.*, 2010).

Concernant les mécanismes centraux à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress, l'hypothèse de départ est que le CRF a un effet anorexigène direct ou un effet indirect via une inhibition de l'expression de NPY et/ou une stimulation de l'expression de POMC au niveau de l'hypothalamus. L'implication de la leptine et de l'insuline est également étudiée.

Le CRF est le premier acteur de l'activation de l'axe corticotrope (Charmandari *et al.*, 2005) et participe au contrôle du comportement alimentaire par son action anorexigène (Heinrichs & Richard, 1999; Richard *et al.*, 2002), notamment dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress (Krahn *et al.*, 1986). Nous n'avons pas observé d'effet des stress aigus de nage forcée, de contention ou de défaite sociale sur l'expression hypothalamique de CRF. Ces résultats sont consistants avec ceux de Harris *et al.* (Harris *et al.*, 2006) qui ont montré que le stress aigu de contention n'induit pas d'augmentation de l'expression de CRF dans le PVN immédiatement après le stress. Toutefois, de nombreuses études ont démontré que l'exposition aiguë à un stress de nage forcée, de contention ou de défaite sociale induit une augmentation de l'expression de CRF lorsque les cerveaux sont collectés 1 à 2 h après la fin du stress (Hsu *et al.*, 1998; Kiss & Aguilera, 2000; Keeney *et al.*, 2006; Romeo *et al.*, 2007b; Waldherr *et al.*, 2010). Ces résultats mettent en avant l'importance du délai de prélèvement du cerveau après un stress aigu pour détecter des modulations de l'expression de CRF et il est probable que prélever les cerveaux immédiatement après la fin de l'exposition au stress ne permette pas cela. Bien que nous n'ayons pas mis en évidence d'effet du stress aigu sur l'expression de CRF, une implication de ce neuropeptide dans l'augmentation du rassasiement induite par le stress n'est pas à exclure. En effet, Tabarin *et al.* (Tabarin *et al.*, 2007) ont montré que l'exposition à un stress aigu de contention induit, chez la souris, une diminution de la taille des repas. Par contre, cette inhibition n'apparaît pas chez les souris n'exprimant pas le récepteur CRF2 suggérant une implication de ce récepteur au CRF dans l'augmentation du rassasiement induit par le stress. Le CRF2 est exprimé au niveau du NTS (Van Pett *et al.*, 2000) qui est la principale zone du cerveau recevant les signaux de rassasiement à court terme (Woods, 2004) et qui reçoit des projections de neurones CRF hypothalamiques (Heinrichs & Richard, 1999). Tabarin *et al.* (Tabarin *et al.*, 2007) émettent l'hypothèse que l'augmentation du rassasiement induit par le stress implique, au moins en partie, les neurones CRF. De plus, le CRF est également impliqué dans la survenue du toilettage puisqu'il a été mis en évidence qu'une injection icv (Krahn *et al.*, 1988) ou directement dans le PVN (Dunn *et al.*, 1987) de CRF induit une augmentation de ce comportement.

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet des stress aigus de nage forcée et de contention sur l'expression hypothalamique de NPY. Ces résultats sont en accord avec les études ayant évaluées l'effet d'un stress aigu de contention ou de nage forcée sur l'expression de NPY dans l'hypothalamus ou dans l'ARC (Rybkin *et al.*, 1997; Thorsell *et al.*, 1998; Conrad & McEwen, 2000; Makino *et al.*, 2000). Dans notre étude, le stress de défaite sociale n'a pas d'effet sur l'expression hypothalamique de POMC et de NPY et à notre connaissance, aucune autre étude ne s'est intéressée à l'effet du stress de défaite sociale sur ces variables. Néanmoins, les

faiblesses de notre modèle ne permettent pas de généraliser nos résultats. Nous avons montré que le stress de contention induit une augmentation significative de l'expression des ARNm codant la POMC dans l'hypothalamus mais aucun n'effet de la nage forcée n'a été observé sur ce paramètre. Le stress de contention ainsi que le stress de nage forcée entraînent une inhibition de la prise alimentaire induite par une augmentation du rassasiement ainsi qu'une augmentation du toilettage. Bien que la contention et la nage forcée soient l'un et l'autre considérés comme des stresseurs psychologiques (Dayas *et al.*, 2001), nous avons montré qu'ils différent dans la durée de l'inhibition de la prise alimentaire qu'ils induisent. Notre hypothèse est que la modulation de la prise alimentaire par ces 2 stresseurs est basée sur des mécanismes similaires mais selon des évolutions temporelles différentes. Ainsi, la fenêtre d'augmentation de la POMC est vraisemblablement différente entre les 2 stresseurs et le protocole d'évaluation de l'expression hypothalamique de POMC ne permet pas, *a posteriori,* de mettre en évidence un effet de la nage forcée. D'autres études ont observé une augmentation de l'expression de POMC dans l'hypothalamus suite à l'exposition à des stress aigus de contention ou d'immobilisation (Baubet *et al.*, 1994; Larsen & Mau, 1994). De plus, Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2007) ont montré que les neurones POMC de l'ARC sont activés suite aux stress aigus de nage forcée et de contention. La POMC est précurseur des mélanocortines et particulièrement de l'α-MSH (Coll & Loraine Tung, 2009). Au niveau du tronc cérébral, l'α-MSH est impliquée dans la modulation de la taille du repas (Williams *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2005). L'α-MSH peut être libérée localement par des neurones POMC du NTS (Cone, 2005), mais les neurones POMC de l'ARC projettent vers le NTS du tronc cérébral et participe également à la libération d'α-MSH dans cette structure (Zheng *et al.*, 2010). De plus, les mélanocortines, et plus spécifiquement l'α-MSH, sont connues pour induire une augmentation du toilettage lorsque qu'elles sont injectées en icv (Bertolini *et al.*, 2009).

Nous avons montré que l'exposition à un stress aigu de contention ou de nage forcée n'induit pas de modification des concentrations plasmatiques de leptine. Un stress chronique induit une diminution de la leptine, généralement liée à une perte de poids (Makino *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 2002a; Lu *et al.*, 2006; Garcia-Diaz *et al.*, 2007) mais un stress aigu n'a généralement pas d'effet (Harris *et al.*, 2002a; Romeo *et al.*, 2007a). L'exposition au stress aigu de nage forcée engendre, dans notre étude, une diminution de la concentration plasmatique d'insuline mesurée immédiatement après le stress alors que le stress de contention n'a pas d'effet. Ces résultats concordent avec d'autres études montrant une diminution de l'insulinémie suite à un stress de nage forcée (Diane *et al.*, 2008) et aucun effet suite à un stress de contention (Harris *et al.*, 1998; Romeo *et al.*, 2007a). Il a été mis en évidence que 30 min de nage induisent une diminution de la concentration plasmatique d'insuline chez le rat (Pagano *et al.*, 1999). Nous avons choisi

d'appliquer le stress de nage forcée durant seulement 10 min dans le but de ne pas induire d'exercice physique, il est néanmoins possible que la diminution de la concentration plasmatique d'insuline après le stress de nage forcée soit due à l'exercice physique et non au stress. En outre, la diminution de la concentration plasmatique d'insuline est contradictoire avec une diminution de prise alimentaire et n'est vraisemblablement pas impliquée dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu.

4.3. L'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress chronique, relation avec la diminution du gain de poids

Les stresseurs inclus dans le protocole de SCV induisent une diminution de la prise alimentaire lorsqu'ils sont appliqués de manière aiguë (Chaouloff & Zamfir, 1993; Rybkin *et al.*, 1997; Diane *et al.*, 2008). Le SCV étant une succession imprévisible de stress aigus variés, les animaux exposés au SCV présentent, de manière attendue, une diminution de 10 % de la prise alimentaire quotidienne. Malgré la réduction quasi systématique qu'engendre le SCV sur le gain de poids (Duncko *et al.*, 2001; Harro *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Ulrich-Lai *et al.*, 2006b; Marin *et al.*, 2007), peu d'études ont évalué l'effet du SCV sur la prise alimentaire dans le cadre d'un régime standard. De plus, lorsque c'est le cas, la prise alimentaire est souvent mesurée en tant que paramètres parmi beaucoup d'autres et les conditions optimales pour la détermination précise de la consommation des animaux ne sont pas toujours réunies. Les effets du SCV sur la prise alimentaire sont variables : certaines études ne montrent aucun effet (Gamaro *et al.*, 2003a; Gamaro *et al.*, 2008) et d'autres montrent une diminution de la prise alimentaire (Harris *et al.*, 1997; Ulrich-Lai *et al.*, 2007). Ces divergences peuvent être expliquées par la variété des protocoles de SCV appliqués. La durée totale du SCV, la fréquence d'exposition aux différents stresseurs ainsi que les types de stresseurs inclus sont très variables d'une étude à l'autre. Ainsi, lorsque la fréquence d'application des stresseurs est faible (par exemple 3 fois par semaine) ou la durée d'application du SCV courte (par exemple 1 semaine), il semble que l'intensité du stress engendré ne soit pas suffisante pour mettre en évidence un effet sur le poids et/ou la prise alimentaire (Kubera *et al.*, 1998; Pothion *et al.*, 2004; Garcia-Diaz *et al.*, 2007; Tauchi *et al.*, 2008). Dans les études où une diminution du poids est mise en évidence sans qu'il n'y ait d'effet du SCV sur la prise alimentaire, la mesure de la consommation des animaux est réalisée sur des cages collectives (Gamaro *et al.*, 2003a; Gamaro *et al.*, 2008). Or dans notre étude mais aussi dans celle d'Harris *et al.* (Harris *et al.*, 1997), la diminution de la prise alimentaire est inférieure à 10 % chez des animaux placés en cages

individuelles. Une mesure précise de la consommation des animaux paraît nécessaire pour pouvoir détecter la diminution de la prise alimentaire induite par le SCV.

A notre connaissance, aucune étude n'a évalué simultanément l'effet du SCV sur l'expression des neuropeptides et hormones impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse de stress dans le cadre d'un régime standard. Pour comprendre les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par le SCV, nous avons déterminé l'expression des ARNm codant le CRF, le NPY et la POMC dans l'hypothalamus ainsi que la concentration plasmatique d'insuline, de leptine et de corticostérone après 13 jours de SCV. Tout comme pour les modèles de stress aigus, notre hypothèse de départ est que l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress chronique est due à un effet anorexigène direct du CRF ou à un effet indirect du CRF via une inhibition de l'expression de NPY et/ou une stimulation de l'expression de POMC au niveau de l'hypothalamus. Nous avons observé que le SCV induit une augmentation de l'expression de CRF dans l'hypothalamus suggérant une implication possible de ce neuropeptide anorexigène dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress chronique. Nos résultats confortent l'hypothèse d'une inhibition par le CRF des neurones orexigènes NPY de l'ARC, puisque le SCV induit une légère diminution de l'expression de NPY dans l'hypothalamus. Par ailleurs, il a déjà été observé que le SCV entraîne une diminution de l'expression de NPY dans de nombreux noyaux hypothalamiques (Kim *et al.*, 2003). Aucun effet du SCV sur l'expression de POMC n'a été trouvé dans notre étude et l'hypothèse d'une stimulation des neurones POMC de l'ARC par le CRF n'est donc pas vérifiée (Heinrichs & Richard, 1999). A notre connaissance, aucune autre étude n'a déterminé l'effet du SCV sur l'expression de POMC dans l'hypothalamus. Nous avons montré que le SCV induit une augmentation chronique de la concentration plasmatique de corticostérone, or les glucocorticoïdes stimulent la prise alimentaire (la Fleur, 2006). A court terme, l'effet des glucocorticoïdes sur la prise alimentaire est compensé par la stimulation de voies de régulation anorexigènes. A long terme, l'effet orexigène des glucocorticoïdes est vraisemblablement lié à une stimulation des neurones NPY et à une inhibition des neurones CRF (Cavagnini *et al.*, 2000; Nieuwenhuizen & Rutters, 2008). Dans notre étude, les résultats concernant le CRF et le NPY suggèrent que l'effet de la corticostérone sur la prise alimentaire n'est pas suffisant pour supplanter l'effet du CRF. De plus, nous avons observé une légère diminution de la concentration plasmatique de leptine et aucun effet sur la concentration plasmatique d'insuline suite au SCV. Peu d'études ont évalué l'effet du SCV sur ces hormones, néanmoins nos résultats concordent avec celles-ci (Rai *et al.*, 2003b; Garcia-Diaz *et al.*, 2007). La diminution de la leptine s'explique par la réduction de la masse de tissu adipeux suite au SCV puisque cette hormone est libérée de manière proportionnelle à la masse grasse d'un individu (Baskin *et al.*,

1999). En outre, la diminution de la concentration plasmatique de leptine est contradictoire avec une diminution de prise alimentaire et n'est vraisemblablement pas impliquée dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress chronique.

En accord avec la diminution de la prise alimentaire, notre modèle de SCV induit une diminution de près de 50 % du gain de poids aboutissant à une diminution du poids final des animaux stressés. La diminution du poids des animaux stressés est majoritairement due à une diminution de la masse de tissu adipeux et plus particulièrement de tissu adipeux sous cutané. Ce résultat est retrouvé dans d'autres modèles de SCV durant lesquels les animaux sont nourris avec un régime standard (Garcia-Diaz *et al.*, 2007; Ulrich-Lai *et al.*, 2007). La diminution de la prise alimentaire explique en partie la diminution de gain de poids engendré par le SCV mais il est probable que d'autres mécanismes soient impliqués. Nous avons montré que le SCV entraîne une augmentation chronique de la concentration plasmatique de corticostérone. Les glucocorticoïdes ont une action lipolytique à court terme (Macfarlane *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009). Cependant de manière chronique, l'augmentation des glucocorticoïdes est souvent accompagnée d'une augmentation de la concentration d'insuline favorisant ainsi l'accumulation de graisse au niveau abdominal (Rebuffe-Scrive *et al.*, 1992; Wajchenberg *et al.*, 1995). La masse des tissus adipeux épididymaires et rétropéritonéaux donne un indice de l'adiposité abdominale et dans notre étude, nous n'avons pas observé d'effet du SCV sur ces tissus. La concentration plasmatique d'insuline normale chez les rats soumis au SCV a vraisemblablement limité l'effet des glucocorticoïdes sur l'accumulation de tissus adipeux au niveau abdominal. Par ailleurs, une élévation chronique des glucocorticoïdes peut avoir un effet lipolytique sur le tissu adipeux sous cutané (Gravholt *et al.*, 2002; Krsek *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que les glucocorticoïdes peuvent avoir un effet chronique sur la lipolyse des tissus adipeux différent selon la région considérée (Macfarlane *et al.*, 2008). Ainsi, l'augmentation de corticostérone induite par notre modèle de SCV pourrait expliquer au moins en partie la diminution de la masse de tissu adipeux sous cutané chez les rats stressés. Néanmoins, il est possible que d'autres mécanismes soient également impliqués dans la réduction de masse grasse liée au SCV, comme par exemple une oxydation préférentielle des lipides engendrée par l'exposition au SCV (Garcia-Diaz *et al.*, 2007) ou une action catabolique des catécholamines dont la libération est vraisemblablement induite par le SCV (Carey, 1998).

En conclusion, l'inhibition de la prise alimentaire induite par nos modèles de stress aigus est vraisemblablement induite par une augmentation du rassasiement et il est possible que l'augmentation du temps consacré au toilettage suite au stress y participe de manière indirecte. Le système mélanocortique semble être impliqué dans ces mécanismes, du moins en partie. Une

implication du CRF n'est toutefois pas à exclure car ce peptide peut être à la fois impliqué dans le rassasiement et le toilettage induit par le stress. Il semble que les mécanismes expliquant l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu et chronique ne soient pas identiques car nous n'avons pas observé d'effet du SCV sur le système mélanocortique hypothalamique. L'hyperactivation de l'axe corticotrope induite par le SCV engendre une augmentation de l'expression de CRF dans l'hypothalamus suggérant l'implication de ce neuropeptide anorexigène dans la réduction de la prise alimentaire lors du stress chronique. L'effet du CRF pourrait être direct ou relayé par une inhibition des neurones orexigènes NPY. L'implication du NPY dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress chronique suggère que les voies de régulation de la satiété seraient majoritairement recrutées lors du SCV.

Les modèles de stress étudiés dans cette première partie ont été mis en place au laboratoire dans le but d'étudier l'effet anti-stress d'un extrait de levure, l'exl2006. Plus particulièrement, notre but est d'objectiver cet effet chez le rat, avec dans un 1er temps, la prise alimentaire comme marqueur de stress principal.

B. APPLICATION DES MODELES DE STRESS A L'ETUDE DE L'EFFET ANTI-STRESS D'UN EXTRAIT DE LEVURE

1. Introduction

Les extraits de levures résultent de la transformation de levures *Saccharomyces cerevisiæ* par autolyse et concentration (Annexe 4). Dans l'industrie, ils sont utilisés comme éléments nutritionnels et agents de sapidité grâce à leurs remarquables qualités organoleptiques et exhaustrices de goût, ou participent à l'élaboration de milieux de culture grâce à leur haute valeur biologique. L'analyse des spectres de chromatographies des extraits de levure montre qu'ils sont constitués de molécules de différentes tailles : des molécules de grandes tailles (> 10 kDa) majoritairement des glucides complexes issus de la dégradation des parois de la levure, des molécules de tailles moyennes, majoritairement des peptides dont la taille est comprise entre 1 et 10 kDa, et enfin des molécules plus petites, dont la taille n'excède pas 1 kDa, principalement des acides aminés libres. De part leur richesse en peptides et en protéines, les extraits de levures sont susceptibles de présenter de nombreuses propriétés fonctionnelles (Faipoux *et al.*, 2006).

L'extrait de levure que nous étudions est appelé exl2006. Il présente environ 30 % de peptides (Tableau 23) mais cette proportion peut légèrement varier d'un lot de production à l'autre.

Tableau 23. Analyse des spectres de chromatographie de différents lots de production de l'exl2006.

Lot d'exl2006	a	b	c	d	e
> 10 kDa (glucides complexes)	0,84	1,37	1,08	1,21	0,95
Entre 10 et 1 kDa (peptides)	35,54	28,71	29,88	29,12	34,74
< 1 kDa (acides amines libres)	63,63	69,91	69,04	69,67	64,31

Les lots de productions sont nommés de a à e. Ils ne correspondent pas aux lots de production des exl2006 testés par la suite. Les valeurs du tableau correspondent à des pourcentages, la somme d'une colonne égalant 100 %.

Comme nous l'avons vu (*cf.* I.B.4.2), des peptides issus de l'alimentation sont susceptibles de moduler les systèmes centraux impliqués dans la réponse de stress, l'exl2006 pourrait en faire partie. Cet extrait de levure est à l'origine un complément alimentaire élaboré pour les porcs et les volailles. Les observations des éleveurs donnant ce produit à leurs animaux ont toutefois été étonnantes. En effet, l'exl2006 semble rendre les animaux plus calmes avec notamment une diminution du phénomène de picage chez les volailles, suggérant une diminution du stress. Les observations des éleveurs ont été objectivées lors d'une étude sur animal cible. Brièvement, l'effet de l'apport d'exl2006 (50 mg/kg de poids vif) à l'alimentation de poulettes futures pondeuses (n = 200/groupe) a été étudié lors de l'application durant 5 semaines d'un stress de retrait de la litière et/ou d'un stress de restriction alimentaire (repas quotidien limité à 6 h par jour). Dans cette expérience, les stresseurs chroniques de retrait de la litière et de restriction alimentaire induisent une augmentation de 40 à 50 % de la survenue du picage chez les poulettes et l'administration de l'exl2006 permet de limiter presque totalement ce phénomène. L'effet anti-stress de l'exl2006 a ensuite été étudié chez un modèle rat. Lors d'une étude réalisée en 2006 et publié dans la thèse d'A. Diane[26], l'administration de l'exl2006 (50 mg/kg) à des rats mâles Wistar permet d'éviter l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu de nage forcée sans avoir d'effet sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone.

Suite à ces résultats, notre objectif a été de caractériser plus en détail l'effet anti-stress de l'exl2006 chez le rat. Il nous a semblé pertinent d'utiliser, dans un 1er temps, la prise alimentaire comme marqueur de stress. D'une part, c'est grâce à ce paramètre que l'effet anti-stress de l'exl2006 a été mis en évidence chez le rat pour la première fois et d'autre part, la prise

[26] Thèse d'Abdoulaye Diane « Stress, axe corticotrope et caractéristiques nutritionnelles et métaboliques », 2006.

alimentaire présente les caractéristiques d'un bon marqueur de stress. En effet, le stress modifie la prise alimentaire et dans le cadre d'un régime standard, un stress d'intensité moyenne à forte induit une inhibition de la prise alimentaire chez le rat ou la souris. D'après Armario *et al.* (Armario *et al.*, 1990), un bon marqueur de stress est non seulement une variable sensible au stress mais aussi sensible à l'intensité de celui-ci. Or l'inhibition de la prise alimentaire est d'autant plus importante que l'intensité du stresseur appliqué est élevée. L'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress peut donc être considérée comme un marqueur pertinent de stress chez le rat ou la souris dans le cadre d'un régime standard (Marti *et al.*, 1994; Valles *et al.*, 2006). De plus, il a été mis en évidence qu'un agent anti-stress pouvait limiter la diminution de la prise alimentaire induite par le stress (Ciccocioppo *et al.*, 2002). Enfin, pour étudier le stress, il est indispensable que la mesure des marqueurs de stress entraîne le minimum de perturbations de l'animal car ces perturbations peuvent être à l'origine de stress supplémentaire pouvant fausser les données. Ainsi, les avantages indéniables de la prise alimentaire comme marqueur de stress sont sa facilité de mesure, son faible coût et le peu de perturbations provoquées chez l'animal.

Par soucis de clarté, cette partie de travail réunit uniquement les principaux résultats concernant l'exl2006 obtenus au cours de la thèse[27]. Dans un 1er temps, l'effet d'un anxiolytique (le diazépam) lors de stress aigus de nage forcée et de contention est testé pour s'assurer qu'un produit dont l'efficacité anti-stress est avérée peut limiter l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress. L'effet anti-stress de l'exl2006 est ensuite évalué sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par les stress aigus de nage forcée, de contention et de défaite sociale. De plus, afin de déterminer l'impact de l'intensité du stress sur l'effet anti-stress de l'exl2006, l'intensité du stress de nage forcée est augmentée en prolongeant la durée du stresseur de 10 à 30 min. L'exl2006 ne présentant pas d'effet important et reproductible sur l'inhibition de la prise alimentaire, l'effet de l'exl2006 est testé sur un second marqueur de stress (la concentration plasmatique de corticostérone) lors du stress de contention. De plus, l'exl2006 est composé d'environ 30 % de peptides contenant vraisemblablement le principe actif anti-stress. Cette proportion peut varier d'un lot de production à l'autre et afin de vérifier l'hypothèse d'un impact du lot de production sur l'effet anti-stress de l'exl2006, 4 lots de production différents sont étudiés. Enfin, l'effet de l'administration chronique de l'exl2006 est étudié lors du modèle de stress chronique variable. L'effet de l'exl2006 sur la prise alimentaire lors des modèles de

[27] Au cours de cette thèse de nombreux autres extraits de levures ont également été testés lors des modèles aigus de stress. Ces résultats sont réunis dans le tableau présenté en annexe 5.

stress aigus n'ayant pas été probant, l'effet de l'exl2006 est analysé sur l'ensemble des paramètres ayant été modulés par notre modèle de SCV, c'est-à-dire sur l'évolution de la prise alimentaire et du poids quotidien, la masse du tissu adipeux sous-cutané, la concentration plasmatique de corticostérone et l'expression hypothalamique d'ARNm codant le CRF. Ce travail de thèse a été réalisé en parallèle avec une autre thèse financée par le groupe SI Lesaffre sur l'identification et l'isolement des peptides bioactifs d'extraits de levure, dont notamment l'exl2006, menée par Lucie Catiau au laboratoire ProBioGEM de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Les travaux de Lucie Catiau ont permis de mettre en évidence que l'exl2006 présente une affinité avec les récepteurs aux opioïdes lors de tests *in vitro* de liaison compétitive suggérant un effet de l'exl2006 sur le système opioïdergique. Une des cibles des agents anti-stress est le système opioïdergique (*cf.* I.B.4). Il existe 3 récepteurs principaux aux opioïdes, mu (μ), kappa (κ) et delta (δ) (Drolet *et al.*, 2001). Parmi ces récepteurs, le récepteur μ aux opioïdes (MOR) joue un rôle dans la régulation de la modulation de la réponse au stress (Kiritsy-Roy *et al.*, 1986; degli Uberti *et al.*, 1995). Le MOR est exprimé dans l'hypothalamus (Mansour *et al.*, 1995; Buzas & Cox, 1997) et une relation entre l'expression de MOR dans cette région du cerveau et l'inhibition de la réponse au stress par des agonistes des récepteurs aux opioïdes a été observée (Kiritsy-Roy *et al.*, 1986). Pour vérifier l'hypothèse, issue des résultats *in vitro* obtenus par Lucie Catiau, d'une modulation par l'exl2006 du système opioïdergique, l'expression hypothalamique de MOR suite au stress est déterminée.

2. Matériels et méthodes

2.1. Animaux et régimes

Des rats Wistar mâles (Harlan, Ganat, France) sont installés en cages individuelles dans une pièce d'hébergement à la température (23 ± 1 °C) et l'humidité régulées (55 ± 3 %). Le poids des animaux à l'arrivée au laboratoire est compris entre 275 et 300 g excepté pour les animaux inclus dans le modèle de stress de défaite sociale dont le poids est compris entre 200 et 225 g. Pour les modèles de stress aigus, le cycle lumineux 12 h/12 h est inversé. Pour le modèle de SCV, le cycle lumineux est maintenu normal.

Les animaux sont nourris avec le régime standard « P14 » (Tableau 4). Le régime est fourni sous forme semi-liquide (eau/régime en poudre, 1:1) et les mangeoires sont remplies quotidiennement avec de la nourriture fraîche. Pour les modèles de stress aigus, le régime est disponible *ad libitum*, excepté durant les 2 h précédant l'exposition au stresseur et pendant l'exposition en elle-même. Le protocole inclut également un repas calibré de 2 g de régime P14

(poids sec) que les animaux reçoivent en début de cycle nuit, 30 min avant l'exposition au stresseur (Figure 46). Ce repas leur est retiré au bout de 30 min, les rats s'habituent ainsi à le consommer entièrement dans une période de temps défini. Ce repas permet d'avoir la possibilité d'intégrer un extrait de levure. Pour le modèle de SCV, le régime est disponible *ad libitum*. L'eau est fournie *ad libitum*.

Les rats sont adaptés aux conditions du laboratoire et au protocole alimentaire durant 10 jours avant le début des expérimentations.

2.2. Produits anti-stress

2.2.1. Exl2006

L'exl2006 est administré à la dose de 50 mg/kg. Cette dose est celle pour laquelle l'exl2006 a montré un effet anti-stress chez le rat et la poulette. Dans les modèles de stress aigus, l'exl2006 est intégré au repas calibré de 2 g de régime P14 (poids sec) donné en début de cycle nuit. La quantité à intégrer au repas est calculée chaque jour en fonction de la dose et du poids moyen de chaque animal. Dans le modèle de stress chronique, l'exl2006 est administré intégré au régime standard *ad libitum*. La quantité à intégrer au régime est calculée en fonction de la dose, du poids moyen et de la prise alimentaire moyenne des animaux d'un jour sur l'autre. Ainsi, les animaux reçoivent en moyenne chaque jour 49,3 ± 0,3 mg/kg d'exl2006.

Différents lots de production d'exl2006 sont testés. Les différents lots se distinguent par un chiffre différents : exl2006-1 à 5. Dans les modèles de stress de nage forcée et de contention étudiant l'effet de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress, l'exl2006 testé est issu du même lot de production. L'impact du lot de production de l'exl2006 est testé sur l'inhibition de la prise alimentaire et l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu de contention. Quatre différents lots de production de l'exl2006 sont alors utilisés. Cette expérience ayant mis en avant un lot semblant présenter un effet anti-stress plus important, il a été choisi pour être testé lors des modèles de stress aigu de défaite sociale et de SCV. Le tableau 24 récapitule les différents lots de production de l'exl2006 utilisés dans les différentes expériences.

Tableau 24. Récapitulatif et identification des lots de production des extraits de levure exl2006 testés lors des différentes expérimentations.

Expérimentations		Nom	Code identification
Nage forcée 10 min		Exl2006-1	030707640
Nage forcée 30 min		Exl2006-1	030707640
Contention 3 h	*1ère étude*	Exl2006-1	030707640
	Validation	Exl2006-1	030707640
Défaite sociale 1 h		Exl2006-2	030805940
Contention 3 h	*1ère étude*	Exl2006-2	030805940
		Exl2006-3	030805950
		Exl2006-4	030806550
		Exl2006-5	030806670
	Validation	Exl2006-2	030805940
		Exl2006-4	030806550
Stress chronique variable 13 j		Exl2006-2	030805940

2.2.1. Diazépam

Le diazépam est un anxiolytique de la famille des benzodiazépines présentant des propriétés anti-stress (*cf.* I.B.4.1). Ce médicament est souvent utilisé comme molécule de référence pour tester de nouveaux produits anti-stress (Bernet *et al.*, 2000; Ciccocioppo *et al.*, 2002; Rex *et al.*, 2002) ou de nouveaux modèles de stress (Carli *et al.*, 1989; Hegarty & Vogel, 1995; Ely *et al.*, 1997). Le diazépam peut modifier la prise alimentaire puisqu'il induit une hyperphagie pour des doses supérieures à 2,5 mg/kg (Johnson, 1978; Cooper, 1980; Seyrig *et al.*, 1986). A partir de 0,5 mg/kg, le diazépam a des effets anxiolytiques sur une variété de mesures comportementales de l'anxiété (Rex *et al.*, 1996; Schmitt & Hiemke, 1998; Bert *et al.*, 2001; Ballard *et al.*, 2005). Ainsi, afin d'éviter l'effet hyperphagique du diazépam et de s'assurer de l'effet anxiolytique, la dose de 1 mg/kg est choisie pour tester la pertinence de l'inhibition de la prise alimentaire comme marqueur de stress lors des stress aigus de nage forcée et de contention. Le diazépam est administré par injection intrapéritonéale (ip) au début du cycle nuit, 30 min avant l'exposition au stress.

2.3. Protocoles expérimentaux

Les modèles de stress aigus de nage forcée, de contention et de défaite sociale ainsi que la procédure de SCV sont identiques à celles décrites dans la première partie des travaux (II.A.2.2).

2.3.1. Effet anti-stress de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu

Une expérience préliminaire teste l'effet du diazépam sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu de contention ou de nage forcée. L'effet de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu de contention, de nage forcée de 10 min et de 30 min ou de défaite sociale est ensuite évalué. Dans chaque expérience, les animaux sont divisés en 3 groupes : non stressé, stressé et stressé + diazépam ou non stressé, stressé et stressé + exl2006. Six à 8 rats sont inclus dans chaque groupe.

Les protocoles expérimentaux pour les différents modèles de stress aigus sont similaires hormis pour les différences inhérentes aux spécificités du stresseur (Figure 46). Le stress est appliqué durant 2 jours consécutifs, 30 min après le début du cycle nuit. L'exl2006 ou le diazépam sont administrés à partir de 5 jours avant le début de l'exposition au stress et durant les 2 jours d'exposition. La prise alimentaire est mesurée suite au stress et lors des 2 jours précédant l'exposition au stresseur pour obtenir la ligne de base. Afin d'uniformiser les résultats entre les différentes expériences et de limiter les variations inter-individuelles, la prise alimentaire (PA) suite au stress a été calculée en pourcentage du niveau de base : *PA stress (%) = 100 × PA base (kJ)/PA stress (kJ).* La prise alimentaire absolue (PA kJ) de base et suite au stress correspond à la moyenne des 2 jours de base et des 2 jours de stress. Nous avons montré (II.A) que le stress de nage forcée induit une diminution de la prise alimentaire 1 h après la fin de l'exposition au stress, le stress de contention induit une diminution de la prise alimentaire 24 h après la fin de l'exposition au stress et le stress de défaite sociale induit une diminution de la prise alimentaire 3 h après la fin de l'exposition au stress. Ainsi, suivant le stresseur, l'effet du diazépam ou de l'exl2006 est testé sur la prise alimentaire 1 h, 3 h ou 24 h après la fin de l'exposition au stress (Figure 47).

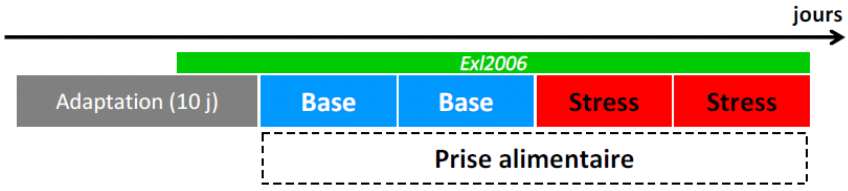


Figure 46. Protocole expérimental pour tester l'effet de l'administration de l'exl2006 (ou du diazépam) sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu.

Cinq jours avant et pendant l'exposition au stress, l'exl2006 (ou le diazépam) est administré.

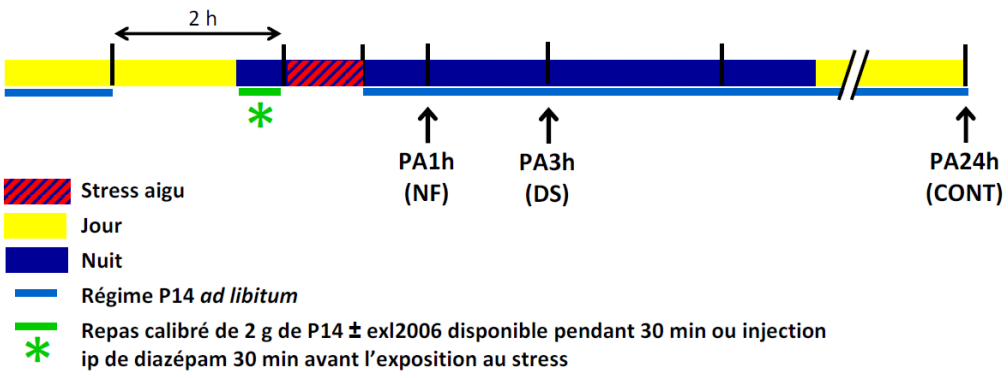


Figure 47. Mesures de la prise alimentaire après l'exposition à un stress aigu lors des expérimentations testant l'effet de l'administration d'exl2006 ou de diazépam.

PA : prise alimentaire ; Ip : intrapéritonéal ; NF : nage forcée ; DS : défaite sociale ; CONT : contention.

2.3.2. Effet anti-stress de l'exl2006 sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu de contention et effet du lot de production de l'exl2006

Quarante-deux rats sont inclus dans cette expérience et divisés en 6 groupes pour tester 4 lots de production de l'exl2006 : non stressé, stressé et 4 groupes stressés + exl2006-x testant l'effet de l'exl2006-2, de l'exl2006-3, de l'exl2006-4 et de l'exl2006-5.

Le stress de contention est appliqué durant 3 jours consécutifs (Figure 48). Lors des 2 premiers jours de stress, la prise alimentaire est évaluée. Afin de garantir l'ingestion du repas calibré contenant l'exl2006, le régime n'est pas disponible durant le cycle jour et la mangeoire est retirée 6 h après sa mise à disposition. La prise alimentaire est alors mesurée 6 h après la fin de l'exposition au stresseur (Figure 49). La prise alimentaire est mesurée lors des 2 jours précédant l'exposition au stresseur pour obtenir la ligne de base et calculer la prise alimentaire suite au stress en pourcentage du niveau de base.

Lors du 3ème jour de stress, les animaux sont euthanasiés par décapitation immédiatement après la contention. Le sang du tronc est collecté sur EDTA puis centrifugé à 4 °C, le plasma est isolé et conservé au congélateur à - 20 °C pour la détermination ultérieure de la concentration plasmatique en corticostérone (*cf.* II.A.2.4.2.).

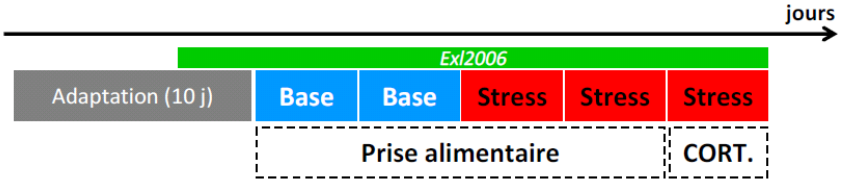


Figure 48. Protocole expérimental pour tester l'effet de l'exl2006 et de son lot de production sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu de contention.

CORT : corticostérone.

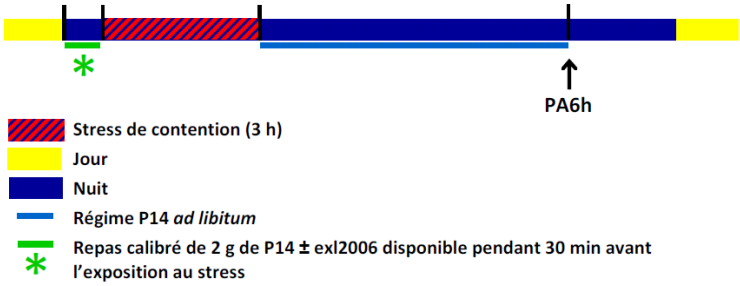


Figure 49. Mesures de la prise alimentaire après l'exposition à un stress aigu de contention lors de l'expérimentation testant l'effet de l'administration d'exl2006 et du lot de production de l'exl2006.

2.3.3. Effet anti-stress de l'exl2006 lors du modèle de SCV

Quarante-huit rats sont répartis en 4 groupes : non stressé, non stressé + exl2006, stressé, stressé + exl2006. Deux semaines avant le début du protocole de SCV, l'exl2006 est intégré au régime. La prise alimentaire et le poids des rats sont évalués quotidiennement (Figure 50). Douze heures après le dernier stresseur, les rats sont soumis au test d'open field afin d'évaluer leur niveau d'anxiété (*cf.* II.A.2.4.1). Trente-six heures après le dernier stresseur, les animaux sont euthanasiés par décapitation. Le sang du tronc est collecté sur EDTA puis centrifugé à 4 °C, le plasma est isolé et conservé au congélateur à - 20 °C pour la détermination ultérieure de la concentration plasmatique de corticostérone (*cf.* II.A.2.4.2). Le tissu adipeux sous-cutané est prélevé puis pesé. Le cerveau est isolé et l'hypothalamus est prélevé à l'aide d'outils stériles puis placé dans un tube contenant 1 µl de Trizol™, congelé rapidement dans l'azote liquide avant d'être stocké au congélateur à - 80 °C pour la détermination ultérieure de l'expression des ARNm codant le CRF et le MOR (*cf.* II.A.2.4.3).

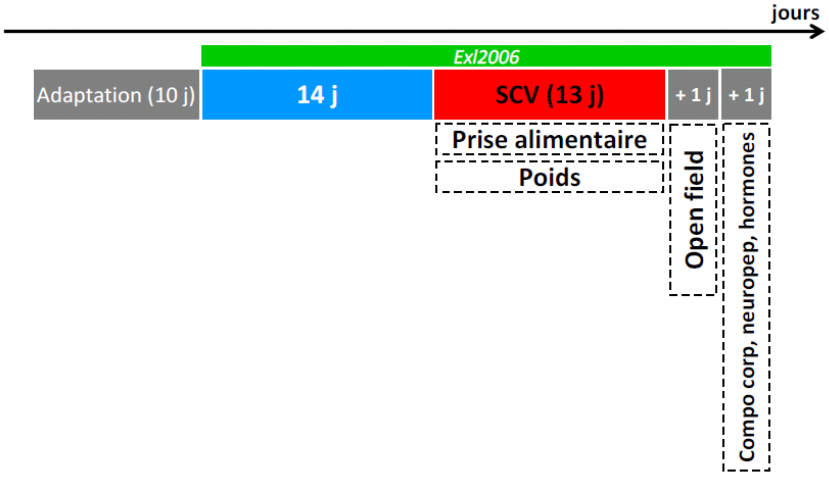


Figure 50. Protocole expérimental pour tester l'effet de l'exl2006 lors du SCV.

Neuropept : neuropeptides ; compo corp : composition corporelle.

2.4. Analyses statistiques

Les données sont présentées en moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide du logiciel SAS pour Windows (version 9.1; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Une probabilité inférieure à 5 % ($P < 0,05$) est considérée comme significative.

Pour les expériences sur les modèles de stress aigus, les résultats des groupes non stressé, stressé et stressé + exl2006/diazépam sont comparés par ANOVA (Proc GLM) à un facteur (groupe). Après une différence statistique, la comparaison *post hoc* des moyennes 2 à 2 est effectuée en utilisant le test de Tukey Kramer. Lorsqu'une comparaison entre 2 moyennes est nécessaire, un test de Student (Proc TTest) est réalisé.

Pour l'étude sur le SCV, les données sont analysées par ANOVA (Proc GLM) à 2 facteurs (stress et exl). Les effets du stress, de l'exl2006 et de leur interaction sont testés. Après une différence statistique, la comparaison *post hoc* des moyennes 2 à 2 est effectuée en utilisant le test de Tukey Kramer. La prise alimentaire et le poids quotidiens sont analysés séparément par ANOVA à 2 facteurs (stress et exl) à mesures répétées (Proc Mixed), le temps étant la mesure répétée. Les effets du stress, de l'exl2006 et de leur interaction sont testés.

3. Résultats

3.1. Pertinence de l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu comme marqueur de stress pour l'étude d'un produit anti-stress chez le rat

Les stress de nage forcée de 10 min et de contention 3 h induisent une diminution de la prise alimentaire respectivement lors de la 1ère heure et lors des 24 h suivant la fin de l'exposition au stresseur. Cette inhibition est limitée chez les animaux recevant du diazépam (ANOVA P = 0,014 et P = 0,026 respectivement ; Figure 51).

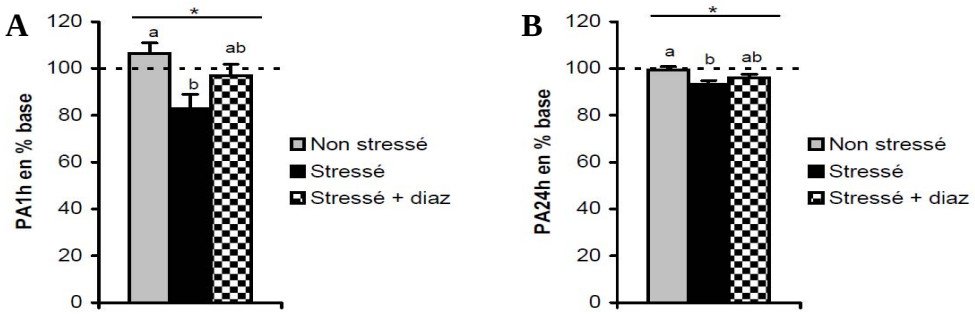


Figure 51. Effet de l'administration de diazépam sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress de nage forcée (A) ou de contention (B).

** Indique un effet groupe significatif (ANOVA) et des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.*

3.2. Effet de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu de nage forcée, de contention ou de défaite sociale

Le stress de nage forcée appliqué durant 10 ou 30 min induit une diminution de la prise alimentaire lors de la 1ère heure suivant la fin de l'exposition au stresseur mais l'inhibition de la prise alimentaire est identique chez les animaux stressés recevant ou non l'exl2006 (ANOVA P = 0,024 et P = 0,0003 respectivement ; Figure 52). L'inhibition de la prise alimentaire à 1 h est doublée en augmentant la durée de la nage forcée de 10 à 30 min (- 16 ± 3 % et - 39 ± 2 % respectivement, Test T : P < 0,0001).

Le stress de contention induit une diminution de la prise alimentaire sur 24 h et l'administration de l'exl2006 semble limiter cet effet puisque la comparaison *post hoc* de la prise alimentaire sur 24 h du groupe stressé + exl2006 n'est ni différente du groupe stressé, ni du groupe non stressé (ANOVA P = 0,018 ; Figure 53A). L'expérience a été reproduite mais n'a pas permis de retrouver ce résultat (ANOVA P = 0,021 ; Figure 53B).

Le stress de défaite sociale induit une diminution de la prise alimentaire lors des 3 premières heures suivant la fin de l'exposition au stresseur mais l'inhibition de la prise alimentaire est identique chez les animaux stressés recevant ou non l'exl2006 (ANOVA P = 0,037 ; Figure 54).

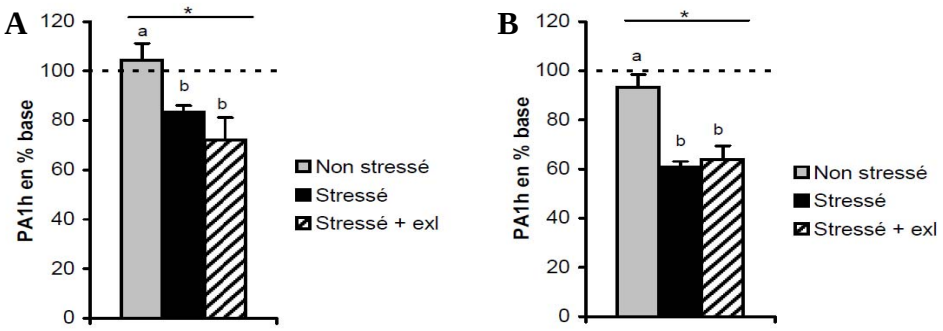


Figure 52. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress de nage forcée de 10 min (A) et 30 min (B).

** Indique un effet groupe significatif (ANOVA) et des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.*

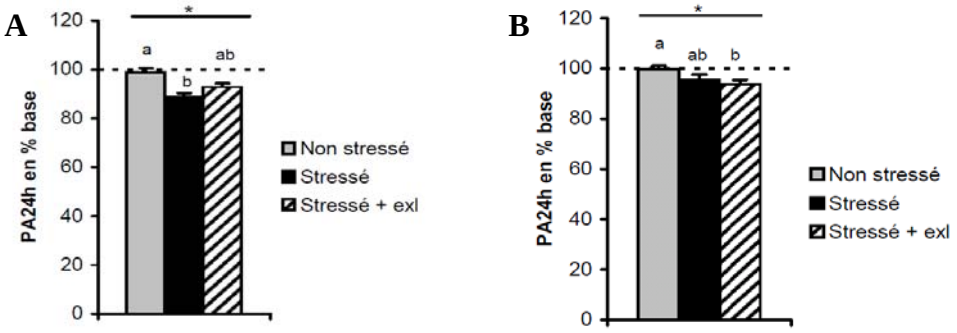


Figure 53. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress de contention.

*A et B correspondent à 2 répétitions de la même expérimentation. * Indique un effet groupe significatif (ANOVA) et des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.*

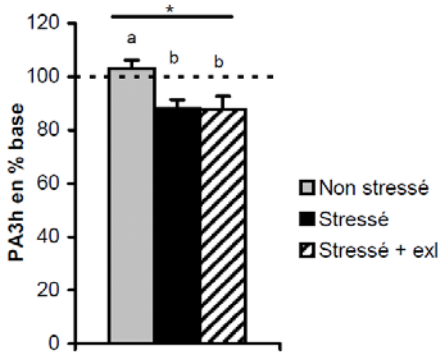


Figure 54. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress de défaite sociale.

** indique un effet groupe significatif (ANOVA) et des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.*

3.3. Effet anti-stress de l'exl2006 sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu de contention et effet du lot de production de l'exl2006

Dans cette étude, le stress de contention induit une inhibition de la prise alimentaire à 6 h mais l'inhibition de la prise alimentaire est identique chez les animaux stressés recevant ou non les différents lots d'exl2006 (ANOVA P = 0,019 ; P= 0,001 ; P = 0,028 et P = 0,002 respectivement pour exl2006-2, 3, 4 et 5 ; Figure 55).

Le stress de contention induit une augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone et l'administration de l'exl2006-2 et de l'exl2006-5 permet d'inhiber cet effet (ANOVA P = 0,009 et P = 0,022 respectivement ; Figure 56A). Par contre, l'administration de l'exl2006-3 et de l'exl2006-4 n'ont aucun effet sur l'augmentation de la corticostérone induite par la contention (P = 0,065 et P = 0,023 respectivement ; Figure 56A). Afin de valider l'effet anti-stress de l'exl2006, l'expérimentation est reproduite en ne testant que l'effet de 2 extraits de levure, l'un efficace (exl2006-2) l'autre non (exl2006-4). Lors de cette répétition, nous n'avons pas retrouvé le résultat obtenu en premier lieu car l'administration de l'exl2006-2 ne permet plus de limiter l'augmentation de la concentration de corticostérone induite par le stress de contention (ANOVA P = 0,036 ; Figure 56B).

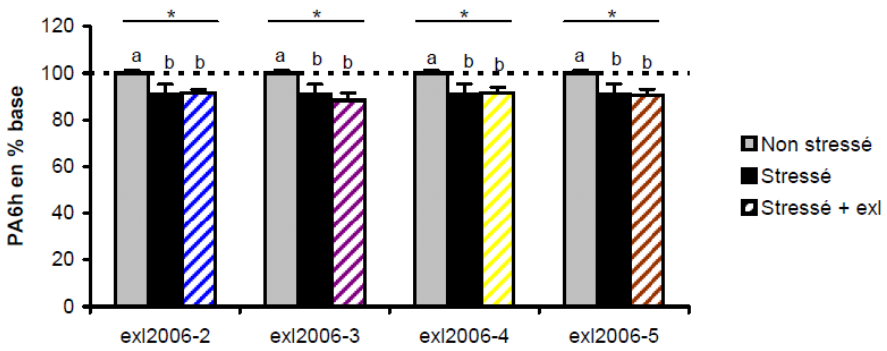


Figure 55. Effet de l'administration de différents lots de production d'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu de contention.

** Indique un effet groupe significatif (ANOVA) et des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.*

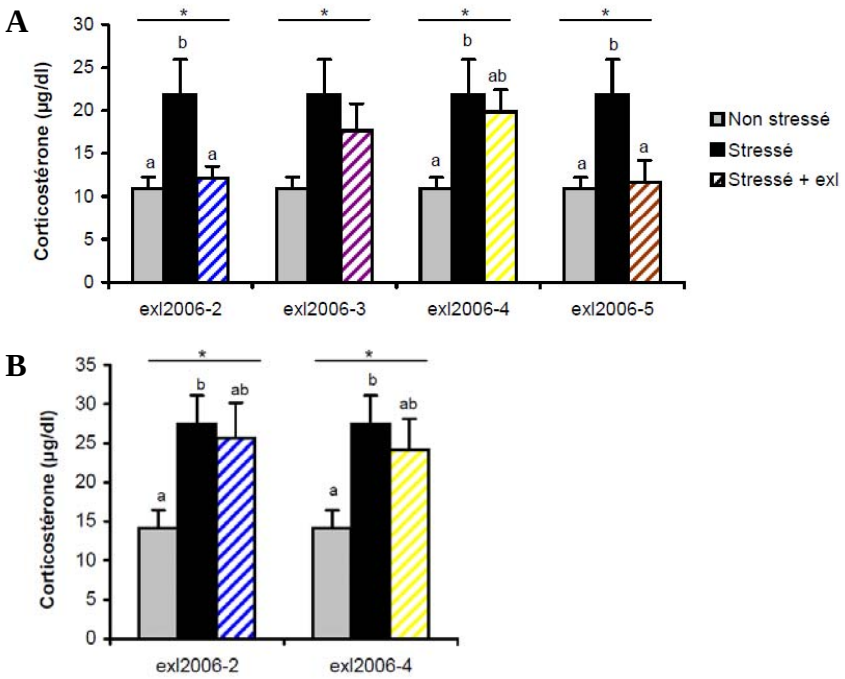


Figure 56. Effet de l'administration de différents lots de production d'exl2006 sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu de contention.

*A et B correspondent à 2 répétitions de la même étude. * Indique un effet groupe significatif (ANOVA) et des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.*

3.4. Effet anti-stress de l'exl2006 lors du modèle de stress chronique variable

Le SCV induit une augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone mesurée 2 jours après la fin de l'exposition au stress (ANOVA effet stress P = 0,024) mais aucun effet de l'exl2006 ou de l'interaction des 2 facteurs n'est mis en évidence. Néanmoins, l'analyse *post hoc* indique une légère diminution de la concentration plasmatique de corticostérone grâce à l'administration de l'exl2006 chez les animaux stressés (Figure 57).

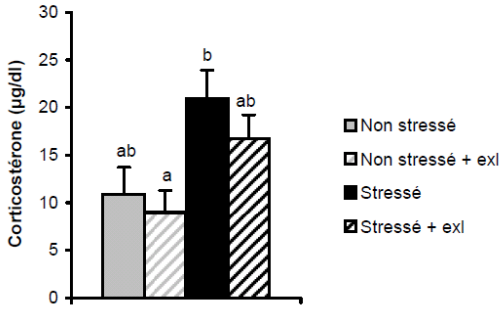


Figure 57. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'augmentation de la concentration plasmatique basale de corticostérone induite par 13 jours de SCV.

L'ANOVA indique un effet du stress sur la concentration plasmatique de corticostérone. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.

Un jour après la fin du SCV, les animaux sont soumis au test de l'open field. Les animaux stressés passent plus de temps dans la zone externe (ANOVA effet stress P = 0,013) au

détriment de la zone interne (ANOVA effet stress P = 0,029) et le ratio du temps passé dans la zone interne sur le temps passé dans la zone externe est ainsi diminué par le stress (ANOVA effet stress P = 0,002). L'administration de l'exl2006 n'a aucun effet sur ces changements (Tableau 25).

Tableau 25. Effet de l'administration de l'exl2006 sur les paramètres évalués lors du test de l'open field réalisé après 13 jours de SCV.

	Non stressé	Non stressé + exl2006	Stressé	Stressé + exl2006	*ANOVA*		
					Stress	*Exl*	*Stress × exl*
Nombre de cases traversées	32 ± 2	39 ± 4	34 ± 3	31 ± 2	*ns*	*ns*	*ns*
Temps passé dans zone externe (s)	233 ± 5 [ab]	225 ± 5 [a]	245 ± 4 [b]	245 ± 4 [b]	*< 0,05*	*ns*	*ns*
Temps passé dans zone interne (s)	36 ± 5	38 ± 5	24 ± 2	26 ± 3	*< 0,05*	*ns*	*ns*
Ratio temps zone interne/externe	0,16 ± 0,02 [ab]	0,18 ± 0,03 [a]	0,10 ± 0,01 [b]	0,11 ± 0,01 [ab]	*< 0,05*	*ns*	*ns*
Temps de toilettage (s)	2,3 ± 2,0	3,8 ± 2,4	5,5 ± 2,9	3,2 ± 1,8	*ns*	*ns*	*ns*
Nombre de fois levé sur pattes arrière	21 ± 3	18 ± 4	22 ± 2	25 ± 3	*ns*	*ns*	*ns*

Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes. Ns : non significatif.

Lors de la période de SCV, l'analyse de la variance à mesures répétées montre un effet du stress mais aucun effet de l'exl2006, ni de l'interaction des 2 facteurs sur l'évolution de la prise alimentaire quotidienne et du poids des rats (ANOVA à mesures répétées effet stress P < 0,0001 et P = 0,014 respectivement ; Figures 58A et 59A). La prise alimentaire cumulée des groupes stressés est significativement (ANOVA effet stress P < 0,0001) plus faible que celle des groupes non stressés sans qu'il n'y ait d'effet de l'administration de l'exl2006 (Figure 58B). De même, le gain de poids cumulé sur la période de SCV est significativement diminué chez les animaux stressés par rapport aux animaux non stressés (ANOVA effet stress P < 0,0001) sans effet de l'exl2006 (Figure 59B). L'analyse de la variance indique un effet du stress (P = 0,043) et de l'interaction entre le stress et l'exl2006 (P = 0,035) sur la masse de tissu adipeux sous-cutané. Ainsi l'administration de l'exl2006 permet de limiter la réduction de la masse de tissu adipeux sous-cutané induite par le SCV (Figure 60).

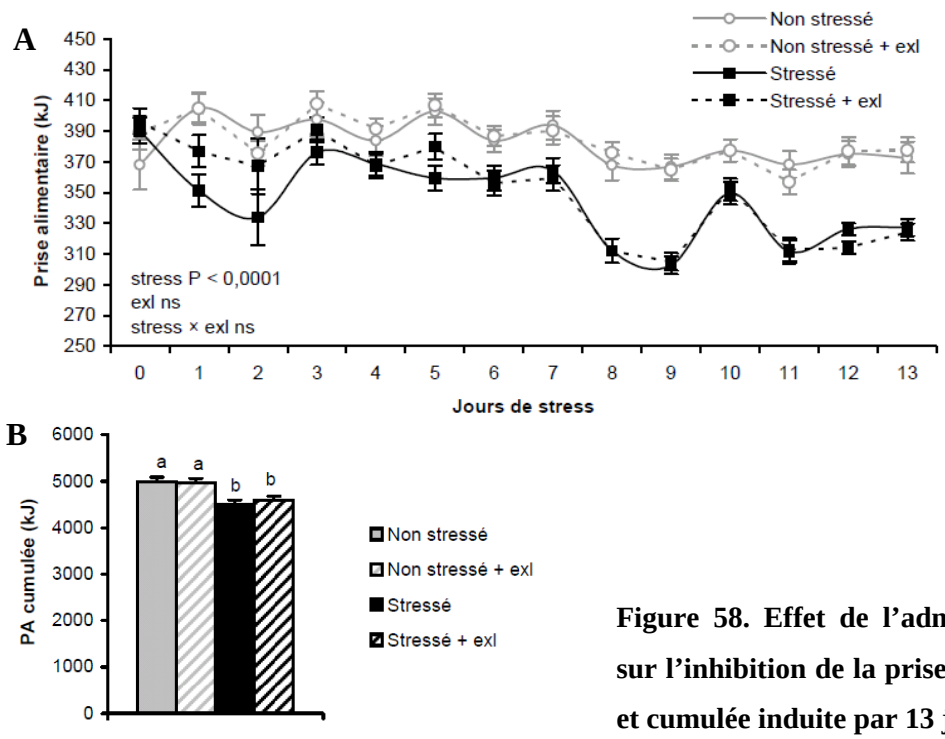


Figure 58. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'inhibition de la prise alimentaire quotidienne et cumulée induite par 13 jours de SCV.

La prise alimentaire sur 24 h est mesurée lors de l'exposition au SCV (A) et la prise alimentaire (PA) cumulée sur l'ensemble de cette période est calculée (B). L'ANOVA indique un effet du stress sur la prise alimentaire cumulée. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes. Ns : non significatif.

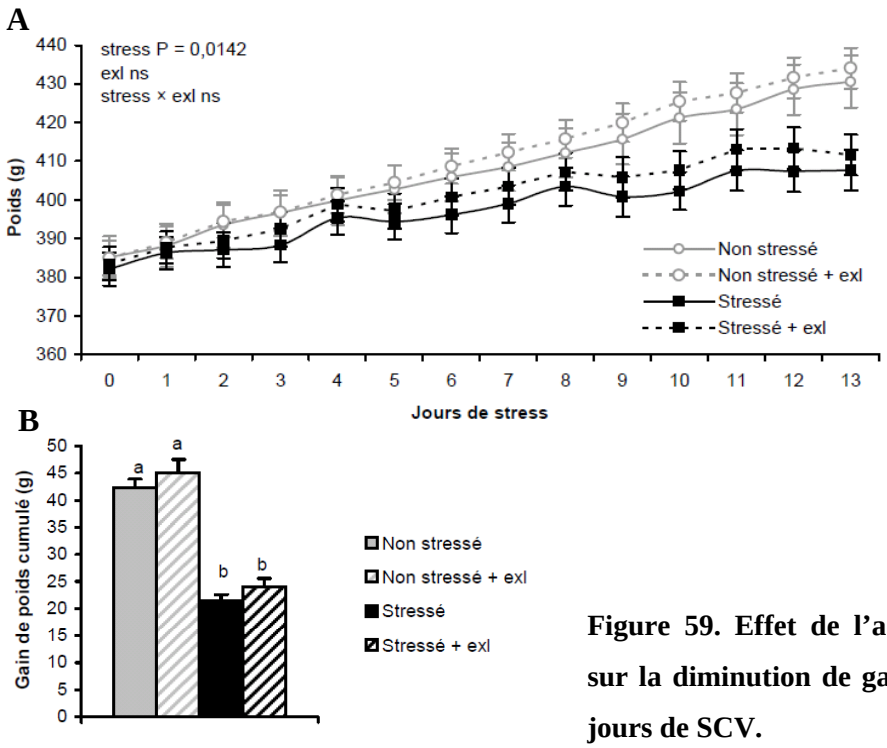
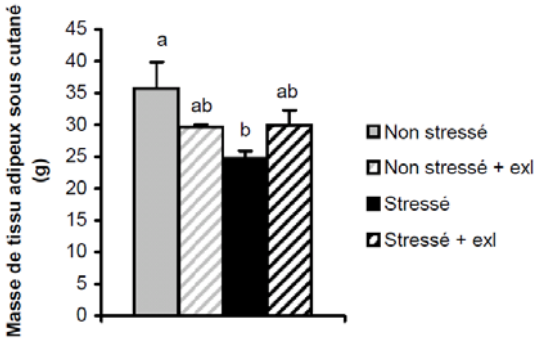


Figure 59. Effet de l'administration de l'exl2006 sur la diminution de gain de poids induite par 13 jours de SCV.

Le poids est mesuré chaque jour lors de l'exposition au SCV (A) et le gain de poids cumulé sur l'ensemble de cette période est calculé (B). L'ANOVA indique un effet du stress sur le gain de poids cumulé. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes. Ns : non significatif.

Figure 60. Effet de l'administration de l'exl2006 sur la diminution de masse de tissu adipeux sous cutané induite par 13 jours de SCV.

L'ANOVA indique un effet du stress et de l'interaction entre le stress et l'exl2006 sur la masse de tissu adipeux sous cutané. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.



L'analyse de la variance montre un effet du stress (P = 0,039) et de l'exl2006 (P = 0,030) sur l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF. Ainsi, l'expression du CRF est augmentée par le stress et diminuée par l'administration de l'exl2006 (Figure 61). De même, l'analyse de la variance montre un effet du stress (P = 0,030) et une tendance à un effet de l'exl2006 (P = 0,080) sur l'expression hypothalamique des ARNm codant le MOR. L'expression du MOR est augmentée par le stress et diminuée par l'administration de l'exl2006 (Figure 61).

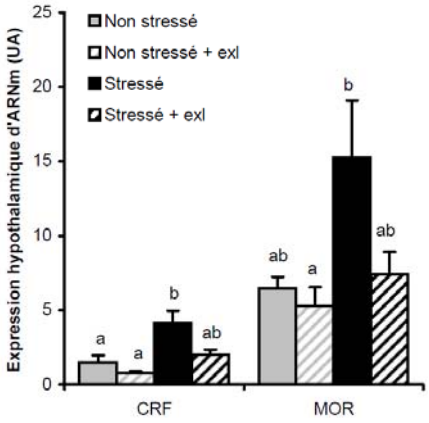


Figure 61. Effet de l'administration de l'exl2006 sur l'augmentation de l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF et le MOR induite par 13 jours de SCV.

L'ANOVA indique un effet du stress et de l'exl2006 sur l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF ainsi qu'un effet du stress et une tendance à un effet de l'exl2006 sur l'expression hypothalamique des ARNm codant le MOR. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes. UA : unité arbitraire.

4. Discussion

Les résultats concernant l'effet de l'exl2006 lors de l'application des différents modèles de stress sont récapitulés dans le tableau 26.

Tableau 26. Récapitulatif des résultats obtenus sur l'effet de l'exl2006 lors des différents modèles de stress étudiés.

Stresseur		Exl2006 ou diazépam	Effet du stress	Avec exl2006
Nage forcée 30 min		Diazépam	↘ PA1h	**↘ PA1h**
Contention 3 h		Diazépam	↘ PA24h	**↘ PA24h**
Nage forcée 30 min		Exl2006-1	↘ PA1h	↘ PA1h
Nage forcée 10 min		Exl2006-1	↘ PA1h	↘ PA1h
Contention 3 h	*1ère étude*	Exl2006-1	↘ PA24h	**↘ PA24h**
	Validation	Exl2006-1	↘ PA24h	↘ PA24h
Défaite sociale 1 h		Exl2006-2	↘ PA3h	↘ PA3h
Contention 3 h		Exl2006-2	↘ PA6h	↘ PA6h
		Exl2006-3		↘ PA6h
		Exl2006-4		↘ PA6h
		Exl2006-5		↘ PA6h
Contention 3 h	*1ère étude*	Exl2006-2	↗ CORT	**⇔ CORT**
		Exl2006-3		↗ CORT
		Exl2006-4		↗ CORT
		Exl2006-5		**⇔ CORT**
	Validation	Exl2006-2	↗ CORT	↗ CORT
		Exl2006-4		↗ CORT
SCV		Exl2006-2	↗ CORT	**↗ CORT**
			↗ anxiété	↗ anxiété
			↘ PA	↘ PA
			↘ Poids	↘ Poids
			↘ TA sc	↘ TA sc
			↗ CRF	**↗ CRF**
			↗ MOR	**↗ MOR**

Les résultats significatifs sont notés en gras et en rouge. Les flèches indiquent une diminution ou une augmentation du stress sur le paramètre considéré et les variations dans la taille des flèches permettent de mettre en évidence les effets de l'exl2006 (ou du diazépam). PA : prise alimentaire ; CORT : corticostérone ; TA sc : tissu adipeux sous cutané.

L'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu de nage forcée ou de contention peut être limitée par l'administration d'un agent anti-stress comme le diazépam. Ce résultat indique que l'inhibition de la prise alimentaire en tant que marqueur de stress peut être utilisée pour étudier l'effet anti-stress de l'exl2006. L'effet anti-stress de l'exl2006 mis en évidence lors

de l'étude réalisée avant ce travail (*cf.* Thèse A. Diane) sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress de nage forcée n'a pas été retrouvé puisque l'administration de l'exl2006 ne permet pas de limiter l'inhibition de la prise alimentaire induite par 10 min de nage forcée chez le rat. La divergence de ces résultats a été attribuée à une possible différence d'intensité, c'est pourquoi l'intensité du stress de nage forcée a été augmentée en prolongeant la durée du stresseur de 10 à 30 min. Bien que l'inhibition de la prise alimentaire à 1 h ait doublé suggérant une réelle augmentation de l'intensité du stress, les effets de l'exl2006 sont restés inchangés. Un autre type de stresseur a donc été testé. Dans une première expérience, l'inhibition de la prise alimentaire sur 24 h induite par le stress de contention est par l'administration de l'exl2006. Toutefois, cet effet n'est pas retrouvé lorsque l'expérience est reproduite. L'inhibition de la prise alimentaire à 3 h induite par le stress de défaite sociale n'a pas été limitée par l'administration de l'exl2006, de manière similaire au modèle de nage forcée. L'utilisation du modèle de défaite sociale pour se rapprocher du modèle de stress chez la poulette est intéressante car ce stresseur permet de reproduire l'établissement de la hiérarchie sociale se produisant au sein des élevages de volaille. Néanmoins, notre modèle n'induit pas d'autres modifications qu'une inhibition de la prise alimentaire et sa mise en place n'est peut être pas encore assez précise pour pouvoir l'exploiter dans le cadre de l'étude de l'effet anti-stress de l'exl2006. L'ensemble de ces premiers résultats suggèrent que l'exl2006 n'a que peu d'effet sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu. Ce paramètre n'est donc pas un marqueur de stress pertinent pour déterminer l'effet anti-stress de l'exl2006 lors d'un stress aigu. La concentration plasmatique de corticostérone, marqueur de stress classique, a donc été également évaluée suite au stress de contention. Par ailleurs, une des hypothèses expliquant la divergence entre nos résultats et ceux obtenus lors de l'étude réalisée chez le rat avant cette thèse (*cf.* Thèse A. Diane) est qu'il existe une variabilité de l'efficacité de l'exl2006 entre les différents lots de production utilisés. L'impact du lot de production sur l'effet anti-stress de l'exl2006 a donc été évalué. Sur les 4 lots de production de l'exl2006 testés, 2 lots ont montré un effet anti-stress en inhibant l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par la contention. Par contre, ces extraits de levure n'ont pas eu d'effet sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par la contention. Ces résultats indiquent qu'il existe une forte variabilité entre les différents lots de production de l'exl2006. D'autre part, ces résultats suggèrent que l'action anti-stress de l'exl2006 n'est vraisemblablement pas très puissante puisqu'elle ne permet pas de rétablir les effets du stress sur le comportement alimentaire. L'effet anti-stress sur le taux de corticostérone n'est pas retrouvé lors de la répétition de l'expérience. L'absence de reproductibilité de l'effet anti-stress de l'exl2006 aussi bien sur l'inhibition de la prise alimentaire que sur l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par un stress aigu peut suggérer que

l'effet anti-stress de l'exl2006 est faible puisque la variabilité inhérente à 2 études au protocole identique mais réalisées à différents moments et avec différents animaux rend cet effet non significatif. Le ou les principe(s) actif(s) étant méconnu(s), il est également possible que celui-ci ou ceux-ci soi(en)t plus ou moins présent(s) dans chaque lot de production mais également qu'il(s) s'y dégrade(nt) plus ou moins vite.

L'administration de l'exl2006 n'a pas d'effet sur la diminution de la prise alimentaire et du poids, l'augmentation du niveau d'anxiété et de la concentration plasmatique de corticostérone induite par le SCV. Par contre, l'exl2006 permet d'inhiber l'augmentation de l'expression hypothalamique des ARNm codant le CRF induite par le SCV. De plus, bien que l'exl2006 n'ait pas d'effet significatif sur la concentration plasmatique de corticostérone, il semble que l'administration de l'exl2006 induise une moindre augmentation. Ainsi, l'exl2006 semble limiter l'activation chronique de l'axe corticotrope lors du SCV.

L'administration de l'exl2006 inhibe l'augmentation de l'expression hypothalamique de MOR induite par le SCV. Les opioïdes jouent un rôle dans le stress car leur libération inhibe l'activation de l'axe corticotrope permettant de diminuer les effets neuroendocrines et les réponses du système nerveux autonome induits par le stress (Drolet *et al.*, 2001). Le stress entraîne une augmentation de la libération d'opioïdes endogènes et l'augmentation de l'expression de MOR pourrait être un effet adaptatif de l'organisme permettant d'optimiser l'action des opioïdes sur la régulation des réponses au stress (Drolet *et al.*, 2001). Nos résultats sont en accord avec la littérature puisque, suite à l'exposition à un agent stressant, une augmentation de l'expression de MOR a été observée dans différentes zones du cerveau, telles l'hypothalamus et l'aire tegmentale ventrale (Kiritsy-Roy *et al.*, 1986; Nikulina *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2003; Nikulina *et al.*, 2005). L'interprétation de l'effet de l'exl2006 sur l'augmentation de l'expression de MOR est complexe puisque le rôle d'un récepteur dépend non seulement de son expression mais aussi de l'efficacité de la liaison avec son ligand. Les tests *in vitro* réalisés par Lucie Catiau semblent indiquer que l'exl2006 pourrait être un agoniste du MOR. L'administration d'agonistes du MOR en conditions stressantes permet d'inhiber la réponse au stress (Kiritsy-Roy *et al.*, 1986; degli Uberti *et al.*, 1995). Ainsi, il est possible que l'effet anti-stress de l'exl2006 passe par une modulation du système opioïdergique. L'inhibition de l'augmentation de l'expression de MOR induite par le SCV mis en évidence lors de l'administration de l'exl2006 pourrait alors s'expliquer par le fait que cette augmentation n'est plus nécessaire pour optimiser l'action des opioïdes endogènes étant donné la présence d'agonistes aux opioïdes issus de l'alimentation. Il est également possible que cette inhibition

soit simplement secondaire à l'inhibition de l'activation chronique de l'axe corticotrope par l'exl2006.

De plus, bien que l'exl2006 n'ait pas d'effet sur la diminution du poids induite par le SCV, le fait d'administrer de l'exl2006 semble permettre de limiter la réduction de tissu adipeux. La plus faible augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone induite par SCV grâce à l'exl2006 pourrait expliquer cet effet puisque la réduction de tissu adipeux sous-cutané liée au SCV est vraisemblablement due, en partie, à l'effet lipolytique de la corticostérone.

Ainsi, l'administration durant 4 semaines de l'exl2006 permet de diminuer l'activation chronique de l'axe corticotrope induite par le SCV. Les mécanismes d'action de l'exl2006 restent à déterminer et bien qu'une action opioïdergique soit envisageable, il existe de nombreuses autres pistes (action centrale sur les autres systèmes régulateurs des systèmes de stress comme la dopamine ou la sérotonine par exemple, action périphérique, etc.).

Grâce aux modèles de stress aigus, nous avons mis en évidence que l'extrait de levure exl2006 présentait un effet anti-stress mais vraisemblablement peu puissant, variable selon le lot de production et non reproductible dans le temps. Il est donc important de valider les résultats obtenus sur l'effet anti-stress de l'exl2006 lors du SCV en répétant cette étude.

Par ailleurs, la comparaison des modèles aigus et chronique lors desquels l'effet anti-stress de l'exl2006 a été testé, permet de mettre en évidence un effet plus important de l'exl2006 lorsqu'il est administré en chronique par rapport à l'administration sur une période plus courte. Lors des études sur les modèles de stress aigus, l'exl2006 est administré pendant quelques jours (6 à 8 jours) par contre lors de l'étude sur l'effet de l'exl2006 lors du SCV, l'exl2006 est administré pendant 4 semaines. Le lot de production de l'exl2006 utilisé lors de l'étude chronique est un des lots ayant montré un effet anti-stress non reproductible sur la concentration plasmatique de corticostérone suite à la contention. L'étude sur le SCV a été réalisée après les études sur le stress de contention suggérant que l'exl2006 ne présentait plus d'effet anti-stress administré en aigu mais présentait toujours un effet administré en chronique. Cela corrobore l'effet anti-stress de l'administration chronique de l'exl2006 observé lors de l'application de stress chronique chez la poulette future pondeuse.

En conclusion, les expériences réalisées sur l'effet anti-stress de l'exl2006 ont permis de mettre en évidence que l'exl2006 permet de limiter l'activation de l'axe corticotrope en cas de stress aigu ou chronique, cet effet semblant plus important lors d'une administration chronique par rapport à une administration aiguë. L'exl2006 n'a pas d'effet sur l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu ou chronique, ce qui suggère que l'effet anti-stress de ce

produit n’est vraisemblablement pas assez fort pour rétablir cette adaptation comportemental liée au stress. De plus, nous avons également montré que l’action anti-stress de l’exl2006 est dépendante du lot de production et non reproductible.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif initial de ce travail était d'étudier l'effet anti-stress d'un extrait de levure chez le rat. Dans cette optique, des modèles de stress aigus de nage forcée, de contention, de défaite sociale et un modèle de stress chronique variable ont été développés. L'inhibition de la prise alimentaire a été choisie comme marqueur pour mettre en évidence les propriétés anti-stress de notre produit. Ainsi, après validation des modèles, l'effet d'un stress aigu ou chronique sur l'inhibition de la prise alimentaire a été étudié chez le rat.

Nous avons mis en évidence que l'exl2006 présente un effet anti-stress en limitant l'activation de l'axe corticotrope en cas de stress et que cet effet est variable selon le lot de production et souvent non reproductible. La détermination du principe actif anti-stress est nécessaire pour déterminer les lots d'exl2006 efficace à approfondir l'effet anti-stress de notre produit. Il est probable que les modèles et marqueurs de stress choisis n'aient pas été les plus pertinents pour déterminer de l'effet anti-stress de l'exl2006 et il est désormais à envisager d'étudier l'effet de l'administration de l'exl2006 sur un plus grand nombre de marqueurs de stress pour permettre une vision plus globale de l'effet anti-stress de notre produit.

L'effet de l'exl2006 lors de l'étude chez la poulette a été attribué au stress mais ce n'est peut être pas le cas. En effet, lors de cette étude, le retrait de la litière et la restriction alimentaire ont induit une augmentation du picage chez les poulettes mise sur le compte d'une augmentation du stress. Le picage est un phénomène multi-factoriel et il est fort probable que les modifications des conditions environnementales et des habitudes alimentaires des poulettes aient induit un stress engendrant le picage. Néanmoins, il est envisageable que l'augmentation du picage puisse être causée par ces modifications sans induire de stress. Par exemple, il est possible que le fait de retirer la litière entraîne une redirection du picorage des poulettes de la litière vers les congénères (Nicol *et al.*, 2001; Sedlackova *et al.*, 2004). Afin de vérifier que le protocole de stress chez la poulette est efficace et induit un stress et de valider l'effet anti-stress de l'exl2006, une seconde étude chez la poule va être réalisée en mesurant, en parallèle de l'apparition du phénomène de picage, des marqueurs de stress classiques chez les volailles comme la concentration plasmatique de corticostérone et le rapport du nombre d'hétérophiles sur le nombre de lymphocytes du sang total (Gross & Siegel, 1983; de Jong *et al.*, 2002; Post *et al.*, 2003). Il est également possible que le picage soit relié à une augmentation de l'agressivité[28]

[28] L'agression est définie de manière opérationnelle comme la forme d'activité dans laquelle deux animaux (ou plus) présentent un profil comportemental incluant des attaques physiques et/ou des réactions de défense comme la poursuite et la fuite. L'agressivité d'un animal correspond à la survenue d'épisode d'agression (Matte AC (1979) A method of quantitating aggressive behaviour revealing possible dissociation of motor activity and aggression. *Psychopharmacology (Berl)* **60**, 247-251.).

induite par le stress, le picage mis en œuvre serait alors un picage agressif. Dans cette optique, il est possible que l'étude chez la poulette ait mis en évidence un effet de l'extrait de levure sur le niveau d'agressivité sans forcément réguler le stress. L'exl2006 pourrait être un produit permettant de lutter contre l'agressivité et non un produit anti-stress. Chez le rat, l'agressivité de l'animal peut être déterminée grâce à des études d'interactions sociales : 2 rats sont mis en contact et leurs comportements sont filmés et répertoriés (temps de latence avant l'attaque, nombre d'attaques, etc.) (Gammie & Stevenson, 2006; Wallinga *et al.*, 2009; Suzuki & Lucas, 2010). L'effet de l'exl2006 lors d'une étude de ce type permettrait de déterminer l'effet du produit sur l'agressivité des rats.

Nous avons montré que l'exposition aiguë à un stress de contention, de nage forcée ou de défaite sociale induit une inhibition de la prise alimentaire chez le rat dans le cadre d'un régime standard. Afin de mieux comprendre les mécanismes comportementaux à l'origine de cette inhibition, les effets du stress de contention et de nage forcée sur les profils de structure des repas et la séquence comportementale de satiété (BSS) ont été déterminés. A notre connaissance, la technique des profils de structure des repas a été très peu utilisée pour étudier l'inhibition de la prise alimentaire induite par le stress et aucune étude n'a déterminé l'effet d'un stress sur la BSS. Or ces techniques apportent de nombreux éléments de compréhension des mécanismes de contrôle du comportement alimentaire. L'analyse de la structure du repas permet de discriminer une diminution de la prise alimentaire induite par des mécanismes de satiété, de rassasiement ou d'aversion gustative (Castonguay *et al.*, 1986; Feurte *et al.*, 2002; Bensaid *et al.*, 2003). La construction de la BSS ainsi que l'analyse des comportements non alimentaires associés à la consommation du rongeur peut mettre en avant des différences entre 2 situations où la prise alimentaire est diminuée de manière quantitativement similaire permettant ainsi d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes à l'origine de ces effets (Halford *et al.*, 1998; Rodgers *et al.*, 2010). L'analyse de la BSS permet donc d'obtenir des informations complémentaires des profils de structure de repas. Grâce à l'évaluation des profils de structure des repas associée à la détermination de la BSS, nous avons montré qu'un stress aigu induit une diminution de la prise alimentaire du fait d'une augmentation du rassasiement. Nous avons également observé que le stress aigu induit une augmentation du toilettage et il est possible que le temps consacré à ce comportement entraîne une diminution du temps consacré à la prise alimentaire et donc indirectement, une diminution des quantités ingérées. Au-delà des données obtenues, nos résultats permettent de mettre en avant la pertinence de l'utilisation complémentaire de ces 2 techniques d'évaluation du comportement alimentaire chez le rat. De plus, nous avons montré que l'exposition durant 2 semaines à un stress chronique variable induit une diminution de la

prise alimentaire chez le rat dans le cadre d'un régime standard. L'évaluation des profils de structure des repas et de la BSS n'a pas été réalisée lors du stress chronique mais serait pertinente. Ainsi, en utilisant ces techniques 1 ou 2 jours après la fin de l'exposition au SCV pour s'affranchir de l'effet aigu des stresseurs, les mécanismes comportementaux à l'origine de l'anorexie induite par un stress chronique pourraient être déterminés.

Grâce à la détermination de l'expression des ARNm hypothalamiques codant le CRF, le NPY et la POMC, nous avons montré que l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu est liée à une augmentation de l'expression de POMC. La POMC, précurseur de l'α-MSH, est un neuropeptide pouvant être impliqué dans le rassasiement mais également dans le toilettage. Le CRF semble également impliqué dans le rassasiement et le toilettage induits par le stress. Notre hypothèse concernant les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire par un stress aigu est la suivante (Figure 62). Le stress aigu induit une augmentation de l'expression du CRF au niveau du PVN. Cette augmentation est liée à l'activation par le stress aigu des neurones CRF projetant vers l'hypophyse et stimulant la libération d'ACTH pour mettre en place la réponse de l'axe corticotrope. Cette augmentation peut être également liée à la stimulation, par le stress aigu, des neurones CRF du PVN projetant vers l'ARC et le NTS. Les neurones CRF stimulent alors les neurones POMC de l'ARC et libèrent du CRF au niveau du NTS. Il est également envisageable que le stress induise une activation des neurones CRF directement au niveau du NTS. Le lien entre les neurones CRF du PVN et les neurones POMC de l'ARC n'étant pas totalement établi, d'autres mécanismes peuvent être à l'origine d'une stimulation des neurones POMC de l'ARC entraînant libération d'α-MSH au niveau du NTS suite au stress aigu. Dans tous les cas, l'α-MSH et le CRF libérés au niveau du NTS participent alors à l'augmentation du rassasiement. L'α-MSH et le CRF libérés centralement induisent en parallèle une augmentation du toilettage limitant alors le temps disponible à tout autre comportement incluant la prise alimentaire.

Nous avons également montré une augmentation de l'expression de CRF ainsi qu'une légère diminution de l'expression de NPY au niveau de l'hypothalamus suite à l'exposition au SCV. Notre hypothèse concernant les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress chronique est la suivante (Figure 63). L'exposition à un stress chronique induit une hyperactivation de l'axe corticotrope et une augmentation chronique de l'expression du CRF au niveau du PVN de l'hypothalamus. Cette augmentation est liée à une stimulation des neurones CRF activant l'axe corticotrope permettant de maintenir un état de stress chronique chez les animaux. Cette augmentation est également liée à une stimulation des neurones CRF relayant l'effet anorexigène de ce neuropeptide. Cet effet anorexigène pourrait être direct et/ou partiellement induit par une inhibition des neurones orexigènes NPY de l'ARC par les neurones

CRF du PVN. Le lien entre les neurones CRF du PVN et les neurones NPY de l'ARC n'étant pas totalement établi, il est possible qu'un autre mécanisme induise une inhibition des neurones NPY de l'ARC suite au stress chronique.

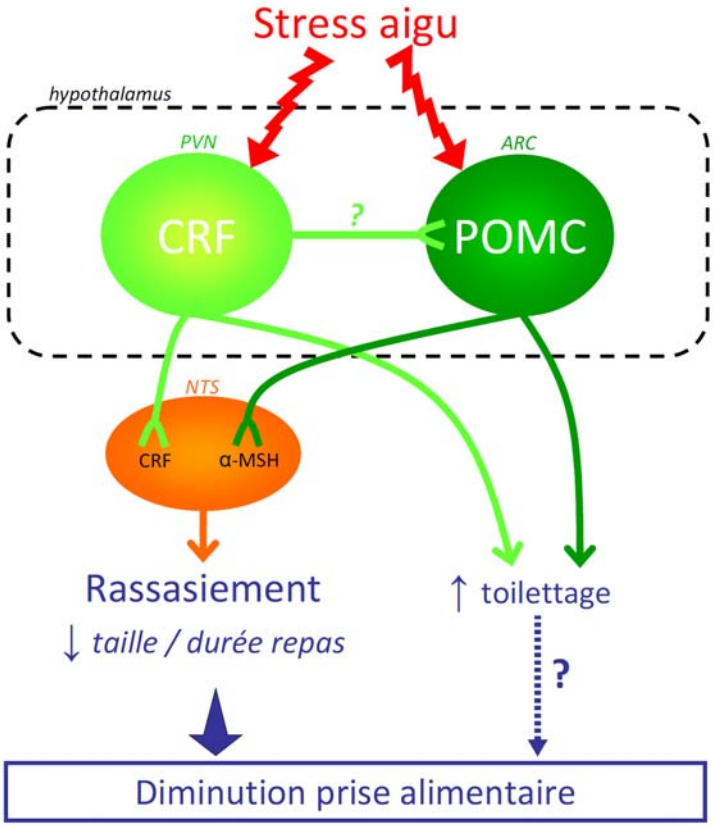


Figure 62. Hypothèses concernant les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu.

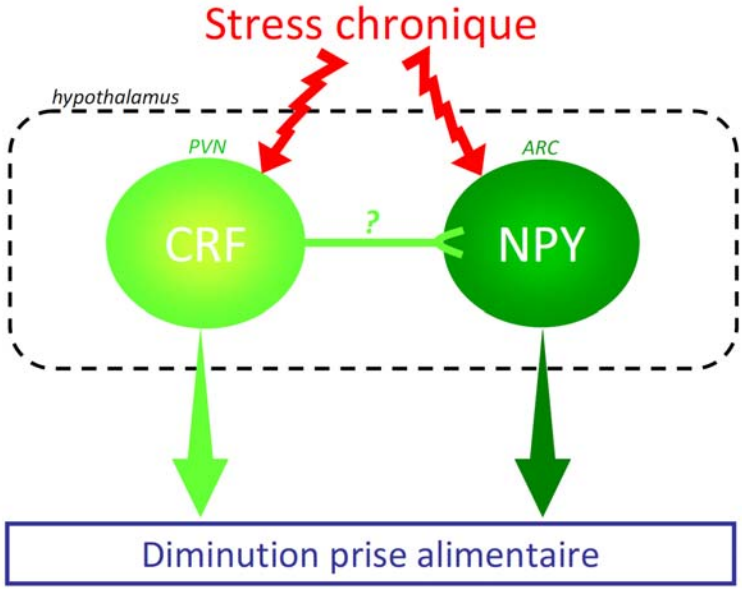


Figure 63. Hypothèses concernant les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress chronique.

Nous avons également montré une augmentation de l'expression de CRF ainsi qu'une légère diminution de l'expression de NPY au niveau de l'hypothalamus suite à l'exposition au SCV. Notre hypothèse concernant les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress chronique est la suivante (Figure 63). L'exposition à un stress chronique induit une hyperactivation de l'axe corticotrope et une augmentation chronique de l'expression du CRF au niveau du PVN de l'hypothalamus. Cette augmentation est liée à une stimulation des neurones CRF activant l'axe corticotrope permettant de maintenir un état de stress chronique chez les animaux. Cette augmentation est également liée à une stimulation des neurones CRF relayant l'effet anorexigène de ce neuropeptide. Cet effet anorexigène pourrait être direct et/ou partiellement induit par une inhibition des neurones orexigènes NPY de l'ARC par les neurones CRF du PVN. Le lien entre les neurones CRF du PVN et les neurones NPY de l'ARC n'étant pas totalement établi, il est possible qu'un autre mécanisme induise une inhibition des neurones NPY de l'ARC suite au stress chronique.

Le prélèvement de l'ARC et du PVN ainsi que la détermination de l'expression des ARNm codant le CRF, le NPY et la POMC au sein de ces noyaux suite à un stress aigu ou chronique serait une première étape pour vérifier ces hypothèses. En outre, il est important de valider par des mécanismes physiologiques et non plus comportementaux, l'implication du rassasiement dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par un stress aigu. Pour cela, nous pourrions étudier l'activation des neurones au sein du NTS par marquage de la protéine c-fos mais également évaluer l'impact de l'injection d'antagonistes de l'α-MSH et du CRF au niveau du tronc cérébral pour déterminer leurs rôles respectifs lors de l'étude des profils de structure des repas suite à l'exposition à un stress aigu.

Nous avons vu dans l'introduction bibliographique que le stress induit une augmentation de l'ingestion d'aliments palatables proposés aux animaux en plus de leur régime habituel mais aussi que le régime pouvait influencer la réponse de stress. La relation entre prise alimentaire et stress est donc clairement bidirectionnelle. De plus, le stress a un effet sur la composition corporelle par l'action des glucocorticoïdes sur l'accumulation de tissu adipeux abdominal. Le stress participe donc à l'épidémie actuelle de surpoids et d'obésité et étudier les interrelations entre le stress et différents régimes (palatables, riches en lipides, etc.) est donc essentiel pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et proposer des solutions. Les modèles de stress mis en place au laboratoire pourront permettre d'étudier l'effet du stress sur l'ingestion de différents régimes mais également l'effet de différents régimes sur la réponse de stress. L'utilisation des profils de structure de repas et de la BSS pour comprendre les mécanismes comportementaux mis en place dans les différentes conditions et les comparer à nos données en conditions de régime standard serait intéressante. En outre, nous avons réalisé une première

expérimentation utilisant la technique de l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) dans le cadre de l'étude du stress chronique. Cette étude avait pour objectif de déterminer les changements survenant dans le cerveau suite à l'exposition au SCV chez le rat. Les résultats de cette étude n'ont pas été concluants. Néanmoins, dans le cadre de l'étude de l'effet du stress sur l'ingestion d'aliments palatables, l'utilisation de l'IRM semble également très pertinente. En effet, suite au stress, l'augmentation de l'ingestion d'aliments palatables du régime est liée au système de récompense et l'IRM permettrait de mettre en évidence les régions du cerveau effectivement concernées.

Ainsi, les modèles de stress mis en place durant ce travail de thèse initialement pour caractériser un produit anti-stress ont permis d'étudier l'inhibition de la consommation d'un régime standard chez le rat. Ces modèles pourront être utilisés pour poursuivre ces investigations en étudiant dans le détail la relation entre stress et prise alimentaire dans différentes conditions de régimes et mieux comprendre l'implication du stress dans la survenue de surpoids et d'obésité chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

Rapports

Baromètre santé 2005 Attitudes et comportements de santé. Beck F., Guilbert P., Gautier A. (dir.). Saint-Denis, INPES, coll. Baromètres santé, 2007 : 608 p.
http://www.inpes.fr/70000/dp/06/dp060309.pdf

Le stress au travail, Rapport d'analyse ANACT -.CSA. Mars 2009.
http://www.csa.eu/dataset/data2009/opi20090401-le-stress-au-travail.pdf

Rapport annuel 2009 de l'agence européenne pour la santé et la sécurité au travail (EU-OSHA).
http://osha.europa.eu/en/publications/annual_report/2009full

La santé mentale, l'affaire de tous. Pour une approche cohérente de la qualité de la vie. Rapport remis à Mme Nathalie Kosciusko-Morizet, secrétaire d'État en charge de la Prospective et du Développement de l'Économie numérique, le 17 novembre 2009. Groupe de travail « Santé mentale et déterminant du bien-être », présidé par Mme Viviane Kovess-Masfety. Travaux coordonnés et rédigés par Marine Boisson, Clélia Godot et Sarah Sauneron.
http://www.strategie.gouv.fr/IMG/pdf/RAPPORT_Sante_mentale_version_18nov09validdqs2.pdf

Le bon usage des médicaments psychotropes. Rapport N° 422 (2005-2006) de Mme Maryvonne BRIOT, député, fait au nom de l'Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé, déposé au Sénat le 22 juin 2006
http://www.assemblee-nationale.fr/12/rap-off/i3187.asp

Thèse

Diane A. Stress, axe corticotrope et caractéristiques nutritionnelles et métaboliques. Thèse soutenue en décembre 2006 à l'AgroParisTech.

Publication scientifiques

- Abdel-Malek ZA (2001) Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci* **58**, 434-441.
- Abou-Samra AB, Harwood JP, Catt KJ & Aguilera G (1987) Mechanisms of action of CRF and other regulators of ACTH release in pituitary corticotrophs. *Ann N Y Acad Sci* **512**, 67-84.
- Adam TC & Epel ES (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* **91**, 449-458.
- Aguilera G (1998) Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metab* **9**, 329-336.
- Akabayashi A, Watanabe Y, Wahlestedt C, McEwen BS, Paez X & Leibowitz SF (1994) Hypothalamic neuropeptide Y, its gene expression and receptor activity: relation to circulating corticosterone in adrenalectomized rats. *Brain Res* **665**, 201-212.
- Akana SF & Dallman MF (1997) Chronic cold in adrenalectomized, corticosterone (B)-treated rats: facilitated corticotropin responses to acute restraint emerge as B increases. *Endocrinology* **138**, 3249-3258.
- Akana SF, Hanson ES, Horsley CJ, Strack AM, Bhatnagar S, Bradbury MJ, Milligan ED & Dallman MF (1996) Clamped Corticosterone (B) Reveals the Effect of Endogenous B on Both Facilitated Responsivity to Acute Restraint and Metabolic Responses to Chronic Stress. *Stress* **1**, 33-49.
- Antelman SM & Szechtman H (1975) Tail pinch induces eating in sated rats which appears to depend on nigrostriatal dopamine. *Science* **189**, 731-733.
- Antelman SM, Szechtman H, Chin P & Fisher AE (1975) Tail pinch-induced eating, gnawing and licking behavior in rats: dependence on the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* **99**, 319-337.
- Arima H & Aguilera G (2000) Vasopressin and oxytocin neurones of hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei co-express mRNA for Type-1 and Type-2 corticotropin-releasing hormone receptors. *J Neuroendocrinol* **12**, 833-842.
- Armario A, Gavalda A & Marti J (1995) Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology* **20**, 879-890.
- Armario A, Hidalgo J & Giralt M (1988) Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology* **47**, 263-267.
- Armario A, Marti J & Gil M (1990) The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* **15**, 341-347.
- Armario A, Ortiz R & Balasch J (1984) Effect of crowding on some physiological and behavioral variables in adult male rats. *Physiol Behav* **32**, 35-37.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Fujimiya M, Katsuura G, Makino S, Fujino MA & Kasuga M (2001) A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* **74**, 143-147.
- Asarian L & Langhans W (2010) A new look on brain mechanisms of acute illness anorexia. *Physiol Behav* **100**, 464-471.
- Aston-Jones G & Cohen JD (2005) An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci* **28**, 403-450.
- Badiani A, Jakob A, Rodaros D & Stewart J (1996) Sensitization of stress-induced feeding in rats repeatedly exposed to brief restraint: the role of corticosterone. *Brain Res* **710**, 35-44.
- Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS & Watson SJ (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* **19**, RC26.
- Bale TL & Vale WW (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 525-557.
- Ballard TM, Woolley ML, Prinssen E, Huwyler J, Porter R & Spooren W (2005) The effect of the mGlu5 receptor antagonist MPEP in rodent tests of anxiety and cognition: a comparison. *Psychopharmacology (Berl)* **179**, 218-229.
- Barnes PJ (2006) Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* **27**, 413-426.
- Barnum CJ, Blandino P, Jr. & Deak T (2007) Adaptation in the corticosterone and hyperthermic responses to stress following repeated stressor exposure. *J Neuroendocrinol* **19**, 632-642.
- Barrot M, Abrous DN, Marinelli M, Rouge-Pont F, Le Moal M & Piazza PV (2001) Influence of glucocorticoids on dopaminergic transmission in the rat dorsolateral striatum. *Eur J Neurosci* **13**, 812-818.
- Barrot M, Marinelli M, Abrous DN, Rouge-Pont F, Le Moal M & Piazza PV (1999) Functional heterogeneity in dopamine release and in the expression of Fos-like proteins within the rat striatal complex. *Eur J Neurosci* **11**, 1155-1166.
- Bartolomucci A, Pederzani T, Sacerdote P, Panerai AE, Parmigiani S & Palanza P (2004) Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* **29**, 899-910.

- Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Jr. & Schwartz MW (1999) Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* **848**, 114-123.
- Baubet V, Fevre-Montange M, Gay N, Debilly G, Bobillier P & Cespuglio R (1994) Effects of an acute immobilization stress upon proopiomelanocortin (POMC) mRNA levels in the mediobasal hypothalamus: a quantitative in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* **26**, 163-168.
- Beaumont C, Lebihan-Duval E, Mignon-Grasteau S & Leterrier C (2010) The European experience in poultry welfare--a decade ahead. *Poult Sci* **89**, 825-831.
- Bedanova I, Voslarova E, Chloupek P, Pistekova V, Suchy P, Blahova J, Dobsikova R & Vecerek V (2007) Stress in broilers resulting from shackling. *Poult Sci* **86**, 1065-1069.
- Bell ME, Bhargava A, Soriano L, Laugero K, Akana SF & Dallman MF (2002) Sucrose intake and corticosterone interact with cold to modulate ingestive behaviour, energy balance, autonomic outflow and neuroendocrine responses during chronic stress. *J Neuroendocrinol* **14**, 330-342.
- Bell ME, Bhatnagar S, Liang J, Soriano L, Nagy TR & Dallman MF (2000) Voluntary sucrose ingestion, like corticosterone replacement, prevents the metabolic deficits of adrenalectomy. *J Neuroendocrinol* **12**, 461-470.
- Bello NT, Sweigart KL, Lakoski JM, Norgren R & Hajnal A (2003) Restricted feeding with scheduled sucrose access results in an upregulation of the rat dopamine transporter. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**, R1260-1268.
- Benoit SC, Thiele TE, Heinrichs SC, Rushing PA, Blake KA & Steeley RJ (2000) Comparison of central administration of corticotropin-releasing hormone and urocortin on food intake, conditioned taste aversion, and c-Fos expression. *Peptides* **21**, 345-351.
- Bensaid A, Tome D, L'Heureux-Bourdon D, Even P, Gietzen D, Morens C, Gaudichon C, Larue-Achagiotis C & Fromentin G (2003) A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol Behav* **78**, 311-320.
- Bergmann MW, Staples KJ, Smith SJ, Barnes PJ & Newton R (2004) Glucocorticoid inhibition of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor from T cells is independent of control by nuclear factor-kappaB and conserved lymphokine element 0. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 555-563.
- Bernard C (1878-1879) *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*. Paris: Baillière.
- Bernet F, Montel V, Noel B & Dupouy JP (2000) Diazepam-like effects of a fish protein hydrolysate (Gabolysat PC60) on stress responsiveness of the rat pituitary-adrenal system and sympathoadrenal activity. *Psychopharmacology (Berl)* **149**, 34-40.
- Berridge KC (2004) Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav* **81**, 179-209.
- Bert B, Fink H, Sohr R & Rex A (2001) Different effects of diazepam in Fischer rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* **70**, 411-420.
- Berthoud HR (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 393-428.
- Berthoud HR (2004) Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol Behav* **81**, 781-793.
- Bertolini A, Tacchi R & Vergoni AV (2009) Brain effects of melanocortins. *Pharmacol Res* **59**, 13-47.
- Bhatnagar S, Bell ME, Liang J, Soriano L, Nagy TR & Dallman MF (2000) Corticosterone facilitates saccharin intake in adrenalectomized rats: does corticosterone increase stimulus salience? *J Neuroendocrinol* **12**, 453-460.
- Bhatnagar S & Dallman M (1998) Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* **84**, 1025-1039.
- Bhatnagar S & Meaney MJ (1995) Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J Neuroendocrinol* **7**, 97-108.
- Bhatnagar S & Vining C (2003) Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Horm Behav* **43**, 158-165.
- Bhatnagar S, Vining C, Iyer V & Kinni V (2006) Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. *J Neuroendocrinol* **18**, 13-24.
- Bielajew C, Konkle AT & Merali Z (2002) The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses. *Behav Brain Res* **136**, 583-592.
- Binnert C, Ruchat S, Nicod N & Tappy L (2004) Dexamethasone-induced insulin resistance shows no gender difference in healthy humans. *Diabetes Metab* **30**, 321-326.
- Bjorntorp P (1996) The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* **20**, 291-302.
- Bjorntorp P (2001) Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes Rev* **2**, 73-86.
- Blanchard RJ, McKittrick CR & Blanchard DC (2001) Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav* **73**, 261-271.
- Bloom FE, Battenberg EL, Rivier J & Vale W (1982) Corticotropin releasing factor (CRF): immunoreactive neurones and fibers in rat hypothalamus. *Regul Pept* **4**, 43-48.

- Blundell J, de Graaf C, Hulshof T, Jebb S, Livingstone B, Lluch A, Mela D, Salah S, Schuring E, van der Knaap H & Westerterp M (2010) Appetite control: methodological aspects of the evaluation of foods. *Obes Rev* **11**, 251-270.
- Bowers G, Cullinan WE & Herman JP (1998) Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci* **18**, 5938-5947.
- Bradbury MJ, Cascio CS, Scribner KA & Dallman MF (1991) Stress-induced adrenocorticotropin secretion: diurnal responses and decreases during stress in the evening are not dependent on corticosterone. *Endocrinology* **128**, 680-688.
- Brindley DN, Cooling J, Glenny HP, Burditt SL & McKechnie IS (1981) Effects of chronic modification of dietary fat and carbohydrate on the insulin, corticosterone and metabolic responses of rats fed acutely with glucose, fructose or ethanol. *Biochem J* **200**, 275-283.
- Brobeck JR (1997) Food intake as a mechanism of temperature regulation. 1948. *Obes Res* **5**, 641-645.
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M & Hokfelt T (1998) The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15043-15048.
- Bryant EJ, King NA & Blundell JE (2008) Disinhibition: its effects on appetite and weight regulation. *Obes Rev* **9**, 409-419.
- Buckingham JC (2006) Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S258-268.
- Buitenhuis AJ, Rodenburg TB, Wissink PH, Visscher J, Koene P, Bovenhuis H, Ducro BJ & van der Poel JJ (2004) Genetic and phenotypic correlations between feather pecking behavior, stress response, immune response, and egg quality traits in laying hens. *Poult Sci* **83**, 1077-1082.
- Buitenhuis B, Hedegaard J, Janss L & Sorensen P (2009) Differentially expressed genes for aggressive pecking behaviour in laying hens. *BMC Genomics* **10**, 544.
- Burdakov D, Luckman SM & Verkhratsky A (2005) Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 2227-2235.
- Buynitsky T & Mostofsky DI (2009) Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* **33**, 1089-1098.
- Buzas B & Cox BM (1997) Quantitative analysis of mu and delta opioid receptor gene expression in rat brain and peripheral ganglia using competitive polymerase chain reaction. *Neuroscience* **76**, 479-489.
- Campfield LA & Smith FJ (1983) Neural control of insulin secretion: interaction of norepinephrine and acetylcholine. *Am J Physiol* **244**, R629-634.
- Cannon WB (1929a) *Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage*.
- Cannon WB (1929b) Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.* **9**, 399-431.
- Cannon WB (1932) *The Wisdom of the Body*. New York: W. W. Norton.
- Carey GB (1998) Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol* **441**, 157-170.
- Carli M, Prontera C & Samanin R (1989) Effect of 5-HT1A agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. *Neuropharmacology* **28**, 471-476.
- Carrasco GA & Van de Kar LD (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* **463**, 235-272.
- Castonguay TW, Kaiser LL & Stern JS (1986) Meal pattern analysis: artifacts, assumptions and implications. *Brain Res Bull* **17**, 439-443.
- Cavagnini F, Croci M, Putignano P, Petroni ML & Invitti C (2000) Glucocorticoids and neuroendocrine function. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 2**, S77-79.
- Cerri M & Morrison SF (2006) Corticotropin releasing factor increases in brown adipose tissue thermogenesis and heart rate through dorsomedial hypothalamus and medullary raphe pallidus. *Neuroscience* **140**, 711-721.
- Chaouloff F, Berton O & Mormede P (1999) Serotonin and stress. *Neuropsychopharmacology* **21**, 28S-32S.
- Chaouloff F & Zamfir O (1993) Psychoneuroendocrine outcomes of short-term crowding stress. *Physiol Behav* **54**, 767-770.
- Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E & Chrousos GP (2003) Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm Res* **59**, 161-179.
- Charmandari E, Tsigos C & Chrousos G (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* **67**, 259-284.
- Chavez M, Seeley RJ, Green PK, Wilkinson CW, Schwartz MW & Woods SC (1997) Adrenalectomy increases sensitivity to central insulin. *Physiol Behav* **62**, 631-634.
- Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC, Ueno N & Fujimiya M (2005) Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology* **129**, 8-25.
- Cheng HW & Fahey A (2009) Effects of group size and repeated social disruption on the serotonergic and dopaminergic systems in two genetic lines of White Leghorn laying hens. *Poult Sci* **88**, 2018-2025.
- Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ulrich-Lai YM, Nguyen MM, Ostrander MM & Herman JP (2008) The role of the posterior medial bed nucleus of the stria terminalis in modulating hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness to acute and chronic stress. *Psychoneuroendocrinology* **33**, 659-669.

- Chrousos GP (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* **332**, 1351-1362.
- Chrousos GP (1998) Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci* **851**, 311-335.
- Chrousos GP (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* **5**, 374-381.
- Chrousos GP & Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama* **267**, 1244-1252.
- Ciccocioppo R, Biondini M, Antonelli L, Wichmann J, Jenck F & Massi M (2002) Reversal of stress- and CRF-induced anorexia in rats by the synthetic nociceptin/orphanin FQ receptor agonist, Ro 64-6198. *Psychopharmacology (Berl)* **161**, 113-119.
- Cohn C, Shrago E & Joseph D (1955) Effect of food administration on weight gains and body composition of normal and adrenalectomized rats. *Am J Physiol* **180**, 503-507.
- Coll AP & Loraine Tung YC (2009) Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides and the regulation of energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* **300**, 147-151.
- Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* **8**, 571-578.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL & Low MJ (2001) The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25 Suppl 5**, S63-67.
- Conrad CD & McEwen BS (2000) Acute stress increases neuropeptide Y mRNA within the arcuate nucleus and hilus of the dentate gyrus. *Brain Res Mol Brain Res* **79**, 102-109.
- Cooper SJ (1980) Effects of chlordiazepoxide and diazepam on feeding performance in a food-preference test. *Psychopharmacology (Berl)* **69**, 73-78.
- Cota D, Tschop MH, Horvath TL & Levine AS (2006) Cannabinoids, opioids and eating behavior: the molecular face of hedonism? *Brain Res Rev* **51**, 85-107.
- Cowley MA (2003) Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. *Eur J Pharmacol* **480**, 3-11.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD & Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* **411**, 480-484.
- Cullen MJ, Ling N, Foster AC & Pelleymounter MA (2001) Urocortin, corticotropin releasing factor-2 receptors and energy balance. *Endocrinology* **142**, 992-999.
- Cullinan WE (2000) GABA(A) receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: a dual hybridization histochemical study. *J Comp Neurol* **419**, 344-351.
- Curzon G, Hutson PH, Kantamaneni BD, Sahakian BJ & Sarna GS (1985) 3,4-Dihydroxyphenylethylamine and 5-hydroxytryptamine metabolism in the rat: acidic metabolites in cisternal cerebrospinal fluid before and after giving probenecid. *J Neurochem* **45**, 508-513.
- Cyr NE & Romero LM (2009) Identifying hormonal habituation in field studies of stress. *Gen Comp Endocrinol* **161**, 295-303.
- Czyrak A, Mackowiak M, Chocyk A, Fijal K & Wedzony K (2003) Role of glucocorticoids in the regulation of dopaminergic neurotransmission. *Pol J Pharmacol* **55**, 667-674.
- Dal-Zotto S, Marti O & Armario A (2000) Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behav Brain Res* **114**, 175-181.
- Dalla C, Antoniou K, Drossopoulou G, Xagoraris M, Kokras N, Sfikakis A & Papadopoulou-Daifoti Z (2005) Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? *Neuroscience* **135**, 703-714.
- Dallman MF (2009) Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol Metab*.
- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Hanson ES & Sebastian RJ (1995) The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. *Ann N Y Acad Sci* **771**, 730-742.
- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Scribner KS, Pecoraro N, La Fleur SE, Houshyar H & Gomez F (2004a) Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Ann N Y Acad Sci* **1018**, 141-150.
- Dallman MF & Jones MT (1973) Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone ssecretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology* **92**, 1367-1375.
- Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H & Akana SF (2004b) Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology* **145**, 2633-2638.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD & Manalo S (2003) Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11696-11701.
- Dallman MF, Pecoraro NC & la Fleur SE (2005) Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun* **19**, 275-280.
- Dallman MF, Pecoraro NC, La Fleur SE, Warne JP, Ginsberg AB, Akana SF, Laugero KC, Houshyar H, Strack AM, Bhatnagar S & Bell ME (2006) Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. *Prog Brain Res* **153**, 75-105.
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y & Day TA (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* **14**, 1143-1152.

- de Jong IC, van Voorst S, Ehlhardt DA & Blokhuis HJ (2002) Effects of restricted feeding on physiological stress parameters in growing broiler breeders. *Br Poult Sci* **43**, 157-168.
- de Kloet ER (2000) Stress in the brain. *Eur J Pharmacol* **405**, 187-198.
- de Kloet ER, Karst H & Joels M (2008) Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol* **29**, 268-272.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS & Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* **19**, 269-301.
- de Mazancourt P, Giot J & Giudicelli Y (1990) Correction by dexamethasone treatment of the altered lipolytic cascade induced by adrenalectomy in rat adipocytes. *Horm Metab Res* **22**, 22-24.
- Debut M, Berri C, Baeza E, Sellier N, Arnould C, Guemene D, Jehl N, Boutten B, Jego Y, Beaumont C & Le Bihan-Duval E (2003) Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and preslaughter stress conditions. *Poult Sci* **82**, 1829-1838.
- degli Uberti EC, Petraglia F, Bondanelli M, Guo AL, Valentini A, Salvadori S, Criscuolo M, Nappi RE & Genazzani AR (1995) Involvement of mu-opioid receptors in the modulation of pituitary-adrenal axis in normal and stressed rats. *J Endocrinol Invest* **18**, 1-7.
- Deroche V, Marinelli M, Le Moal M & Piazza PV (1997) Glucocorticoids and behavioral effects of psychostimulants. II: cocaine intravenous self-administration and reinstatement depend on glucocorticoid levels. *J Pharmacol Exp Ther* **281**, 1401-1407.
- Deroche V, Marinelli M, Maccari S, Le Moal M, Simon H & Piazza PV (1995) Stress-induced sensitization and glucocorticoids. I. Sensitization of dopamine-dependent locomotor effects of amphetamine and morphine depends on stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* **15**, 7181-7188.
- Deuster PA, Petrides JS, Singh A, Lucci EB, Chrousos GP & Gold PW (1998) High intensity exercise promotes escape of adrenocorticotropin and cortisol from suppression by dexamethasone: sexually dimorphic responses. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3332-3338.
- Diane A, Victoriano M, Fromentin G, Tome D & Larue-Achagiotis C (2008) Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats. *Appetite* **50**, 397-407.
- Djurhuus CB, Gravholt CH, Nielsen S, Mengel A, Christiansen JS, Schmitz OE & Moller N (2002) Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E172-177.
- Dobrakovova M, Kvetnansky R, Oprsalova Z & Jezova D (1993) Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats. *Psychoneuroendocrinology* **18**, 163-174.
- Dominguez-Gerpe L & Rey-Mendez M (2000) Role of pre-T cells and chemoattractants on stress-associated thymus involution. *Scand J Immunol* **52**, 470-476.
- Drolet G, Dumont EC, Gosselin I, Kinkead R, Laforest S & Trottier JF (2001) Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **25**, 729-741.
- Dronjak S, Gavrilovic L, Filipovic D & Radojcic MB (2004) Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiol Behav* **81**, 409-415.
- Duncko R, Cornwell B, Cui L, Merikangas KR & Grillon C (2007) Acute exposure to stress improves performance in trace eyeblink conditioning and spatial learning tasks in healthy men. *Learn Mem* **14**, 329-335.
- Duncko R, Kiss A, Skultetyova I, Rusnak M & Jezova D (2001) Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in response to chronic mild stress rise in male but not in female rats while tyrosine hydroxylase mRNA levels decrease in both sexes. *Psychoneuroendocrinology* **26**, 77-89.
- Dunn AJ, Berridge CW, Lai YI & Yachabach TL (1987) CRF-induced excessive grooming behavior in rats and mice. *Peptides* **8**, 841-844.
- Dunn AJ & Swiergiel AH (2008) The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *Eur J Pharmacol* **583**, 186-193.
- Earle TL, Linden W & Weinberg J (1999) Differential effects of harassment on cardiovascular and salivary cortisol stress reactivity and recovery in women and men. *J Psychosom Res* **46**, 125-141.
- Ehrhart-Bornstein M & Bornstein SR (2008) Cross-talk between adrenal medulla and adrenal cortex in stress. *Ann N Y Acad Sci* **1148**, 112-117.
- El-Lethey H, Aerni V, Jungi TW & Wechsler B (2000) Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing conditions. *Br Poult Sci* **41**, 22-28.
- Ellacott KL & Cone RD (2006) The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1265-1274.
- Ely DR, Dapper V, Marasca J, Correa JB, Gamaro GD, Xavier MH, Michalowski MB, Catelli D, Rosat R, Ferreira MB & Dalmaz C (1997) Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav* **61**, 395-398.
- Engelmann M, Landgraf R & Wotjak CT (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* **25**, 132-149.
- Fachin A, Silva RK, Noschang CG, Pettenuzzo L, Bertinetti L, Billodre MN, Peres W, Busnello F & Dalmaz C (2008) Stress effects on rats chronically receiving a highly palatable diet are sex-specific. *Appetite* **51**, 592-598.

- Faipoux R, Tome D, Bensaid A, Morens C, Oriol E, Bonnano LM & Fromentin G (2006) Yeast proteins enhance satiety in rats. *J Nutr* **136**, 2350-2356.
- Fawcett J, Clark DC, Scheftner WA & Gibbons RD (1983) Assessing anhedonia in psychiatric patients. *Arch Gen Psychiatry* **40**, 79-84.
- Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Tatro JB, Rand WM & Lechan RM (2000) alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* **289**, 152-156.
- Fernstrom JD & Wurtman RJ (1971) Brain serotonin content: increase following ingestion of carbohydrate diet. *Science* **174**, 1023-1025.
- Fetissov SO, Hallman J, Oreland L, Af Klinteberg B, Grenback E, Hulting AL & Hokfelt T (2002) Autoantibodies against alpha -MSH, ACTH, and LHRH in anorexia and bulimia nervosa patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 17155-17160.
- Fetissov SO, Hamze Sinno M, Coquerel Q, Do Rego JC, Coeffier M, Gilbert D, Hokfelt T & Dechelotte P (2008) Emerging role of autoantibodies against appetite-regulating neuropeptides in eating disorders. *Nutrition* **24**, 854-859.
- Feurte S, Tome D, Gietzen DW, Even PC, Nicolaidis S & Fromentin G (2002) Feeding patterns and meal microstructure during development of a taste aversion to a threonine devoid diet. *Nutr Neurosci* **5**, 269-278.
- Fietta P & Fietta P (2007) Glucocorticoids and brain functions. *Riv Biol* **100**, 403-418.
- Fietta P, Fietta P & Delsante G (2009) Central nervous system effects of natural and synthetic glucocorticoids. *Psychiatry Clin Neurosci* **63**, 613-622.
- Figlewicz DP & Benoit SC (2009) Insulin, leptin, and food reward: update 2008. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**, R9-R19.
- Fioramonti X, Contie S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A & Penicaud L (2007) Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* **56**, 1219-1227.
- Forbes NF, Stewart CA, Matthews K & Reid IC (1996) Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiol Behav* **60**, 1481-1484.
- Foster MT, Warne JP, Ginsberg AB, Horneman HF, Pecoraro NC, Akana SF & Dallman MF (2009) Palatable foods, stress, and energy stores sculpt corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropin, and corticosterone concentrations after restraint. *Endocrinology* **150**, 2325-2333.
- Franco-Colin M, Tellez-Lopez AM, Quevedo-Corona L & Racotta R (2000) Effects of long-term high-sucrose and dexamethasone on fat depots, liver fat, and lipid fuel fluxes through the retroperitoneal adipose tissue and splanchnic area in rats. *Metabolism* **49**, 1289-1294.
- Fraser D (1999) Animal ethics and animal welfare science: bridging the two cultures. *Appl Anim Behav Sci* **65**, 171-189.
- Freedman MR, Horwitz BA & Stern JS (1986) Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *Am J Physiol* **250**, R595-607.
- Galosy RA, Clarke LK, Vasko MR & Crawford IL (1981) Neurophysiology and neuropharmacology of cardiovascular regulation and stress. *Neurosci Biobehav Rev* **5**, 137-175.
- Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R & Dalmaz C (2003a) Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int* **42**, 107-114.
- Gamaro GD, Prediger ME, Lopes J, Bassani MG & Dalmaz C (2008) Fluoxetine alters feeding behavior and leptin levels in chronically-stressed rats. *Pharmacol Biochem Behav* **90**, 312-317.
- Gamaro GD, Prediger ME, Lopes JB & Dalmaz C (2003b) Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol Biochem Behav* **76**, 327-333.
- Gammie SC & Stevenson SA (2006) Intermale Aggression in Corticotropin-releasing Factor Receptor 1 Deficient Mice. *Behav Brain Res* **171**, 63-69.
- Ganong W (2004) *Physiologie médicale*, 2ème édition ed. Bruxelles: De Boeck.
- Ganong WF (2000) Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**, 422-427.
- Garcia-Diaz DF, Campion J, Milagro FI, Lomba A, Marzo F & Martinez JA (2007) Chronic mild stress induces variations in locomotive behavior and metabolic rates in high fat fed rats. *J Physiol Biochem* **63**, 337-346.
- Garcia A, Marti O, Valles A, Dal-Zotto S & Armario A (2000) Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* **72**, 114-125.
- Gardner JD, Rothwell NJ & Luheshi GN (1998) Leptin affects food intake via CRF-receptor-mediated pathways. *Nat Neurosci* **1**, 103.
- Gershengorn MC & Osman R (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology* **142**, 2-10.
- Gibson EL (2006) Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiol Behav* **89**, 53-61.

- Gimpl G & Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* **81**, 629-683.
- Girotti M, Pace TW, Gaylord RI, Rubin BA, Herman JP & Spencer RL (2006) Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience* **138**, 1067-1081.
- Goeders NE (2002) Stress and cocaine addiction. *J Pharmacol Exp Ther* **301**, 785-789.
- Goeders NE & Guerin GF (1996a) Effects of surgical and pharmacological adrenalectomy on the initiation and maintenance of intravenous cocaine self-administration in rats. *Brain Res* **722**, 145-152.
- Goeders NE & Guerin GF (1996b) Role of corticosterone in intravenous cocaine self-administration in rats. *Neuroendocrinology* **64**, 337-348.
- Goldstein DS (1995) *Stress, catecholamines, and cardiovascular disease*. New York: Oxford University Press.
- Gravholt CH, Dall R, Christiansen JS, Moller N & Schmitz O (2002) Preferential stimulation of abdominal subcutaneous lipolysis after prednisolone exposure in humans. *Obes Res* **10**, 774-781.
- Greeno CG & Wing RR (1994) Stress-induced eating. *Psychol Bull* **115**, 444-464.
- Grill HJ & Smith GP (1988) Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats. *Am J Physiol* **254**, R853-856.
- Grippo AJ, Francis J, Beltz TG, Felder RB & Johnson AK (2005) Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiol Behav* **84**, 697-706.
- Grissom N & Bhatnagar S (2009) Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol Learn Mem* **92**, 215-224.
- Gross WB & Siegel HS (1983) Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis* **27**, 972-979.
- Gudmundsson A & Carnes M (1997) Pulsatile adrenocorticotropic hormone: an overview. *Biol Psychiatry* **41**, 342-365.
- Habhab S, Sheldon JP & Loeb RC (2009) The relationship between stress, dietary restraint, and food preferences in women. *Appetite* **52**, 437-444.
- Habib KE, Gold PW & Chrousos GP (2001) Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* **30**, 695-728; vii-viii.
- Habib KE, Weld KP, Rice KC, Pushkas J, Champoux M, Listwak S, Webster EL, Atkinson AJ, Schulkin J, Contoreggi C, Chrousos GP, McCann SM, Suomi SJ, Higley JD & Gold PW (2000) Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6079-6084.
- Halford JC (2001) Pharmacology of appetite suppression: implication for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets* **2**, 353-370.
- Halford JC, Wanninayake SC & Blundell JE (1998) Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacol Biochem Behav* **61**, 159-168.
- Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW & Eiden LE (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 461-466.
- Hammen C (2005) Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol* **1**, 293-319.
- Hargreaves KM (1990) Neuroendocrine markers of stress. *Anesth Prog* **37**, 99-105.
- Harris RB, Mitchell TD, Simpson J, Redmann SM, Jr., Youngblood BD & Ryan DH (2002a) Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R77-88.
- Harris RB, Palmondon J, Leshin S, Flatt WP & Richard D (2006) Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav* **49**, 615-625.
- Harris RB, Zhou J, Mitchell T, Hebert S & Ryan DH (2002b) Rats fed only during the light period are resistant to stress-induced weight loss. *Physiol Behav* **76**, 543-550.
- Harris RB, Zhou J, Youngblood BD, Rybkin, II, Smagin GN & Ryan DH (1998) Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *Am J Physiol* **275**, R1928-1938.
- Harris RB, Zhou J, Youngblood BD, Smagin GN & Ryan DH (1997) Failure to change exploration or saccharin preference in rats exposed to chronic mild stress. *Physiol Behav* **63**, 91-100.
- Harris RBS, Howell LA, Mitchell TD, Youngblood BD, York DA & Ryan DH (2000) Stress and macronutrient selection. In *Neural and metabolic control of macronutrient intake: Psychology*, pp. 473–483: R. Berthoud & R. S. Seeley (Eds.).
- Harro J, Tonissaar M, Eller M, Kask A & Oreland L (2001) Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: effects on behavior and monoamine neurochemistry. *Brain Res* **899**, 227-239.
- Hegarty AA & Vogel WH (1995) The effect of acute and chronic diazepam treatment on stress-induced changes in cortical dopamine in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **52**, 771-778.
- Heinrichs SC & Koob GF (2004) Corticotropin-releasing factor in brain: a role in activation, arousal, and affect regulation. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 427-440.

- Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL & Koob GF (1993) Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res* **611**, 18-24.
- Heinrichs SC & Richard D (1999) The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* **33**, 350-359.
- Herman JP, Adams D & Prewitt C (1995) Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* **61**, 180-190.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC & Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* **24**, 151-180.
- Herman JP, Larson BR, Speert DB & Seasholtz AF (2001) Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. *Neurobiol Aging* **22**, 323-332.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK & Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**, 1201-1213.
- Hervieu G (2003) Melanin-concentrating hormone functions in the nervous system: food intake and stress. *Expert Opin Ther Targets* **7**, 495-511.
- Hillebrand JJ, de Wied D & Adan RA (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* **23**, 2283-2306.
- Hotta M, Shibasaki T, Arai K & Demura H (1999) Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. *Brain Res* **823**, 221-225.
- Hsu DT, Chen FL, Takahashi LK & Kalin NH (1998) Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: an in situ hybridization analysis. *Brain Res* **788**, 305-310.
- Huang Q, Rivest R & Richard D (1998) Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. *Endocrinology* **139**, 1524-1532.
- Huda MS, Wilding JP & Pinkney JH (2006) Gut peptides and the regulation of appetite. *Obes Rev* **7**, 163-182.
- Hughes BO & Duncan IJ (1972) The influence of strain and environmental factors upon feather pecking and cannibalism in fowls. *Br Poult Sci* **13**, 525-547.
- Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL, Qiu J, Rubinstein M, Ronnekleiv OK, Low MJ & Kelly MJ (2003) Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* **144**, 1331-1340.
- Itoi K (2008) Ablation of the central noradrenergic neurons for unraveling their roles in stress and anxiety. *Ann N Y Acad Sci* **1129**, 47-54.
- Itoi K & Sugimoto N (2010) The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety, and depression. *J Neuroendocrinol*.
- Jacobson L (2005) Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am* **34**, 271-292, vii.
- Jacobson L & Sapolsky R (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* **12**, 118-134.
- Jaferi A & Bhatnagar S (2006) Corticosterone can act at the posterior paraventricular thalamus to inhibit hypothalamic-pituitary-adrenal activity in animals that habituate to repeated stress. *Endocrinology* **147**, 4917-4930.
- Jaferi A, Nowak N & Bhatnagar S (2003) Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus. *Physiol Behav* **78**, 365-373.
- Jezova D, Bartanusz V, Westergren I, Johansson BB, Rivier J, Vale W & Rivier C (1992) Rat melanin-concentrating hormone stimulates adrenocorticotropin secretion: evidence for a site of action in brain regions protected by the blood-brain barrier. *Endocrinology* **130**, 1024-1029.
- Jobst EE, Enriori PJ & Cowley MA (2004) The electrophysiology of feeding circuits. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 488-499.
- Jocken JW & Blaak EE (2008) Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol Behav* **94**, 219-230.
- Johnson DN (1978) Effect of diazepam on food consumption in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **56**, 111-112.
- Johnstone LE, Srisawat R, Kumarnsit E & Leng G (2005) Hypothalamic expression of NPY mRNA, vasopressin mRNA and CRF mRNA in response to food restriction and central administration of the orexigenic peptide GHRP-6. *Stress* **8**, 59-67.
- Kageyama K & Suda T (2009) Role and action in the pituitary corticotroph of corticotropin-releasing factor (CRF) in the hypothalamus. *Peptides* **30**, 810-816.
- Kajantie E & Phillips DI (2006) The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* **31**, 151-178.
- Kalivas PW & Duffy P (1995) Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. *Brain Res* **675**, 325-328.

- Kalman BA, Kim PJ, Cole MA, Chi MS & Spencer RL (1997) Diazepam attenuation of restraint stress-induced corticosterone levels is enhanced by prior exposure to repeated restraint. *Psychoneuroendocrinology* **22**, 349-360.
- Kalueff AV & Tuohimaa P (2005) The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J Neurosci Methods* **143**, 169-177.
- Kamara K, Eskay R & Castonguay T (1998) High-fat diets and stress responsivity. *Physiol Behav* **64**, 1-6.
- Kasar M, Mengi M, Yildirim EA & Yurdakos E (2009) Different effects of tianeptine pretreatment in rats exposed to acute stress and repeated severe stress. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **31**, 157-163.
- Katz RJ & Roth KA (1979) Stress induced grooming in the rat--an endorphin mediated syndrome. *Neurosci Lett* **13**, 209-212.
- Katz RJ, Roth KA & Carroll BJ (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* **5**, 247-251.
- Keeney A, Jessop DS, Harbuz MS, Marsden CA, Hogg S & Blackburn-Munro RE (2006) Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *J Neuroendocrinol* **18**, 330-338.
- Keeney AJ, Hogg S & Marsden CA (2001) Alterations in core body temperature, locomotor activity, and corticosterone following acute and repeated social defeat of male NMRI mice. *Physiol Behav* **74**, 177-184.
- Kelley AE, Bakshi VP, Fleming S & Holahan MR (2000) A pharmacological analysis of the substrates underlying conditioned feeding induced by repeated opioid stimulation of the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* **23**, 455-467.
- Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE & Will MJ (2005) Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav* **86**, 773-795.
- Kelliher P, Connor TJ, Harkin A, Sanchez C, Kelly JP & Leonard BE (2000) Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. *Physiol Behav* **69**, 531-539.
- Kent JM, Mathew SJ & Gorman JM (2002) Molecular targets in the treatment of anxiety. *Biol Psychiatry* **52**, 1008-1030.
- Kim H, Whang WW, Kim HT, Pyun KH, Cho SY, Hahm DH, Lee HJ & Shim I (2003) Expression of neuropeptide Y and cholecystokinin in the rat brain by chronic mild stress. *Brain Res* **983**, 201-208.
- King BM, Banta AR, Tharel GN, Bruce BK & Frohman LA (1983) Hypothalamic hyperinsulinemia and obesity: role of adrenal glucocorticoids. *Am J Physiol* **245**, E194-199.
- Kinn AM, Gronli J, Fiske E, Kuipers S, Ursin R, Murison R & Portas CM (2008) A double exposure to social defeat induces sub-chronic effects on sleep and open field behaviour in rats. *Physiol Behav* **95**, 553-561.
- Kinzig KP, D'Alessio DA & Seeley RJ (2002) The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness. *J Neurosci* **22**, 10470-10476.
- Kinzig KP, Hargrave SL & Honors MA (2008) Binge-type eating attenuates corticosterone and hypophagic responses to restraint stress. *Physiol Behav* **95**, 108-113.
- Kiritsy-Roy JA, Appel NM, Bobbitt FG & Van Loon GR (1986) Effects of mu-opioid receptor stimulation in the hypothalamic paraventricular nucleus on basal and stress-induced catecholamine secretion and cardiovascular responses. *J Pharmacol Exp Ther* **239**, 814-822.
- Kirschbaum C, Pirke KM & Hellhammer DH (1993) The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology* **28**, 76-81.
- Kiss A & Aguilera G (2000) Role of alpha-1-adrenergic receptors in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during stress. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 683-694.
- Kleftaras G (2004) *La dépression: approche cognitive et comportementale*. Paris: L'harmattan.
- Klerman GL & Weissman MM (1988) The changing epidemiology of depression. *Clin Chem* **34**, 807-812.
- Konsman JP, Veeneman J, Combe C, Poole S, Luheshi GN & Dantzer R (2008) Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci* **28**, 2499-2510.
- Koob GF & Heinrichs SC (1999) A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* **848**, 141-152.
- Koolhaas JM, Meerlo P, De Boer SF, Strubbe JH & Bohus B (1997) The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci Biobehav Rev* **21**, 775-782.
- Korkeila M, Kaprio J, Rissanen A, Koshenvuo M & Sorensen TI (1998) Predictors of major weight gain in adult Finns: stress, life satisfaction and personality traits. *Int J Obes Relat Metab Disord* **22**, 949-957.
- Korte SM, Beuving G, Ruesink W & Blokhuis HJ (1997) Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from a high and low feather pecking line of laying hens. *Physiol Behav* **62**, 437-441.
- Kouvonen A, Kivimaki M, Cox SJ, Cox T & Vahtera J (2005) Relationship between work stress and body mass index among 45,810 female and male employees. *Psychosom Med* **67**, 577-583.
- Krahn DD, Gosnell BA, Grace M & Levine AS (1986) CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding. *Brain Res Bull* **17**, 285-289.

- Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS & Morley JE (1988) Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res* **443**, 63-69.
- Krahn DD, Gosnell BA & Majchrzak MJ (1990) The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures. *Biol Psychiatry* **27**, 1094-1102.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ & Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* **393**, 72-76.
- Krsek M, Rosicka M, Nedvidkova J, Kvasnickova H, Hana V, Marek J, Haluzik M, Lai EW & Pacak K (2006) Increased lipolysis of subcutaneous abdominal adipose tissue and altered noradrenergic activity in patients with Cushing's syndrome: an in-vivo microdialysis study. *Physiol Res* **55**, 421-428.
- Kubera M, Basta-Kaim A, Holan V, Simbirtsev A, Roman A, Pigareva N, Prokopieva E & Sham J (1998) Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice. *Int J Immunopharmacol* **20**, 781-789.
- Kvetnansky R, Goldstein DS, Weise VK, Holmes C, Szemeredi K, Bagdy G & Kopin IJ (1992) Effects of handling or immobilization on plasma levels of 3,4-dihydroxyphenylalanine, catecholamines, and metabolites in rats. *J Neurochem* **58**, 2296-2302.
- Kvetnansky R, Pacak K, Fukuhara K, Viskupic E, Hiremagalur B, Nankova B, Goldstein DS, Sabban EL & Kopin IJ (1995) Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Ann N Y Acad Sci* **771**, 131-158.
- Kvetnansky R, Sabban EL & Palkovits M (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* **89**, 535-606.
- Kyrou I, Chrousos GP & Tsigos C (2006) Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Ann N Y Acad Sci* **1083**, 77-110.
- Kyrou I & Tsigos C (2009) Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 787-793.
- la Fleur SE (2006) The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiol Behav* **89**, 110-114.
- la Fleur SE, Akana SF, Manalo SL & Dallman MF (2004) Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology* **145**, 2174-2185.
- la Fleur SE, Houshyar H, Roy M & Dallman MF (2005) Choice of lard, but not total lard calories, damps adrenocorticotropin responses to restraint. *Endocrinology* **146**, 2193-2199.
- Larrère R (2007) Justifications éthiques des préoccupations concernant le bien-être animal. *INRA Prod. Anim.* **20**, 11-17.
- Larsen PJ, Jessop DS, Chowdrey HS, Lightman SL & Mikkelsen JD (1994) Chronic administration of glucocorticoids directly upregulates prepro-neuropeptide Y and Y1-receptor mRNA levels in the arcuate nucleus of the rat. *J Neuroendocrinol* **6**, 153-159.
- Larsen PJ & Mau SE (1994) Effect of acute stress on the expression of hypothalamic messenger ribonucleic acids encoding the endogenous opioid precursors preproenkephalin A and proopiomelanocortin. *Peptides* **15**, 783-790.
- Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ & Orskov C (1997) Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* **77**, 257-270.
- Le Magnen J & Tallon S (1966) [The spontaneous periodicity of ad libitum food intake in white rats]. *J Physiol (Paris)* **58**, 323-349.
- Lecerf J-M (2006) Stress et obésité. VIe Symposium nutrition « Intervention nutritionnelle : de la prévention à la thérapeutique » - Brest, octobre 2005. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **20**, 99-107.
- LeFeuvre RA, Rothwell NJ & Stock MJ (1987) Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. *Neuropharmacology* **26**, 1217-1221.
- Legendre A & Harris RB (2006) Exaggerated response to mild stress in rats fed high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R1288-1294.
- Leibel RL, Edens NK & Fried SK (1989) Physiologic basis for the control of body fat distribution in humans. *Annu Rev Nutr* **9**, 417-443.
- Levine S & Ursin H (1991) What is stress? In *Stress: neurobiology and neuroendocrinology* pp. 3-33 [MR Brown, GF Koob and C Rivier, editors]. New York.
- Lieberman HR (2003) Nutrition, brain function and cognitive performance. *Appetite* **40**, 245-254.
- Lightman SL (2008) The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol* **20**, 880-884.
- Lightman SL, Wiles CC, Atkinson HC, Henley DE, Russell GM, Leendertz JA, McKenna MA, Spiga F, Wood SA & Conway-Campbell BL (2008) The significance of glucocorticoid pulsatility. *Eur J Pharmacol* **583**, 255-262.
- Liposits Z, Sievers L & Paull WK (1988) Neuropeptide-Y and ACTH-immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamus of the rat. An immunocytochemical analysis at the light and electron microscopic levels. *Histochemistry* **88**, 227-234.
- Liu J, Garza JC, Truong HV, Henschel J, Zhang W & Lu XY (2007) The melanocortinergic pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior. *Endocrinology* **148**, 5531-5540.

- Lu XY, Barsh GS, Akil H & Watson SJ (2003) Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci* **23**, 7863-7872.
- Lu XY, Kim CS, Frazer A & Zhang W (2006) Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1593-1598.
- Macfarlane DP, Forbes S & Walker BR (2008) Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol* **197**, 189-204.
- Magarinos AM & McEwen BS (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience* **69**, 83-88.
- Magkos F, Wang X & Mittendorfer B (2010) Metabolic actions of insulin in men and women. *Nutrition*.
- Makara GB & Haller J (2001) Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol* **65**, 367-390.
- Makino S, Asaba K, Nishiyama M & Hashimoto K (1999) Decreased type 2 corticotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in the ventromedial hypothalamus during repeated immobilization stress. *Neuroendocrinology* **70**, 160-167.
- Makino S, Baker RA, Smith MA & Gold PW (2000) Differential regulation of neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus and locus coeruleus by stress and antidepressants. *J Neuroendocrinol* **12**, 387-395.
- Makino S, Smith MA & Gold PW (1995) Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology* **136**, 3299-3309.
- Makino S, Smith MA & Gold PW (2002) Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. *Brain Res* **943**, 216-223.
- Mansour A, Fox CA, Akil H & Watson SJ (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* **18**, 22-29.
- Mantsch JR, Saphier D & Goeders NE (1998) Corticosterone facilitates the acquisition of cocaine self-administration in rats: opposite effects of the type II glucocorticoid receptor agonist dexamethasone. *J Pharmacol Exp Ther* **287**, 72-80.
- Marin MT, Cruz FC & Planeta CS (2007) Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* **90**, 29-35.
- Marini F, Pozzato C, Andreetta V, Jansson B, Arban R, Domenici E & Carboni L (2006) Single exposure to social defeat increases corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus. *Brain Res* **1067**, 25-35.
- Marquez C, Belda X & Armario A (2002) Post-stress recovery of pituitary-adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Res* **926**, 181-185.
- Marti O & Armario A (1998) Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* **16**, 241-260.
- Marti O, Harbuz MS, Andres R, Lightman SL & Armario A (1999) Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress. *Brain Res* **821**, 1-7.
- Marti O, Marti J & Armario A (1994) Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* **55**, 747-753.
- Maslova LN, Bulygina VV & Markel AL (2002) Chronic stress during prepubertal development: immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. *Psychoneuroendocrinology* **27**, 549-561.
- Mason JW (1971) A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *J Psychiatr Res* **8**, 323-333.
- Matte AC (1979) A method of quantitating aggressive behaviour revealing possible dissociation of motor activity and aggression. *Psychopharmacology (Berl)* **60**, 247-251.
- Matthews K, Forbes N & Reid IC (1995) Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiol Behav* **57**, 241-248.
- McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* **840**, 33-44.
- Meerlo P, De Boer SF, Koolhaas JM, Daan S & Van den Hoofdakker RH (1996a) Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. *Physiol Behav* **59**, 735-739.
- Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B & Koolhaas JM (1999) The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol* **11**, 925-933.
- Meerlo P, Overkamp GJ, Benning MA, Koolhaas JM & Van den Hoofdakker RH (1996b) Long-term changes in open field behaviour following a single social defeat in rats can be reversed by sleep deprivation. *Physiol Behav* **60**, 115-119.
- Meerlo P, Overkamp GJ, Daan S, Van Den Hoofdakker RH & Koolhaas JM (1996c) Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. *Stress* **1**, 21-32.

- Meerlo P, Overkamp GJ & Koolhaas JM (1997) Behavioural and physiological consequences of a single social defeat in Roman high- and low-avoidance rats. *Psychoneuroendocrinology* **22**, 155-168.
- Mei N (1978) Vagal glucoreceptors in the small intestine of the cat. *J Physiol* **282**, 485-506.
- Michel C, Duclos M, Cabanac M & Richard D (2005) Chronic stress reduces body fat content in both obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Horm Behav* **48**, 172-179.
- Miell JP, Englaro P & Blum WF (1996) Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res* **28**, 704-707.
- Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* **70**, 83-244.
- Miller DB & O'Callaghan JP (2002) Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism* **51**, 5-10.
- Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA & Mobbs CV (1998) Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* **47**, 294-297.
- Morley JE, Levine AS, Gosnell BA, Kneip J & Grace M (1987) Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol* **252**, R599-609.
- Morley JE, Levine AS & Rowland NE (1983) Minireview. Stress induced eating. *Life Sci* **32**, 2169-2182.
- Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S & Veissier I (2007) Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* **92**, 317-339.
- Morrison SF, Nakamura K & Madden CJ (2008) Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* **93**, 773-797.
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB & Cone RD (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* **8**, 1298-1308.
- Muller MB, Landgraf R, Preil J, Sillaber I, Kresse AE, Keck ME, Zimmermann S, Holsboer F & Wurst W (2000) Selective activation of the hypothalamic vasopressinergic system in mice deficient for the corticotropin-releasing hormone receptor 1 is dependent on glucocorticoids. *Endocrinology* **141**, 4262-4269.
- Munck A, Guyre PM & Holbrook NJ (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* **5**, 25-44.
- Munck A, Mendel DB, Smith LI & Orti E (1990) Glucocorticoid receptors and actions. *Am Rev Respir Dis* **141**, S2-10.
- Nagaraja HS & Jeganathan PS (2003) Forced swimming stress induced alterations in ingestive behavior in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* **47**, 94-100.
- Nanni G, Scheggi S, Leggio B, Grappi S, Masi F, Rauggi R & De Montis MG (2003) Acquisition of an appetitive behavior prevents development of stress-induced neurochemical modifications in rat nucleus accumbens. *J Neurosci Res* **73**, 573-580.
- Nemeroff CB, Osbahr AJ, 3rd, Bissette G, Jahnke G, Lipton MA & Prange AJ (1978) Cholecystokinin inhibits tail pinch-induced eating in rats. *Science* **200**, 793-794.
- Nicol CJ, Lindberg AC, Phillips AJ, Pope SJ, Wilkins LJ & Green LE (2001) Influence of prior exposure to wood shavings on feather pecking, dustbathing and foraging in adult laying hens. *Appl Anim Behav Sci* **73**, 141-155.
- Nieuwenhuizen AG & Rutters F (2008) The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiol Behav* **94**, 169-177.
- Nikulina EM, Hammer RP, Jr., Miczek KA & Kream RM (1999) Social defeat stress increases expression of mu-opioid receptor mRNA in rat ventral tegmental area. *Neuroreport* **10**, 3015-3019.
- Nikulina EM, Miczek KA & Hammer RP, Jr. (2005) Prolonged effects of repeated social defeat stress on mRNA expression and function of mu-opioid receptors in the ventral tegmental area of rats. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1096-1103.
- Noble RE (2002) Diagnosis of stress. *Metabolism* **51**, 37-39.
- Nonogaki K (2000) New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* **43**, 533-549.
- Okamoto S, Kimura K & Saito M (2001) Anorectic effect of leptin is mediated by hypothalamic corticotropin-releasing hormone, but not by urocortin, in rats. *Neurosci Lett* **307**, 179-182.
- Oliver G & Wardle J (1999) Perceived effects of stress on food choice. *Physiol Behav* **66**, 511-515.
- Oliver G, Wardle J & Gibson EL (2000) Stress and food choice: a laboratory study. *Psychosom Med* **62**, 853-865.
- Olivier B, Zethof T, Pattij T, van Boogaert M, van Oorschot R, Leahy C, Oosting R, Bouwknecht A, Veening J, van der Gugten J & Groenink L (2003) Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. *Eur J Pharmacol* **463**, 117-132.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I & Barsh GS (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **278**, 135-138.
- Olson BR, Drutarosky MD, Stricker EM & Verbalis JG (1991) Brain oxytocin receptors mediate corticotropin-releasing hormone-induced anorexia. *Am J Physiol* **260**, R448-452.
- Ortiz J, Fitzgerald LW, Lane S, Terwilliger R & Nestler EJ (1996) Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology* **14**, 443-452.

- Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Richtand NM & Herman JP (2006) Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology* **147**, 2008-2017.
- Ottosson M, Lonnroth P, Bjorntorp P & Eden S (2000) Effects of cortisol and growth hormone on lipolysis in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 799-803.
- Owens MJ & Nemeroff CB (1991) Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* **43**, 425-473.
- Pacak K (2000) Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res* **49 Suppl 1**, S11-17.
- Pacak K & Palkovits M (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* **22**, 502-548.
- Pagano C, Marzolo M, Granzotto M, Ricquier D, Federspil G & Vettor R (1999) Acute effects of exercise on circulating leptin in lean and genetically obese fa/fa rats. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 698-702.
- Pardridge WM (1986) Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier. *Endocr Rev* **7**, 314-330.
- Parkes D & Vale W (1992) Secretion of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-EI from cultured rat hypothalamic cells. *Endocrinology* **131**, 1826-1831.
- Pascoe WS, Smythe GA & Storlien LH (1991) Enhanced responses to stress induced by fat-feeding in rats: relationship between hypothalamic noradrenaline and blood glucose. *Brain Res* **550**, 192-196.
- Patel S & Hillard CJ (2008) Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *Eur J Neurosci* **27**, 2821-2829.
- Pecoraro N & Dallman MF (2005) c-Fos after incentive shifts: expectancy, incredulity, and recovery. *Behav Neurosci* **119**, 366-387.
- Pecoraro N, Ginsberg AB, Warne JP, Gomez F, la Fleur SE & Dallman MF (2006) Diverse basal and stress-related phenotypes of Sprague Dawley rats from three vendors. *Physiol Behav* **89**, 598-610.
- Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A & Dallman MF (2004) Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* **145**, 3754-3762.
- Pelleymounter MA, Joppa M, Carmouche M, Cullen MJ, Brown B, Murphy B, Grigoriadis DE, Ling N & Foster AC (2000) Role of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the anorexic syndrome induced by CRF. *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 799-806.
- Peters A, Schweiger U, Pellerin L, Hubold C, Oltmanns KM, Conrad M, Schultes B, Born J & Fehm HL (2004) The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci Biobehav Rev* **28**, 143-180.
- Pine CJ (1985) Anxiety and eating behavior in obese and nonobese American Indians and white Americans. *J Pers Soc Psychol* **49**, 774-780.
- Pitman DL, Ottenweller JE & Natelson BH (1990) Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. *Behav Neurosci* **104**, 28-36.
- Pocock G & Richards CD (2004) *Physiologie humaine : les fondements de la médecine*. Paris: Masson.
- Post J, Rebel JM & ter Huurne AA (2003) Automated blood cell count: a sensitive and reliable method to study corticosterone-related stress in broilers. *Poult Sci* **82**, 591-595.
- Pothion S, Bizot JC, Trovero F & Belzung C (2004) Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* **155**, 135-146.
- Powley TL & Phillips RJ (2004) Gastric satiation is volumetric, intestinal satiation is nutritive. *Physiol Behav* **82**, 69-74.
- Pritchard LE & White A (2007) Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways. *Endocrinology* **148**, 4201-4207.
- Prut L & Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* **463**, 3-33.
- Rada P, Avena NM & Hoebel BG (2005) Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience* **134**, 737-744.
- Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, Morrison JH, Wearne SL & Hof PR (2008) Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol* **507**, 1141-1150.
- Rai D, Bhatia G, Sen T & Palit G (2003a) Anti-stress effects of Ginkgo biloba and Panax ginseng: a comparative study. *J Pharmacol Sci* **93**, 458-464.
- Rai D, Bhatia G, Sen T & Palit G (2003b) Comparative study of perturbations of peripheral markers in different stressors in rats. *Can J Physiol Pharmacol* **81**, 1139-1146.
- Randich A, Spraggins DS, Cox JE, Meller ST & Kelm GR (2001) Jejunal or portal vein infusions of lipids increase hepatic vagal afferent activity. *Neuroreport* **12**, 3101-3105.
- Rebuffe-Scrive M, Walsh UA, McEwen B & Rodin J (1992) Effect of chronic stress and exogenous glucocorticoids on regional fat distribution and metabolism. *Physiol Behav* **52**, 583-590.

- Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC, Jr. (1993) 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.
- Retana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Vazquez-Palacios G, Dominguez-Salazar E, Martinez-Garcia R & Velazquez-Moctezuma J (2003) Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* **28**, 207-227.
- Rex A, Morgenstern E & Fink H (2002) Anxiolytic-like effects of kava-kava in the elevated plus maze test--a comparison with diazepam. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **26**, 855-860.
- Rex A, Stephens DN & Fink H (1996) "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. *Pharmacol Biochem Behav* **53**, 1005-1011.
- Reznick H & Balch P (1977) The effects of anxiety and response cost manipulations on the eating behavior of obese and normal-weight subjects. *Addict Behav* **2**, 219-225.
- Ricart-Jane D, Rodriguez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, Lopez-Tejero MD & Llobera M (2002) Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism* **51**, 925-931.
- Richard D, Lin Q & Timofeeva E (2002) The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *Eur J Pharmacol* **440**, 189-197.
- Riegle GD (1973) Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology* **11**, 1-10.
- Rinaman L (1999a) A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia. *Am J Physiol* **277**, R1537-1540.
- Rinaman L (1999b) Interoceptive stress activates glucagon-like peptide-1 neurons that project to the hypothalamus. *Am J Physiol* **277**, R582-590.
- Rinaman L (2003) Hindbrain noradrenergic lesions attenuate anorexia and alter central cFos expression in rats after gastric viscerosensory stimulation. *J Neurosci* **23**, 10084-10092.
- Rinaman L, Baker EA, Hoffman GE, Stricker EM & Verbalis JG (1998) Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *Am J Physiol* **275**, R262-268.
- Rivet JM, Stinus L, LeMoal M & Mormede P (1989) Behavioral sensitization to amphetamine is dependent on corticosteroid receptor activation. *Brain Res* **498**, 149-153.
- Rodenburg TB, Hierdenb YMv, Buitenhuisc AJ, Riedstrad B, Koenea P, Korteb SM, Poelc JJvd, Groothuisd TGG & Blokhuis HJ (2004) Feather pecking in laying hens: new insights and directions for research? *Appl Anim Behav Sci* **86**, 291-298.
- Rodgers RJ, Holch P & Tallett AJ (2010) Behavioural satiety sequence (BSS): Separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. *Pharmacol Biochem Behav*.
- Rogers RC & Hermann GE (1987) Oxytocin, oxytocin antagonist, TRH, and hypothalamic paraventricular nucleus stimulation effects on gastric motility. *Peptides* **8**, 505-513.
- Romeo RD, Karatsoreos IN, Ali FS & McEwen BS (2007a) The effects of acute stress and pubertal development on metabolic hormones in the rat. *Stress* **10**, 101-106.
- Romeo RD, Karatsoreos IN, Jasnow AM & McEwen BS (2007b) Age- and stress-induced changes in corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroendocrinology* **85**, 199-206.
- Roozendaal B, Brunson KL, Holloway BL, McGaugh JL & Baram TZ (2002) Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13908-13913.
- Roozendaal B, Carmi O & McGaugh JL (1996) Adrenocortical suppression blocks the memory-enhancing effects of amphetamine and epinephrine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1429-1433.
- Roozendaal B, McEwen BS & Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* **10**, 423-433.
- Roozendaal B, Nguyen BT, Power AE & McGaugh JL (1999) Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11642-11647.
- Roozendaal B, Schelling G & McGaugh JL (2008) Corticotropin-releasing factor in the basolateral amygdala enhances memory consolidation via an interaction with the beta-adrenoceptor-cAMP pathway: dependence on glucocorticoid receptor activation. *J Neurosci* **28**, 6642-6651.
- Rosenfield SN & Stevenson JS (1988) Perception of daily stress and oral coping behaviors in normal, overweight, and recovering alcoholic women. *Res Nurs Health* **11**, 165-174.
- Rosmond R, Dallman MF & Bjorntorp P (1998) Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1853-1859.
- Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J & Capen CC (2001) Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol* **29**, 41-48.
- Ruderman AJ (1983) Obesity, anxiety, and food consumption. *Addict Behav* **8**, 235-242.

- Rushen J (2003) Changing concepts of farm animal welfare: bridging the gap between applied and basic research. *Appl Anim Behav Sci* **81** 199-214.
- Rutters F, Nieuwenhuizen AG, Lemmens SG, Born JM & Westerterp-Plantenga MS (2009a) Acute stress-related changes in eating in the absence of hunger. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 72-77.
- Rutters F, Nieuwenhuizen AG, Lemmens SG, Born JM & Westerterp-Plantenga MS (2009b) Hyperactivity of the HPA axis is related to dietary restraint in normal weight women. *Physiol Behav* **96**, 315-319.
- Rybkin, II, Zhou Y, Volaufova J, Smagin GN, Ryan DH & Harris RB (1997) Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *Am J Physiol* **273**, R1612-1622.
- Sabban EL & Serova LI (2007) Influence of prior experience with homotypic or heterotypic stressor on stress reactivity in catecholaminergic systems. *Stress* **10**, 137-143.
- Sachs BD (1988) The development of grooming and its expression in adult animals. *Ann N Y Acad Sci* **525**, 1-17.
- Sage D, Maurel D & Bosler O (2001) Involvement of the suprachiasmatic nucleus in diurnal ACTH and corticosterone responsiveness to stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E260-269.
- Salman H, Bergman M, Weizman A, Bessler H, Weiss J, Straussberg R & Djaldetti M (2000) Effect of diazepam on the immune response of rats exposed to acute and chronic swim stress. *Biomed Pharmacother* **54**, 311-315.
- Samarghandian S, Ohata H, Yamauchi N & Shibasaki T (2003) Corticotropin-releasing factor as well as opioid and dopamine are involved in tail-pinch-induced food intake of rats. *Neuroscience* **116**, 519-524.
- Santana P, Akana SF, Hanson ES, Strack AM, Sebastian RJ & Dallman MF (1995) Aldosterone and dexamethasone both stimulate energy acquisition whereas only the glucocorticoid alters energy storage. *Endocrinology* **136**, 2214-2222.
- Saper CB, Lu J, Chou TC & Gooley J (2005) The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* **28**, 152-157.
- Sapolsky RM, Romero LM & Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* **21**, 55-89.
- Sawchenko PE, Li HY & Ericsson A (2000) Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res* **122**, 61-78.
- Schmitt U & Hiemke C (1998) Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **22**, 1197-1215.
- Schwartz GJ (2006) Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1275-1280.
- Sedlackova M, Bilcik B & Kostal L (2004) Feather Pecking in Laying Hens: Environmental and Endogenous Factors. *Acta Veterinaria Brno* **73**, 521-531.
- Sekino A, Ohata H, Mano-Otagiri A, Arai K & Shibasaki T (2004) Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **176**, 30-38.
- Selye H (1950) Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* **1**, 1383-1392.
- Selye H (1976) *The stress of life*, 2d edition ed: Papermark Edition.
- Selye H (1998) A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **10**, 230-231.
- Seyrig JA, Falcou R, Betoulle D & Apfelbaum M (1986) Effects of a chronic administration of two benzodiazepines on food intake in rats given a highly palatable diet. *Pharmacol Biochem Behav* **25**, 913-918.
- Silveira PP, Xavier MH, Souza FH, Manoli LP, Rosat RM, Ferreira MB & Dalmaz C (2000) Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. *Braz J Med Biol Res* **33**, 1343-1350.
- Simler N, Malgoyre A, Koulmann N, Alonso A, Peinnequin A & Bigard AX (2007) Hypoxic stimulus alters hypothalamic AMP-activated protein kinase phosphorylation concomitant to hypophagia. *J Appl Physiol* **102**, 2135-2141.
- Sinno MH, Do Rego JC, Coeffier M, Bole-Feysot C, Ducrotte P, Gilbert D, Tron F, Costentin J, Hokfelt T, Dechelotte P & Fetissov SO (2009) Regulation of feeding and anxiety by alpha-MSH reactive autoantibodies. *Psychoneuroendocrinology* **34**, 140-149.
- Slochower J, Kaplan SP & Mann L (1981) The effects of life stress and weight on mood and eating. *Appetite* **2**, 115-125.
- Smagin GN, Howell LA, Redmann S, Jr., Ryan DH & Harris RB (1999) Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist. *Am J Physiol* **276**, R1461-1468.
- Smith R, Lovelock M, Owens PC, Chan EC & Falconer J (1988) The effect of repetitive haemorrhage on plasma cortisol, beta-endorphin and N-terminal pro-opiomelanocortin in conscious sheep. *Horm Metab Res* **20**, 612-615.
- Smith SR, de Jonge L, Pellymounter M, Nguyen T, Harris R, York D, Redmann S, Rood J & Bray GA (2001) Peripheral administration of human corticotropin-releasing hormone: a novel method to increase energy expenditure and fat oxidation in man. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 1991-1998.

- Spinedi E & Gaillard RC (1998) A regulatory loop between the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and circulating leptin: a physiological role of ACTH. *Endocrinology* **139**, 4016-4020.
- Spruijt BM, van Hooff JA & Gispen WH (1992) Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev* **72**, 825-852.
- Stanley S, Wynne K, McGowan B & Bloom S (2005) Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* **85**, 1131-1158.
- Stellato C (2004) Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc* **1**, 255-263.
- Stengel A & Tache Y (2009) Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol* **71**, 219-239.
- Stewart LQ, Roper JA, Young WS, 3rd, O'Carroll AM & Lolait SJ (2008) Pituitary-adrenal response to acute and repeated mild restraint, forced swim and change in environment stress in arginine vasopressin receptor 1b knockout mice. *J Neuroendocrinol* **20**, 597-605.
- Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW & Dallman MF (1995) Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* **268**, R142-149.
- Stunkard AJ & Messick S (1985) The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom Res* **29**, 71-83.
- Suzuki H & Lucas LR (2010) Chronic passive exposure to aggression escalates aggressiveness of rat observers. *Aggress Behav* **36**, 54-66.
- Szafarczyk A, Ixart G, Gaillet S, Siaud P, Barbanel G, Malaval F & Assenmacher I (1993) [Stress. Neurophysiologic studies]. *Encephale* **19 Spec No 1**, 137-142.
- Tabarin A, Diz-Chaves Y, Consoli D, Monsaingeon M, Bale TL, Culler MD, Datta R, Drago F, Vale WW, Koob GF, Zorrilla EP & Contarino A (2007) Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. *Eur J Neurosci* **26**, 2303-2314.
- Tache Y & Bonaz B (2007) Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest* **117**, 33-40.
- Tache Y, Garrick T & Raybould H (1990) Central nervous system action of peptides to influence gastrointestinal motor function. *Gastroenterology* **98**, 517-528.
- Tamashiro KL, Hegeman MA, Nguyen MM, Melhorn SJ, Ma LY, Woods SC & Sakai RR (2007) Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. *Physiol Behav* **91**, 440-448.
- Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman MF, McArthur MD & Meaney MJ (1997) High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am J Physiol* **273**, E1168-1177.
- Tanoue A, Ito S, Honda K, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu TA, Mori T & Tsujimoto G (2004) The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J Clin Invest* **113**, 302-309.
- Tasker JG, Di S & Malcher-Lopes R (2006) Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* **147**, 5549-5556.
- Tataranni PA, Larson DE, Snitker S, Young JB, Flatt JP & Ravussin E (1996) Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am J Physiol* **271**, E317-325.
- Tauchi M, Zhang R, D'Alessio DA, Seeley RJ & Herman JP (2008) Role of central glucagon-like peptide-1 in hypothalamo-pituitary-adrenocortical facilitation following chronic stress. *Exp Neurol* **210**, 458-466.
- Teegarden SL & Bale TL (2008) Effects of stress on dietary preference and intake are dependent on access and stress sensitivity. *Physiol Behav* **93**, 713-723.
- Teschemacher H, Koch G & Brantl V (1997) Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* **43**, 99-117.
- Thompson BL, Erickson K, Schulkin J & Rosen JB (2004) Corticosterone facilitates retention of contextually conditioned fear and increases CRH mRNA expression in the amygdala. *Behav Brain Res* **149**, 209-215.
- Thorsell A, Svensson P, Wiklund L, Sommer W, Ekman R & Heilig M (1998) Suppressed neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat amygdala following restraint stress. *Regul Pept* **75-76**, 247-254.
- Torres SJ & Nowson CA (2007) Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* **23**, 887-894.
- Tranchand-Bunel D, Delbende C, Guy J, Jegou S, Jenks BJ, Mocaer E, Pelletier G & Vaudry H (1987) [Pro-opiomelanocortin neuronal systems]. *Rev Neurol (Paris)* **143**, 471-489.
- Traub RJ, Sengupta JN & Gebhart GF (1996) Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience* **74**, 873-884.
- Tsigos C & Chrousos GP (1994) Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* **23**, 451-466.
- Tsigos C & Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* **53**, 865-871.
- Uehara Y, Shimizu H, Ohtani K, Sato N & Mori M (1998) Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes* **47**, 890-893.

- Ulrich-Lai YM, Arnhold MM & Engeland WC (2006a) Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1128-1135.
- Ulrich-Lai YM & Engeland WC (2002) Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. *Neuroendocrinology* **76**, 79-92.
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC & Herman JP (2006b) Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E965-973.
- Ulrich-Lai YM & Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* **10**, 397-409.
- Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Thomas IM, Packard BA, Furay AR, Dolgas CM, Van Hooren DC, Figueiredo HF, Mueller NK, Choi DC & Herman JP (2007) Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. *Endocrinology* **148**, 1823-1834.
- Valassi E, Scacchi M & Cavagnini F (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **18**, 158-168.
- Valles A, Marti O & Armario A (2006) Long-term effects of a single exposure to immobilization: a c-fos mRNA study of the response to the homotypic stressor in the rat brain. *J Neurobiol* **66**, 591-602.
- Valles A, Marti O, Garcia A & Armario A (2000) Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1138-1144.
- Van de Kar LD & Blair ML (1999) Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* **20**, 1-48.
- van der Laan S & Meijer OC (2008) Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur J Pharmacol* **585**, 483-491.
- van Dijk G, de Vries K, Benthem L, Nyakas C, Buwalda B & Scheurink AJ (2003) Neuroendocrinology of insulin resistance: metabolic and endocrine aspects of adiposity. *Eur J Pharmacol* **480**, 31-42.
- van Erp AM, Kruk MR, Meelis W & Willekens-Bramer DC (1994) Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behav Brain Res* **65**, 47-55.
- Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W & Sawchenko PE (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* **428**, 191-212.
- Varma M, Chai JK, Meguid MM, Gleason JR & Yang ZJ (1999) Effect of operative stress on food intake and feeding pattern in female rats. *Nutrition* **15**, 365-372.
- Veissier I, Beaumont C & Lévy F (2007) Les recherches sur le bien-être animal : buts, méthodologie et finalité. *INRA Prod. Anim.* **20**, 3-10.
- Vergoni AV, Bertolini A, Wikberg JE & Schioth HB (1999) Selective melanocortin MC4 receptor blockage reduces immobilization stress-induced anorexia in rats. *Eur J Pharmacol* **369**, 11-15.
- Viveros MP, Marco EM & File SE (2005) Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* **81**, 331-342.
- Volkow ND & Wise RA (2005) How can drug addiction help us understand obesity? *Nat Neurosci* **8**, 555-560.
- Vrang N, Phifer CB, Corkern MM & Berthoud HR (2003) Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R470-478.
- Wajchenberg BL, Bosco A, Marone MM, Levin S, Rocha M, Lerario AC, Nery M, Goldman J & Liberman B (1995) Estimation of body fat and lean tissue distribution by dual energy X-ray absorptiometry and abdominal body fat evaluation by computed tomography in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 2791-2794.
- Waldherr M, Nyuyki K, Maloumby R, Bosch OJ & Neumann ID (2010) Attenuation of the neuronal stress responsiveness and corticotrophin releasing hormone synthesis after sexual activity in male rats. *Horm Behav* **57**, 222-229.
- Wallinga AE, Voorde AMt, Boer SFd, Koolhaas JM & Buwalda B (2009) MDMA-induced serotonergic neurotoxicity enhances aggressiveness in low- but not high-aggressive rats. *Eur J Pharmacol* **618**, 22–27.
- Wallis DJ & Hetherington MM (2004) Stress and eating: the effects of ego-threat and cognitive demand on food intake in restrained and emotional eaters. *Appetite* **43**, 39-46.
- Wallis DJ & Hetherington MM (2009) Emotions and eating. Self-reported and experimentally induced changes in food intake under stress. *Appetite* **52**, 355-362.
- Wardle J, Steptoe A, Oliver G & Lipsey Z (2000) Stress, dietary restraint and food intake. *J Psychosom Res* **48**, 195-202.
- Warne JP (2009) Shaping the stress response: interplay of palatable food choices, glucocorticoids, insulin and abdominal obesity. *Mol Cell Endocrinol* **300**, 137-146.
- Warne JP, Horneman HF, Ginsberg AB, Pecoraro NC, Foster MT, Akana SF & Dallman MF (2007) Mapping brain c-Fos immunoreactivity after insulin-induced voluntary lard intake: insulin- and lard-associated patterns. *J Neuroendocrinol* **19**, 794-808.
- Weiner H (1991) Behavioral biology of stress and psychosomatic medicine. In *Stress: neurobiology and neuroendocrinology*, pp. 23-51 [MR Brown, GF Koob and C Rivier, editors]. New York.

- Widjaja A, Schurmeyer TH, Von zur Muhlen A & Brabant G (1998) Determinants of serum leptin levels in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 600-603.
- Widmaier EP, Margenthaler J & Sarel I (1995) Regulation of pituitary-adrenocortical activity by free fatty acids in vivo and in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **52**, 179-183.
- Widmaier EP, Rosen K & Abbott B (1992) Free fatty acids activate the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in rats. *Endocrinology* **131**, 2313-2318.
- Williams DL, Kaplan JM & Grill HJ (2000) The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation. *Endocrinology* **141**, 1332-1337.
- Williams G, Cai XJ, Elliott JC & Harrold JA (2004) Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav* **81**, 211-222.
- Willing AE & Berthoud HR (1997) Gastric distension-induced c-fos expression in catecholaminergic neurons of rat dorsal vagal complex. *Am J Physiol* **272**, R59-67.
- Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* **134**, 319-329.
- Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* **52**, 90-110.
- Woods SC (2004) Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G7-13.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr. & Schwartz MW (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* **280**, 1378-1383.
- Wurtman RJ (1987) Nutrients affecting brain composition and behavior. *Integr Psychiatry* **5**, 226-238; discussion 238-257.
- Wurtman RJ (2002) Stress and the adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Metabolism* **51**, 11-14.
- Xu C, He J, Jiang H, Zu L, Zhai W, Pu S & Xu G (2009) Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Mol Endocrinol* **23**, 1161-1170.
- Yamada F, Inoue S, Saitoh T, Tanaka K, Satoh S & Takamura Y (1993) Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology* **132**, 2199-2205.
- Yamamoto M, Komori T, Matsumoto T, Zhang K, Miyahara S, Shizuya K & Okazaki Y (2003) Effects of single and repeated prolonged stress on mu-opioid receptor mRNA expression in rat gross hypothalamic and midbrain homogenates. *Brain Res* **980**, 191-196.
- Yoshida M, Koyanagi S, Matsuo A, Fujioka T, To H, Higuchi S & Ohdo S (2005) Glucocorticoid hormone regulates the circadian coordination of micro-opioid receptor expression in mouse brainstem. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 1119-1124.
- Zakrzewska KE, Cusin I, Sainsbury A, Rohner-Jeanrenaud F & Jeanrenaud B (1997) Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes* **46**, 717-719.
- Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, Boss O, Ricquier D, Jeanrenaud B & Rohner-Jeanrenaud F (1999) Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* **48**, 365-370.
- Zellner DA, Loaiza S, Gonzalez Z, Pita J, Morales J, Pecora D & Wolf A (2006) Food selection changes under stress. *Physiol Behav* **87**, 789-793.
- Zheng H, Patterson LM, Phifer CB & Berthoud HR (2005) Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R247-258.
- Zheng H, Patterson LM, Rhodes CJ, Louis GW, Skibicka KP, Grill HJ, Myers MG, Jr. & Berthoud HR (2010) A potential role for hypothalamomedullary POMC projections in leptin-induced suppression of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R720-728.
- Ziegler DR, Cullinan WE & Herman JP (2005) Organization and regulation of paraventricular nucleus glutamate signaling systems: N-methyl-D-aspartate receptors. *J Comp Neurol* **484**, 43-56.
- Zylan KD & Brown SD (1996) Effect of stress and food variety on food intake in male and female rats. *Physiol Behav* **59**, 165-169.

ANNEXES

ANNEXE 1 : HISTORIQUE DU CONCEPT DE STRESS

1. Problématique de la définition du concept de stress

Le mot stress est aujourd'hui largement répandu et utilisé par tous. Le stress fait partie de notre vie de tous les jours et recouvre un large panel de situations et d'états. En effet, le stress est considéré par tout un chacun aussi bien comme un état que comme la cause de cet état. Par exemple, on parle du stress au travail et on dit que l'on est stressé par son travail. Malgré l'universalité de ce terme et le fait que chacun sache en parler et l'ai déjà vécu, la notion de stress reste subjective et nous éprouvons des difficultés à décrire précisément ce qu'il est et à énoncer une définition précise.

Etymologiquement, le mot stress vient du latin *stringere* qui signifie « mettre sous tension ». L'ambigüité entre l'agent inducteur et l'état induit est donc déjà étymologiquement présente dans le mot stress. Toutefois, le dictionnaire Larousse nous propose la définition suivante : *Stress n.m. État réactionnel de l'organisme soumis à une agression brusque.* Cette définition semble entrevoir le stress comme l'état de l'organisme et non comme la cause de cet état.

Le stress est donc une notion complexe et bien qu'elle ait vue le jour il y a plus de 100 ans, aucune définition n'est unanimement reconnue. C'est à la fin du 19ème siècle que les études sur le stress ont commencé bien qu'à l'époque le mot « stress » n'existait pas (en tout cas en biologie). A ce moment là, l'étude de la constance du milieu intérieur et de forces adverses venant le perturber a permis de mettre en évidence des réponses de l'organisme.

2. Historique du stress : de l'homéostasie au stress

2.1. Notion d'homéostasie : de Claude Bernard à Walter Cannon

C'est dans son livre posthume « Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux » (Bernard, 1878-1879) que le physiologiste français Claude Bernard (1813-1878) a finalisé sa conception du « milieu intérieur ». Il introduit la distinction entre le milieu extérieur dans lequel est placé l'organisme et le milieu intérieur dans lequel vivent les éléments des tissus de l'organisme. Bernard définit également la notion de fixité de ce milieu intérieur invoquant une perfection de l'organisme permettant aux variations externes d'être à chaque instant compensées et équilibrées.

Le neurophysiologiste américain Walter Cannon (1871-1945) développe ce concept au début du 20ème siècle dans son livre « The wisdom of the body » (Cannon, 1932). Il formalise une

théorie générale sur les mécanismes régulant la constance du milieu intérieur qu'il dénomme « homéostasie », néologisme introduit pour la première fois en 1929 (Cannon, 1929b) et provenant du grec *homoios* signifiant semblable et *stasis* signifiant position verticale, base. Il postule qu'il est évident qu'un certain nombre de mécanismes doivent agir ou être prêts à agir pour maintenir cette constance et que si un état reste stable c'est parce que toute tendance au changement est automatiquement contrée par l'efficacité de facteurs qui résistent à ce changement. En plus des paramètres externes physiques, il élargit le concept d'homéostasie aux paramètres émotionnels.

2.2. De l'homéostasie à la notion de stress

Dans son autre livre, « Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage » (Cannon, 1929a), Cannon développe les effets de stimuli émotionnels sur divers organes et systèmes de l'organisme. Le système nerveux sympathique est pour lui primordial dans le maintien de l'homéostasie et il porte beaucoup d'attention à la réaction de celui-ci et notamment à la libération d'adrénaline par les glandes surrénales suite à un événement perturbant. Il décrit les réponses adaptatives mises en place par l'organisme par l'expression « fight or flight » ou « fuir ou combattre ». Dans son livre, Cannon utilise le terme de stress dans des expressions telles que « times of stress » afin de parler des périodes de contraintes nerveuses et psychologiques. Le stress semble donc être la cause déclenchante, la perturbation à l'origine d'une réponse de l'organisme mais Cannon ne le définit pas clairement et ce n'est pas lui qui développe le concept biologique de stress.

Hans Selye (1907-1982), endocrinologiste canadien d'origine austro-hongroise, est considéré comme le père du concept de stress. Il introduit et popularise le stress en tant qu'idée scientifique et médicale dans les années 30. Dans une lettre à l'éditeur de Nature en 1936 (Selye, 1998), Selye décrit pour la première fois un ensemble des réponses physiologiques stéréotypées à des agents nocifs divers et destinées à mobiliser les défenses de l'organisme pour maintenir ou rétablir un équilibre menacée. L'exposition au froid engendre des frissons, l'exposition à la chaleur engendre une hausse de température, l'effort engendre l'accélération du pouls et ces réponses sont spécifiques de chaque agent auquel l'organisme est exposé. Mais en dehors de ces réponses spécifiques, Selye identifie une autre réponse non spécifique de l'organisme et commune à tous les agents perturbateurs. Durant les années suivantes, il décrit plus précisément cette réponse et la nomme « syndrome d'adaptation généralisée » (SGA), le concept de stress voit alors le jour.

2.3. Le concept de stress de Hans Selye

Le SGA est décrit en 3 phases successives (Selye, 1950) : la phase d'alarme, la phase de résistance et la phase d'épuisement. Chaque phase est caractérisée par des changements mesurables de certains organes et par des manifestations physiologiques quantifiables comme une hypertrophie des glandes surrénales ou une hypoglycémie (Figure 3). La phase d'alarme correspond à l'ensemble des réponses de l'organisme à une perturbation soudaine. Il s'agit d'une réaction biologique initiale de courte durée. La phase de résistance correspond à la mobilisation de processus physiologiques permettant de résister dans le cas où la perturbation perdurerait. Lors de la phase d'épuisement, l'organisme n'est plus capable de s'adapter et de nombreuses complications s'ensuivent, souvent caractérisées par des maladies inflammatoires appelées maladies d'adaptation. Il n'est pas nécessaire que ces 3 phases interviennent pour que l'on puisse parler de SGA, seule la phase d'alarme est primordiale. Selye considère l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (ou axe corticotrope) comme l'effecteur clé du SGA grâce à la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse et la libération conséquente de glucocorticoïdes par les glandes corticosurrénales (Selye, 1950).

En 1936, d'après Selye, le SGA est produit par ce qu'il appelle des agents nocifs (« nocuous agents ») comme l'exposition à des produits toxiques (Selye, 1998). Mais lorsqu'il élargit la palette d'agents provoquant le SGA aux expériences telles que l'exposition au froid ou l'effort physique, que l'on ne peut considérer comme nocifs, Selye ne se satisfait plus de ce terme. Après de longues réflexions sur le sens du mot et les implications que son usage peut engendrer, Selye emprunte alors le terme de « stress » à la physique, traduit comme contrainte en français et définissant la force interne qui résiste à un changement par suite de l'effet des forces externes (Selye, 1976). Au sens strict, Selye définit alors le stress comme la réponse non spécifique que donne le corps à toute demande qui lui est faite. Le stress est donc la part non spécifique de la réponse de l'organisme à un agent perturbateur et peut être identifié comme l'interaction entre une force et la résistance de l'organisme à cette force. Les termes stress/contrainte en physique et stress en biologie sont donc bien analogues. Selye précise que le stress n'est pas similaire au SGA, car le SGA correspond à l'ensemble des changements non spécifiques mesurables et quantifiables de l'organisme alors que le stress est la réponse non spécifique globale. Le stress est une abstraction, un concept. De Cannon à Selye, le stress est passé de cause déclenchante à réponse non spécifique.

Le terme stress de Selye est le même dans toutes les langues. Lors d'une série de conférence sur le SGA au Collège de France en 1948, Selye, pourtant francophone, ne trouve pas de mot français pour désigner le terme anglais « stress » qu'il a introduit en biologie. L'anglicisme

« stress » est donc devenu le terme français pour parler du stress de Selye. Il en a été de même dans les autres pays où le terme stress a été adopté : el stress, lo stress, der Stress, etc. (Selye, 1976).

Dans la définition élaborée par Selye, le stress est à distinguer de l'agent qui le produit mais le langage courant emploie généralement les 2 mots comme synonyme. Ainsi, on parle de stress de froid, de stress de contention, de stress infectieux pour se référer au froid, à la contention ou à l'infection employée pour produire le stress. Selye lui-même était conscient de ce problème et dans son livre « Stress of life » (Selye, 1976) qui résume ces recherches concernant le stress, il explique l'origine de cette confusion. Selye n'est pas anglophone et lorsqu'il choisit le terme de stress pour appelé la réponse non spécifique de l'organisme à un stimulus provocateur, il le confond avec le terme « strain », contrainte en français. En effet, la loi physique sur laquelle Selye a calqué son modèle de stress est la loi de Hooke qui stipule qu'une force extérieure (« load ») agissant sur un corps, provoque une tension de ce corps (« stress ») qui peut se transformer en déformation (« strain »). Il explique dans son livre qu'il aurait du choisir le terme « strain reaction » pour décrire la réponse non spécifique et garder le terme stress pour l'agent causant cette réponse afin de bien distinguer les 2 concepts. Mais lorsque ces problèmes terminologiques lui sont venus à l'esprit, le terme de stress en biologie était déjà accepté dans de nombreuses langues et il n'était plus possible d'en changer. Selye a alors crée un néologisme afin de résoudre ce problème : « stressor » en anglais, souvent traduit en français par stresseur ou agent stressant. Le stresseur est le stimulus et le stress est la réponse non spécifique de l'organisme.

Toutefois, les 2 termes sont confondus et on parle encore de stress de froid au lieu de stress produit par le froid. Par conséquent, en ayant à l'esprit les différences entre stress et stresseur, Selye mentionne qu'il est généralement accepté de parler de stress de froid ou de stress de contention.

Pour beaucoup, le concept de stress de Selye n'est pas satisfaisant. La notion de non-spécificité et l'importance toute relative qu'il accorde au système nerveux sympathique lui valent de nombreuses critiques. Bien que la définition de Selye soit toujours aujourd'hui largement répandue, elle ne semble pas complète car elle ne tient pas compte de toutes les données expérimentales. De nouvelles définitions du concept de stress ont donc été élaborées au fil des années.

3. Existe-t-il une définition actuelle du stress ?

Dans l'évolution du concept de stress, l'aspect psychologique et les émotions mais également des facteurs environnementaux et génétiques ont été de plus en plus pris en compte. Le concept de stress est devenu largement multidimensionnel, ce qui complique l'obtention d'une définition claire. Actuellement, beaucoup d'opinions sur ce qu'est le stress et comment le définir et le mesurer existent mais aucune définition n'est actuellement unanimement acceptée.

3.1. Mason : l'importance des émotions

Dans les années 70, Mason (Mason, 1971) est le premier à réellement critiquer le concept de Selye et notamment la notion de non-spécificité de la réponse de stress. Il postule que ce n'est pas l'agent stressant mais la stimulation d'une émotion comme l'anxiété ou la peur qui constitue la base de la réponse neuroendocrine non spécifique à différents stresseurs.

3.2. Weiner : une réponse comportementale spécifique en accord avec les théories de Darwin

Weiner (Weiner, 1991) prend également en considération l'aspect psychologique du concept de stress mais il y intègre surtout les observations concernant les réponses comportementales suite à l'exposition des animaux à différents agents stressant. Ces réponses comportementales face aux stresseurs sont pour lui fondamentalement spécifiques car de la spécificité de ces réponses face au danger, nait la sélection naturelle définie par Darwin. Weiner se base sur les théories de l'évolution et de la sélection naturelle de Darwin pour formuler sa définition du stress. Il décrit alors le stress comme une pression sélective provenant de l'environnement physique mais également social qui menace et défie un organisme, provocant alors une réponse compensatoire adaptative.

3.3. Levine et Ursin : partie intégrante d'un système adaptatif

Pour Levine et Ursin (Levine & Ursin, 1991), le stress est composé de 3 éléments principaux : le stimulus, l'évaluation par le système d'intégration de ce stimulus et la réponse correspondante de l'organisme. Le stress est ici considéré comme partie intégrante d'un système biologique adaptatif.

3.4. Chrousos et Gold : un état d'homéostasie menacée

La notion de système adaptatif est également présente dans la définition de Chrousos et Gold (Chrousos & Gold, 1992). Ils définissent le stress comme un état de disharmonie où l'homéostasie est menacée, cet état entraîne des réponses adaptatives physiologiques et comportementales. Ces réponses peuvent être spécifiques de l'agent stressant ou généralisées, non spécifiques et par conséquent stéréotypées lorsqu'un certain seuil est dépassé. Chrousos et Gold intègrent dans leur concept de stress le fait que le polymorphisme génétique et les altérations de l'expression de gènes et des facteurs environnementaux sont des déterminants très importants de la réponse individuelle au stress.

3.5. Goldstein : une inadéquation entre attentes et perceptions

Goldstein (Goldstein, 1995) définit le stress comme une condition où les attentes, quelles soit génétiquement programmées, établies par un apprentissage préalable ou déduites des circonstances, ne correspondent pas aux perceptions courantes ou anticipées de l'environnement interne ou externe. C'est cette divergence entre ce qui est observé ou ressenti et ce qui est attendu ou programmé qui provoque des réponses compensatoires de l'organisme.

3.6. McEwen : la notion d'allostasie et de coût allostatique

Plus récemment, McEwen (McEwen, 1998) introduit le terme d'« allostasie » dans la recherche sur le stress. L'allostasie est le processus de maintien de la stabilité interne du milieu (l'homéostasie) grâce à des changements physiologiques et comportementaux. Dans le stress, l'allostasie représente les processus actifs d'adaptation grâce à l'activation de différents systèmes comme l'axe corticotrope, le système nerveux autonome et d'autres systèmes métaboliques. McEwen définit également le coût allostatique correspondant au coût de cette adaptation (« allostatic load »). Grâce à ses notions, il intègre les aspects importants d'anticipation d'un nouvel événement stressant et de style de vie (régime alimentaire, rythme du sommeil, etc.) dans la contribution au coût allostatique. L'exposition a des stresseurs engendre ainsi des processus d'adaptation de l'organisme (allostasie) ayant un coût (coût allostatique) défini par de nombreux facteurs et dont vont dépendre les conséquences délétères ou non de cette exposition.

3.7. Des points communs aux différentes définitions du stress

Il n'y a actuellement pas de consensus sur la définition du stress mais des idées importantes sont mises en avant dans chaque définition (Pacak & Palkovits, 2001). En effet, le stress est une réponse adaptative ou compensatoire à une situation perturbée. Cette situation perturbée est soit due à un agent stressant, soit à une inadéquation entre l'attente et la réalité. La réponse adaptative vise à maintenir un équilibre plus ou moins relié à l'homéostasie et est influencée par des facteurs psychologiques, génétiques et innés, l'expérience mais aussi l'environnement et le style de vie. La réponse de stress ne semble pas exclusivement non spécifique comme l'a énoncé Selye, même si elle implique l'activation de systèmes communs à tous les agents stressant et donc une part de réponses communes.

ANNEXE 2 : ARTICLE 1 "INHIBITION OF FOOD INTAKE INDUCED BY ACUTE STRESS IN RATS IS DUE TO SATIATION EFFECTS"

Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiation effects

J CALVEZ[1,2,3], G FROMENTIN[1,2], N NADKARNI[1,2], N DARCEL[1,2], P EVEN[1,2], D TOME[1,2], N BALLET[3], C CHAUMONTET[1,2]

[1] INRA, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

[2] AgroParisTech, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

[3] Lesaffre Feed Additives, F-59520 Marquette-lez-Lille, France

Correspondence should be addressed to:

Catherine Chaumontet

UMR 914 INRA/AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05

catherine.chaumontet@agroparistech.fr

Fax number: 00 33 (0)1 44 08 18 58; tel number: 00 33 (0)1 44 08 86 79

Abstract

Acute mild stress induces an inhibition of food intake in rats. In most studies, the cumulative daily food intake is measured but this only provides a quantitative assessment of ingestive behavior. The present study was designed to analyze the reduction in food intake induced by acute stress and to understand which behavioral and central mechanisms are responsible for it. Two different stressors, restraint stress (RS) and forced swimming stress (FSS), were applied acutely to male Wistar rats. We first measured corticosterone and ACTH in plasma samples collected immediately after acute RS and FSS in order to validate our stress models. We measured food intake after RS and FSS and determined meal patterns and behavioral satiety sequences. The expressions of CRF, NPY and POMC in the hypothalamus were also determined immediately after acute RS and FSS. The rise in corticosterone and ACTH levels after both acute RS and FSS validated our models. Furthermore, we showed that acute stress induced a reduction in cumulative food intake which lasted the whole day for RS but only for the first hour after FSS. For both stressors, this stress-induced food intake inhibition was explained by a decrease in meal size and duration, but there was no difference in ingestion speed. The behavioral satiety sequence was preserved after RS and FSS but grooming was markedly increased, which thus competed with, and could reduce, other behaviors, including eating. Lastly, we showed than RS induced an increase in hypothalamic POMC expression. These results suggest that acute stress may affect ingestive behavior by increasing satiation and to some extent by enhancing grooming, and this may be due to stimulation of the hypothalamic POMC neurons.

Key words

Restraint stress, forced swimming stress, stress-induced anorexia, grooming, meal pattern analysis, behavioral satiety sequence.

1. Introduction

Acute mild stressors such as restraint [1, 2], social defeat [3], forced swimming [4] or immobilization [5] induce an inhibition of food intake in rats, but the precise mechanisms responsible for this inhibition have not been fully elucidated and appear to be complex.

Stress is defined as a state of threatened homeostasis, which is restored by a complex repertoire of physiological and behavioral adaptive responses [6, 7]. The stress system is subserved by a complex system involving the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis and the sympathetic nervous system. Activation of the HPA axis by stress is characterized by the release of corticotropin-releasing factor (CRF) from the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. CRF then stimulates the secretion of adrenocorticotropin hormone (ACTH) from the anterior pituitary. Circulating ACTH acts on the adrenal cortex to stimulate the release of glucocorticoids (corticosterone in rodents), which are the final mediators of the HPA axis. In turn, glucocorticoids feedback to the brain to shut off further activation of the HPA axis [8]. CRF appears to play a critical role in the relationship between food intake and stress. It has been recognized to suppress food intake [9] and particularly to be involved in stress-induced food intake inhibition [10]. Furthermore, CRF-producing neurons of the PVN innervate and are innervated by neurons that produce the anorectic peptide precursor proopiomelanocortin (POMC) and neurons producing the orexigenic neuropeptide Y (NPY) in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus [6, 11]. Food intake inhibition induced by acute stress may be due either to a direct anorectic effect of CRF (by instance, through inhibition of the parasympathetic nervous system and its consequences on gastric motility and gastric emptying [12]), or to an indirect effect of CRF via inhibition of the expression of NPY and/or stimulation of the expression of POMC in the hypothalamus [13-16].

The aim of the present study was to characterize the effect of acute restraint stress (RS) and forced swimming stress (FSS) on ingestive behavior in rats. These stress paradigms have both been classified as emotional stressors [17] because the animals are stressed by the psychological fear of being in an inescapable environment. Our aim was not to compare both stressors; we used two different stressors in order to generalize the stress effect and ensure that the effects would not be due to the specific properties of one stress paradigm. In experiment 1, we measured the effect of these acute stress models on cumulative food intake. Concomitantly, CRF, ACTH and corticosterone levels were analyzed in order to determine the activation of the HPA axis, as well as other classical stress markers such as the plasma glucose concentration [18] and anxiety level, evaluated using an open field test [19]. In order to determine the respective roles of CRF, POMC and NPY in this stress-induced food intake inhibition, we measured the hypothalamic mRNA expression of these neuropeptides immediately after acute

stress. During experiment 2, the aim was to obtain more information on the mechanisms through which food intake was inhibited by acute stress. To understand the mechanisms that regulate ingestive behavior, it is necessary to assess food intake qualitatively [20]. Analysis of meal patterns [21, 22] and behavioral analysis, such as the behavioral satiety sequence [23, 24], can provide important information on satiety mechanisms but have hardly ever been investigated with respect to stress-induced food intake inhibition. We analyzed meal patterns following acute stress and the behavioral satiety sequence (BSS) of the first hour of food intake following acute stress.

2. Material and methods

2.1. Animals and diet

Adult, male Wistar rats (Harlan, Ganat, France) initially weighting 275-300 g were housed in individual stainless steel cages in a temperature-(23 ± 1 °C) and humidity-(55 ± 3 %) controlled room with an artificial 12:12 h light-dark reverse cycle (light off at 10:00). For all experiments, the rats were adapted to the laboratory conditions and the diet protocol for the first 10 days. All experiments were carried out according to the guidelines of the French National Committee for Animal Care and the European Convention of Vertebrate Animals Used for Experimentation, under the European Council Directive 86/609/EEC of November 1986. The rats were fed a standard AIN 93M diet composed of 140 g/kg whole milk protein, 622.4 g/kg cornstarch, 100.3 g/kg sucrose, and 40 g/kg soybean oil [21, 25]. This diet was supplemented with minerals and vitamins and supplied 14.6 kJ/g (UPEA, INRA, Jouy-en-Josas, France). It contained 14 % of energy as protein, 76 % as carbohydrate and 10 % as lipid. The diet was moistened (water/powdered diet, 1:1) to minimize spillage and the food containers were refilled daily with fresh food. Except for 2 h before and during stress exposure, food was freely available throughout the experimental period. Water was available ad libitum.

2.2. Stress procedures

During each study, restraint stress (A) and forced swimming stress (B) were tested using similar procedures. The rats were divided in two groups, control and stress, and the latter was exposed to a stress 30 min after the beginning of the dark cycle for 1 or 2 days.

Restraint stress: The rats were moved to a dark experimental room and placed in a perforated plastic tube (6 × 20 cm) for 3 h. Control rats were moved to another dark experimental room and placed in shoe-box cages. Both groups were left without food and water. At the end of the 3-h RS period, all rats were returned to their cages.

Forced swimming stress: The rats were moved to a dark experimental room and placed for 10 min in a cylindrical plastic tank (height 100 cm, internal diameter 50 cm) containing water (25 °C) to a height of 75 cm. At the end of the FSS, the rats were dried carefully with a towel before being transferred to their home cage and allowed to dry for few minutes (stressor exposure and drying time account for a total of 30 min). Control rats were left undisturbed in their cage without food and water.

2.3. Experiment 1, Validation of our stress models and effect of acute stress on food intake and neuropeptides involved in food intake regulation or/and the stress response

Forty-eight rats were included in each experiment (1A and 1B). After adaptation, the rats were divided in three groups and then within each group were subdivided into two weight-matched groups: control (no stress; n = 8) and stress (n = 8). In the first group, immediately after acute stress exposure, the rats were subjected to an open field test to evaluate their anxiety level. In the second group, acute stress was applied for two consecutive days. Food intake was measured during the two days before stress exposure to obtain baseline values and then during the two days of stress exposure. Body weight and body weight gain were also measured at baseline and during stress exposure. In the third group, the rats were decapitated immediately after one stress exposure. Trunk blood was collected in EDTA-coated tubes; the samples were centrifuged and then the plasma was aliquoted and stored at - 20 °C for determinations of corticosterone, ACTH and glucose plasma concentrations. The brains were removed and the hypothalamus rapidly dissected out on ice, stored into Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), snap-frozen in liquid-nitrogen and stored at - 80 °C for the subsequent determination of mRNAs expression encoding CRF, NPY and POMC.

2.4. Experiment 2, Effect of acute stress on food intake patterns and behavioral analysis

Experiment 2 was carried out in order to analyze in more detail the reduction in food intake induced by RS (2A) and FSS (2B). Eating-related and non-eating-related behaviors were studied on the basis of feeding pattern analyses and behavioral satiety sequences. Fourteen rats were divided into two weight-matched groups: control (no stress) and stress. After a 10-day adaptation period in individual stainless steel cages, the rats were placed for 3 days in cages fitted with custom-build electronic equipment that measures food intake by the continuous weighing food cups fixed to the side of the cage. The rats were adapted to these conditions during the first day. On the second day, the food intake pattern was recorded for baseline. On day 3, stress was applied 30 min after the beginning of the dark cycle and the food intake pattern was monitored. The first hour of food intake after stress exposure was also video-recorded for

behavioral analysis. In order to determine the stable basal food intake, basal and stress daily food intakes were compared in each control group (RS and FSS) and no differences were found.

2.5. Open field test

A separate dark room with red light was used to administer the open field test. The apparatus consisted of a 125 cm diameter round arena surrounded by a 60 cm high wall. At the beginning of the test, the rats were placed one by one in the centre of the arena and their activity were recorded for 4 min with a digital video camera (Sony digital video camera recorder DCR-HC51E) for later analysis. The animals were left undisturbed in the room during the test and returned to their home cage immediately afterwards. Open field activity was scored manually using ethological behavioral analysis software that permits the real-time scoring of behavior via direct keyboard entry to a personal computer (The Observer XT 9.0). During the analysis, the open field arena was divided virtually into central, outer and inner zones. The measurements scored from the videotapes were the total duration of locomotion, immobility, grooming and rearing. The periods spent in each zone were also determined.

2.6. Food intake measurements

During experiment 1, food intake was determined by the difference in the weight of the food cup before and after each experimental period, corrected for spillage and evaporation. Food cups were weighed 3 h and 6 h after the end of stress exposure and at the time of food cup removal from the cage, corresponding to total daily food intake. Since no difference had been found during a preliminary study between the 3-h, 6-h and daily food intake in FSS and control rats, we also weighed the food cups 1 h after the end of FSS. Food intake was converted into kJ (1 g of dried diet = 14.6 kJ). As there were no between-day differences between either the two baseline days or during the two stress days within each group, average food intakes were calculated.

2.7. Meal pattern analysis

During experiment 2, food intake was recorded by placing the food cups on strain gauges with an accuracy of 0.01 g (Phimesure, Carpentras, France). The cage equipment was controlled and measurements recorded in 1 s time bins by a computer running a program designed in the laboratory. Cumulative food intake was recorded throughout the period of food presentation. For each animal, the microstructure of feeding was analyzed according to the following criteria: an eating bout was defined as a feeding event of more than 0.1 g and lasting more than 10 s [21, 26]. Two feeding events were considered as two different meals if they were separated by longer

than 10 min, otherwise they were considered as one bout of the same meal. Analysis of the feeding sequence enabled the extraction of the following meal-related parameters: meal numbers, meal size (kJ), meal duration (min), ingestion speed (kJ/min) and inter-meal interval (min). These meal related parameters were analyzed for the daily recording session under the dark/light phase distribution, and because in experiment 1 it had been found that RS and FSS caused an inhibition of food intake during the first 1 h and 3 h, respectively, we also analyzed the first 1 h and 3 h recorded periods following stress exposure.

2.8. Behavioral analysis

During experiment 2, the first hour of food presentation after stress exposure was video-recorded. The experimental cages were the same as those used for food intake patterns. They consisted of a circular Plexiglas tank with the food cup fixed to the wall. Infrared video cameras (Sony digital video camera recorder DCR-HC51E) were placed outside the cage at a slight angle to facilitate the identification of behaviors. The video signal was recorded on digital video tape. Videotapes were scored blind by a highly trained observer using ethological behavioral analysis software that permits the real-time scoring of behavior via direct keyboard entry to a personal computer (The Observer XT 9.0). The measurements scored from videotapes were the total frequency and total duration of eating, grooming, resting, locomotion, rearing and sniffing (for definitions see Bensaid et al. 2003 [21]). Activity was calculated as the sum of locomotion, rearing and sniffing. In addition to these total 1-h behavioral scores, the software permitted division of the test session into twelve, 5 min time bins, thereby facilitating the assessment of behavioral patterns over time. Behavioral data for each time bin were used to construct behavioral satiety sequence (BSS) profiles and explore the temporal relationship between eating, grooming, resting and activity [21, 27]. A vertical dashed line was inserted in each profile to represent transitions between eating and resting behaviors [23]. However, it should be noted that these transitions were not mathematically derived and were intended to provide only reference points to facilitate the visualization of differences in the temporal patterning of behaviors [28].

2.9. Plasma analysis

Corticosterone and ACTH concentrations were analyzed using a specific kit (Rat stress hormone panel from Linco Research, St. Charles, MI, USA) on a Bioplex 200 system (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Plasma glucose concentrations were determined by a colorimetric enzymatic method using a commercial kit (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.10. Quantification of the mRNA expression of hypothalamic neuropeptide

Total RNA was extracted from each hypothalamus with 1 ml of Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and homogenized using a TissueLyser (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total RNA concentrations were determined by measuring absorbance at 260 nm with a Nanodrop spectrophotometer (Labtek, Paris, France). A synthesis of strand complementary DNA (cDNA) was performed on 400 ng of total RNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers were designed using Primer Express software, and an 18S protein was used as a housekeeping gene to normalize the mRNA abundance of each gene. 18S is known to be a pertinent housekeeping gene for hypothalamic gene expression in food intake studies [29] and is not affected by acute or chronic stress in, at least, the PVN of the hypothalamus [30]. BLASTN searches were conducted against GenBank to check the total gene specificity of the nucleotide sequences chosen for the primers. The sequences of the PCR primers used were: 5'-CCGCAGCCGTTGAATTTCTT-3' (forward) and 5'-TTCTTCACCCATGCGGATCA-3' (reverse) for CRF, 5'-TTTTCCTAGTTTCCCCCCACAT-3' (forward) and 5'-CCTGGTGGTGGCATGCAT-3' (reverse) for NPY, 5'-AGGCCTTTCCCCTAGAGTTCAA-3' (forward) and 5'-GTCGGCCTTCTCGGTATCC-3' (reverse) for POMC and 5'-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3' (forward) and 5'-GGGTCGGGAGTGGGTAATTT-3' (reverse) for 18S. PCR reactions were performed using a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Each cDNA was amplified in a 20 µl volume containing 15 µl of 2 × SYBR Green master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 500 nM concentrations of the gene-specific primer. Thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95 °C for 10 min and 40 amplification cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The cycle threshold for each sample was determined at a constant fluorescence threshold line. For each run, a melt curve was subsequently performed to analyze the products generated for any contamination resulting from residual genomic DNA amplification (using a control without reverse transcriptase) and/or from the formation of primer dimers (controls containing no DNA template). Quantitative values for cDNA amplification were obtained from the threshold cycle number (Ct) at which the increase in signal was associated with exponential growth of the PCR products that were starting to be detected. The overall efficiency (E) of PCR was calculated from the slopes of the standard curves according to the equation: $E = (10^{-1/slope}) - 1$. All cDNA were amplified with an efficiency greater than 98 %, indicating that 18S and the target gene were amplified with the same efficiency. Gene expression was determined using the $2^{-\Delta Ct}$ formula, where ΔCt = (Ct target gene - Ct 18S).

2.11. Statistical analysis

Results are presented as means ± standard errors (SE). Statistical analyses were performed using the SAS statistical package (SAS/STAT version 9.1; SAS Institute, Cary, USA). Differences between control and stressed groups (RS or FSS) were determined using an unpaired Student t-test. Because a time effect was involved in food intake patterns, differences between groups were determined using a mixed model for repeated measures to test the group, time and group × time effects. Comparisons of group means at different time points were performed using Tukey-Kramer's post-hoc test for multiple comparisons. Differences were considered to be significant at $P < .05$.

3. Results

3.1. Analysis of stress markers: Open field test, plasma stress markers (Table 1) and hypothalamic CRF, NPY and POMC mRNA expression (Table 2)

A/ Restraint Stress: RS resulted in a significant reduction in the duration of locomotion during the open field test when RS (162 ± 3 s) and control rats (175 ± 4 s) were compared (P = .029). No effect of RS on other behaviors was observed (data not shown). Immediately after acute exposure to RS, plasma corticosterone and ACTH levels were nearly 4-fold higher in the RS group than in the control group (P = .013 and P = .043 respectively). RS was not found to exert any effect on plasma glucose levels. Immediately after acute exposure to RS, the levels of mRNA encoding POMC in the hypothalamus of RS rats were increased 6-fold when compared to control rats (P = .014). RS was not found to exert any effect on mRNA encoding CRF and NPY in the hypothalamus.

B/ Forced Swimming Stress: FSS had no effect on open field parameters (data not shown). Immediately after acute FSS, significant increases in plasma corticosterone (3-fold; P < .0001), plasma ACTH (3-fold; P = .016) and plasma glucose (+ 24 %; P = .006) levels were observed in stressed rats when compared to the controls. No effect of one exposure to FSS was found on hypothalamic mRNA encoding CRF, POMC and NPY.

3.2. Food intake, body weight and body weight gain

A/ Restraint Stress: No difference between the RS and control groups was found in terms of baseline food intake (data not shown). A significant reduction in the 3-h (- 17 %; P = .002), 6-h (- 14 %; P = .025) and total daily cumulative (- 9 %; P = .034) food intake of stressed rats was observed after RS when compared to controls (Fig. 1A). At the end of the baseline period, the body weights of control and RS rats did not differ (377 ± 7 g and 370 ± 6 g, respectively). After two days of RS, there was no difference in body weight between control and RS rats (387 ± 7 g

and 375 ± 6 g, respectively). However, a significant, 42 % reduction in body weight gain occurred after RS (2.8 ± 0.4 g) when compared to the control animals (4.9 ± 0.5 g; P = .005).

B/ Forced Swimming Stress: No difference between the FSS and control groups was found in terms of baseline food intake (data not shown). A significant reduction in the cumulative food intake of stressed rats was observed 1 h (- 24 %; P = .034) after FSS when compared to the control animals (Fig. 1B). No differences in 3-h, 6-h and daily cumulative food intakes were found between FSS and control rats. At the end of the baseline period, the body weights of control and FSS rats did not differ (356 ± 4 g and 352 ± 5 g, respectively). After two days of FSS, there was still no difference in body weight between control and FSS rats (368 ± 5 g and 361 ± 6 g, respectively). No difference in body weight gain was found in FSS rats when compared to the control animals (data not shown).

3.3. Food intake pattern analysis

A/ Restraint Stress: No differences in baseline food intake patterns were found between the control and RS groups (data not shown). Daily cumulative food intake patterns following RS exposure are shown in Fig.2A. RS rats displayed a significantly smaller cumulative food intake throughout the day following stress exposure when compared to control rats (group: P < .0001; time; P < .0001; group × time: P = .0002). Meal-related parameters measured during the 1-h, 3-h and daily recording sessions after stress exposure are summarized in Table 3. The cumulative food intake of RS rats during the 1-h, 3-h and daily recording sessions was significantly lower than that seen in control rats (P = .010, P = .028 and P = .006 respectively). No effect of RS-related meal parameters was observed during the 1-h recording session. Meal size was significantly smaller during the first 3 h after RS when compared to controls (P = .032) and meal duration tended to be shorter (P = .083). The reduction in meal duration after RS became statistically significant during the dark phase recording session (control: 9.9 ± 1.4 min; RS: 6.3 ± 0.7 min; P = .036). These results were sustained during the daily recording session because both meal size and meal duration values were significantly lower in the RS group than in controls (P = .012 and P = .039, respectively). No effect of RS on the other 3-h and daily meal-related parameters was observed.

B/ Forced Swimming Stress: No differences in baseline food intake patterns were observed between the control and FSS groups (data not shown). The daily cumulative food intake pattern following FSS exposure is shown in Fig. 2B. There was no effect of FSS on the daily food intake pattern and only a time and time × group effect (P < .0001 and P = .008 respectively). FSS rats displayed a significantly smaller cumulative food intake during the first 1 h after stress exposure (Fig. 2C) when compared to control rats (group: P = .014; time: P < .0001; group ×

time: P < .0001) but this inhibition was quickly compensated during the next hour. Meal-related parameters measured during 1-h, 3-h and daily recording sessions after stress exposure are summarized in Table 3. As during experiment 1, only the cumulative food intake of FSS rats during the first 1 h after stress was significantly smaller than that seen in control rats (P = .015). Meal size was smaller during the first 1 h after stress exposure (P = .029) and there was no effect of FSS on the other 1-h meal-related parameters. No effect of FSS on cumulative food intake and meal-related parameters was observed during the first 3-h, the daily recording session (Table 3) and the dark/light phase (data not shown).

3.4. Behavioral Satiety Sequence

A/ Restraint Stress: In control rats, the four BSS behaviors appeared in their well-defined sequence [21, 23, 27]: eating, followed by grooming and/or activity, followed by resting (Fig. 3A.). In RS rats, the BSS was not disturbed. The transition between eating and resting (identified by the vertical dashed line) occurred during the third time bins in control animals and was not modified by RS. The eating profile was not modified by RS (Fig. 3A) and there were no differences between groups in terms of the total duration and frequency of eating (Fig. 4A). By contrast, the grooming profile was rapidly increased (time bins T3 and T4) to the detriment of activity (Fig. 3A). The grooming profile decreased in T5 but was maintained at a higher level than in control rats until the end of the observation period. The total duration of grooming was twice longer in the RS group than in control animals (P = .024) and a tendency towards a reduction of the total duration of sniffing was observed (P = .06) (Fig. 4A). RS also induced a reduction in the total frequency of resting (P = .036) and sniffing (P = .009) (Fig. 4A).

B/ Forced Swimming Stress: Again, in control rats, the four BSS behaviors appeared in their well-defined sequence, as described above. The BSS was not disturbed after FSS (Fig. 3B). In both control and FSS rats, the transition between eating and resting occurred simultaneously during the third time bin. In FSS rats, the eating and resting profiles were preserved despite a more rapid reduction in eating and a slower increase in resting than in control rats (Fig. 3B). The total duration of eating decreased after FSS (354 ± 31 s) when compared to controls (457 ± 22 s; P = .016). Eating duration represent the total duration of eating bouts. We also observed a reduction in resting frequency (P = .021) in FSS animals when compared to the controls (Fig 4B). Furthermore, grooming increased more rapidly (time bin T2) to the detriment of activity and was maintained at a high level until time bin T8 in FSS animals when compared to the controls (Fig. 3B). Grooming duration was twice as long in FSS rats as in the control animals (P = .003) and resting duration tended to be lower in FSS rats than in control rats (P = .08) (Fig. 4B).

4. Discussion

This work was designed to analyze the reduction in food intake induced by acute RS and FSS in rats, and to evaluate the behavioral and central mechanisms involved in these effects. The present results showed a reduction in daily cumulative food intake after RS and in cumulative food intake during the first 1 h after FSS. Specifically, experiment 1 showed that RS inhibited feeding during the first 3 h after stress, leading to a reduction in daily cumulative food intake, whereas FSS only inhibited feeding during the first hour after stress. However, the inhibition after FSS was compensated for during subsequent hours, so that the daily food intake remained unchanged. Consequently, body weight gain was decreased by RS but not by FSS. These results are in accordance with those of other studies which demonstrated the same reduction in daily cumulative food intake after RS [1, 2] and no effect on daily cumulative food intake after FSS [4, 31].

The rise in corticosterone and ACTH levels and the reduction in locomotion during the open field test after RS, as well as the increase in corticosterone, ACTH and glucose levels after FSS, confirmed the effectiveness of the two stress models. During the present study, locomotion decreased only after RS and no effect of FSS could be observed. RS has been reported to reduce activity during open field tests performed immediately [32] or 24 h [33] after the end of stress exposure. The lack of any effect regarding the FSS paradigm suggested that the open field test might not have been sufficiently sensitive. By contrast, the results showed that corticosterone and ACTH plasma levels rose after both RS and FSS. This result is consistent with previous reports [1, 34-36] and indicates an activation of the HPA axis by these stressors. It should be noted that ACTH and corticosterone plasma levels in RS control groups were lower than in FSS control groups, but this difference was probably due to differences in sampling time and not to technical issues because the hormone assays were performed simultaneously on all samples. Indeed, blood was sampled 3 h 30 after the beginning of the dark phase in the RS experiment and only 1 h after in the FSS experiment. The HPA axis displays a pulsatile pattern of CRF, ACTH and glucocorticoid secretion and ACTH and glucocorticoid exhibit a well-characterized circadian profile [37, 38]. Secretion peaks for ACTH and corticosterone appear at the beginning of the dark phase. FSS samples might have been assayed during high basal levels of ACTH and corticosterone, whereas RS samples were assayed at a later stage, during possibly lower basal hormone levels. Glucose is also a classical marker of stress, and the results showed an elevation of glucose levels after FSS but not after RS. Many studies have found an elevation of plasma glucose levels after RS or FSS [18, 34, 35, 39] when rats were fed ad libitum and then had no access to food during stress exposure. In the present study, the food cups were removed from the cages 2 h before stress exposure, towards the end of the light phase. Therefore, at the time of

blood sample collection, RS rats had fasted for at least 5 h, whereas FSS rats had fasted for 2 h 30. Moreover, glucose levels in RS control rat were significantly lower (65.8 ± 2.9 mg/dl) than those in FSS control rats (83.7 ± 2.6 mg/dl). This difference in the fasted state may have explained the difference in plasma glucose values after stress, since it has been shown that glucose release in response to stress may be attenuated by fasting [40].

Analysis of the structure of meal patterns and the behavioral satiety sequence during the first hour after food intake following RS and FSS strongly suggests that acute stress could affect ingestive behavior, mainly by increasing satiation more than satiety or other appetite suppressant activities. Firstly, data from the meal pattern analyses indicated that both acute stress paradigms induced a reduction in food intake by decreasing meal size as early as the first hour after FSS stress and within 3 h of RS stress, but this effect was sustained for the next 24 h only after RS. This result agrees with previous observations of RS in mice [22]. It should be noted that although we observed a reduction in 1-h food intake after RS, we did not find any difference in meal-related parameters or BSS eating behaviors during the first hour of food intake. RS control rats were moved to another room during the application of stress; this change of cages may have upset these animals and thus obscured differences between the control and RS groups. Furthermore, analysis of the daily results of meal patterns showed that the reduction in meal size was associated with a shortening of meal duration and no difference in ingestion speed after RS. After FSS, we also found that the reduction in 1-h meal size was associated with a shorter eating bout duration measured during the behavioral analysis and no difference in ingestion speed. Considering the 2h-food intake pattern in Figure 2C, it seems that satiation during eating occurred more rapidly in FSS rats compared with control rats. Indeed, cumulative food intake during the first 5 min was identical in both groups but from 10 min after the beginning of eating, food intake is reduced in FSS rats. Enhanced satiety would have been detected by a reduction in meal numbers and an increase in the inter-meal interval. There are also several reasons why the more marked appetite suppressant activity of the stressors was not induced by “malaise” or a conditioned aversion. The rate of ingestion was not decreased and the BSS was not disrupted, whereas this would have been the case (after the habituation period) in the event of a “malaise” or conditioned aversion [21, 26].

With both stressors, the BSS was preserved and the four principal behaviors always occurred in their well-defined sequence: eating followed by grooming and/or activity, followed by resting. Despite this preserved BSS, acute stress did modify non-ingestive behaviors. Both stressors increased grooming. Forced swimming and restraint stress might have induced grooming due to specific characteristics of each stressor (e.g. wet fur induced by FSS or dirty fur induced by urination during RS). However, since this behavior was enhanced by equivalent proportions

after both stressors, we supposed that it was effectively increased by stress and not by specificities of each stressor. Grooming is an important part of the rodent behavioral repertoire and plays an important role in behavior adaptation to stress, including stress-coping and de-arousal [41, 42]. In line with our results, findings in the literature have shown that stress induces an increase in grooming [43-45]. Based on the BSS profiles, it seems that the increase in grooming after RS and FSS was concomitant with a reduction in other behavioral parameters, particularly resting and activity. In fact, increased grooming would naturally reduce the time available for other behaviors and it is possible that grooming competed with, and reduced, food intake [46].

It has been hypothesized that the inhibition of food intake induced by acute stress might be due to a direct anorectic effect of CRF, or to an indirect effect of CRF via the inhibition of NPY expression and/or the stimulation of POMC expression in the hypothalamus. CRF is an actor in HPA axis activation but is also known to participate in the control of ingestive behavior by limiting food intake [9, 14], particularly in acute stress-induced anorexia [10]. We did not detect any effect of acute RS and FSS on hypothalamic mRNA encoding CRF which is a primary factor that regulates stress-induced activity in the HPA axis [8]. These results are consistent with those of Harris et al. [47], who showed that acute RS had no effect on CRF expression in the PVN when brains were dissected immediately after stress exposure but are discrepant with many studies that have reported an increase in CRF expression after acute RS or FSS when brains were collected 1 h or 2 h after the end of stress [48-51]. Taken together, these data suggest that the time-window of hypothalamus removal is crucial to detecting any difference in CRF expression after either RS or FSS. We did not find any effects of acute RS and FSS on NPY expression in the hypothalamus, in line with previous findings where acute stress had no effect on hypothalamic NPY [2, 52] or ARC NPY expression [53, 54] measured immediately after stress. We found that RS induced a significant increase in the mRNA expression of POMC in the whole hypothalamus immediately after stress exposure. As for FSS, we did not find any effect on POMC expression, whereas an inhibition of food intake, a reduction in meal size and an increase in grooming were all observed. FSS and RS are both psychological stressors but they differ both in terms of their duration and the time course inhibition of food intake. As both stressors modulate food intake by decreasing meal size and meal duration without modifying the rate of ingestion, we hypothesize that both RS and FSS may modulate food intake via common pathways but according to different time courses. Few studies have shown that RS and immobilization stress induce an increase in POMC expression in the hypothalamus [55, 56]. Furthermore, Liu et al. [57] showed that the POMC pathways in the ARC were activated after

acute RS and FSS. POMC is the precursor of a number of peptides, including α-MSH, a potent anorectic peptide known to modulate meal size because of a projection from the ARC to the brainstem [58-60]. Furthermore, melanocortins, and especially α-MSH, are known to induce grooming when injected via the intracerebroventricular route [61]. POMC neurons of the ARC are also known to increase energy expenditure [62]. It is thus possible that the increase of POMC expression is involved in the increase of energy expenditure induced by stress [47, 63]. Since we did not determine energy expenditure in our study, this hypothesis remains to be demonstrated.

5. Conclusions

Our findings confirm previous reports on the effects of acute stress on food intake in rodents, but also supply further essential information of the mechanisms responsible for modifications to ingestive behavior triggered by stress. Both RS and FSS caused an inhibition of food intake according to a different time course. The food intake inhibition induced by acute stress seemed to result from a satiation effect that was emphasized by the reductions in meal size and duration, and no effect on the rate of ingestion. Both stressors also increased grooming which could compete with other behaviors, including eating. We hypothesize that feeding inhibition may be due to the effect of POMC, precursor of α-MSH which is involved in satiation mechanisms and grooming behavior. Our results provide evidence of the advantages of using both meal pattern analysis and BSS to fully describe and understand the behavioral mechanisms of food intake regulation. To further investigate the involvement of satiation pathways in stress-induced inhibition of food intake, the consequences of acute stress on neuronal activation and expression of neurotransmitters in the NTS should be assessed.

References

[1] Harris, R. B., Zhou, J., Mitchell, T., Hebert, S., Ryan, D. H. Rats fed only during the light period are resistant to stress-induced weight loss. Physiology & behavior. 2002,76:543-50.

[2] Rybkin, II, Zhou, Y., Volaufova, J., Smagin, G. N., Ryan, D. H., Harris, R. B. Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. The American journal of physiology. 1997,273:R1612-22.

[3] Bhatnagar, S., Vining, C., Iyer, V., Kinni, V. Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. Journal of neuroendocrinology. 2006,18:13-24.

[4] Diane, A., Victoriano, M., Fromentin, G., Tome, D., Larue-Achagiotis, C. Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats. Appetite. 2008,50:397-407.

[5] Ricart-Jane, D., Rodriguez-Sureda, V., Benavides, A., Peinado-Onsurbe, J., Lopez-Tejero, M. D., Llobera, M. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. Metabolism: clinical and experimental. 2002,51:925-31.

[6] Chrousos, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. Annals of the New York Academy of Sciences. 1998,851:311-35.

[7] Kyrou, I., Tsigos, C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. Current opinion in pharmacology. 2009,9:787-93.

[8] Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G. Endocrinology of the stress response. Annual review of physiology. 2005,67:259-84.

[9] Richard, D., Lin, Q., Timofeeva, E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. European journal of pharmacology. 2002,440:189-97.

[10] Krahn, D. D., Gosnell, B. A., Grace, M., Levine, A. S. CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding. Brain research bulletin. 1986,17:285-9.

[11] Williams, G., Bing, C., Cai, X. J., Harrold, J. A., King, P. J., Liu, X. H. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. Physiology & behavior. 2001,74:683-701.

[12] Stengel, A., Tache, Y. Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. Annual review of physiology. 2009,71:219-39.

[13] Heinrichs, S. C., Menzaghi, F., Pich, E. M., Hauger, R. L., Koob, G. F. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. Brain research. 1993,611:18-24.

[14] Heinrichs, S. C., Richard, D. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. Neuropeptides. 1999,33:350-9.
[15] Millington, G. W. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. Nutrition & metabolism. 2007,4:18.
[16] Morley, J. E., Levine, A. S., Gosnell, B. A., Kneip, J., Grace, M. Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. The American journal of physiology. 1987,252:R599-609.
[17] Dayas, C. V., Buller, K. M., Crane, J. W., Xu, Y., Day, T. A. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. The European journal of neuroscience. 2001,14:1143-52.
[18] Armario, A., Marti, J., Gil, M. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. Psychoneuroendocrinology. 1990,15:341-7.
[19] Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., Landgraf, R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. Behavioural brain research. 1998,94:301-10.
[20] Geary, N. A new way of looking at eating. American journal of physiology. 2005,288:R1444-6.
[21] Bensaid, A., Tome, D., L'Heureux-Bourdon, D., Even, P., Gietzen, D., Morens, C., et al. A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. Physiology & behavior. 2003,78:311-20.
[22] Tabarin, A., Diz-Chaves, Y., Consoli, D., Monsaingeon, M., Bale, T. L., Culler, M. D., et al. Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. The European journal of neuroscience. 2007,26:2303-14.
[23] Halford, J. C., Wanninayake, S. C., Blundell, J. E. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 1998,61:159-68.
[24] L'Heureux-Bouron, D., Tome, D., Bensaid, A., Morens, C., Gaudichon, C., Fromentin, G. A very high 70%-protein diet does not induce conditioned taste aversion in rats. The Journal of nutrition. 2004,134:1512-5.
[25] Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, G. C., 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. The Journal of nutrition. 1993,123:1939-51.
[26] Feurte, S., Tome, D., Gietzen, D. W., Even, P. C., Nicolaidis, S., Fromentin, G. Feeding patterns and meal microstructure during development of a taste aversion to a threonine devoid diet. Nutritional neuroscience. 2002,5:269-78.

[27] Faipoux, R., Tome, D., Bensaid, A., Morens, C., Oriol, E., Bonnano, L. M., et al. Yeast proteins enhance satiety in rats. The Journal of nutrition. 2006,136:2350-6.

[28] Cooper, G., Goudie, A., Halford, J. Acute effects of olanzapine on behavioural expression including the behavioural satiety sequence in female rats. Journal of psychopharmacology (Oxford, England). 2009.

[29] Sellayah, D., Sek, K., Anthony, F. W., Hanson, M. A., Cagampang, F. R. Sensitivity of housekeeping genes in the hypothalamus to mismatch in diets between pre- and postnatal periods in mice. Neuroscience letters. 2008,447:54-7.

[30] Derks, N. M., Muller, M., Gaszner, B., Tilburg-Ouwens, D. T., Roubos, E. W., Kozicz, L. T. Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. Neuroscience. 2008,156:305-9.

[31] Nagaraja, H. S., Jeganathan, P. S. Forced swimming stress induced alterations in ingestive behavior in rats. Indian journal of physiology and pharmacology. 2003,47:94-100.

[32] Kasar, M., Mengi, M., Yildirim, E. A., Yurdakos, E. Different effects of tianeptine pretreatment in rats exposed to acute stress and repeated severe stress. Methods and findings in experimental and clinical pharmacology. 2009,31:157-63.

[33] Carli, M., Prontera, C., Samanin, R. Effect of 5-HT1A agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. Neuropharmacology. 1989,28:471-6.

[34] Dal-Zotto, S., Marti, O., Armario, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. Behavioural brain research. 2000,114:175-81.

[35] Kelliher, P., Connor, T. J., Harkin, A., Sanchez, C., Kelly, J. P., Leonard, B. E. Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. Physiology & behavior. 2000,69:531-9.

[36] Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vazquez-Palacios, G., Dominguez-Salazar, E., Martinez-Garcia, R., Velazquez-Moctezuma, J. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. Psychoneuroendocrinology. 2003,28:207-27.

[37] Gudmundsson, A., Carnes, M. Pulsatile adrenocorticotropic hormone: an overview. Biological psychiatry. 1997,41:342-65.

[38] Lightman, S. L. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. Journal of neuroendocrinology. 2008,20:880-4.

[39] Armario, A., Gavalda, A., Marti, J. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. Psychoneuroendocrinology. 1995,20:879-90.

[40] Yamada, F., Inoue, S., Saitoh, T., Tanaka, K., Satoh, S., Takamura, Y. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. Endocrinology. 1993,132:2199-205.

[41] Sachs, B. D. The development of grooming and its expression in adult animals. Annals of the New York Academy of Sciences. 1988,525:1-17.

[42] Spruijt, B. M., van Hooff, J. A., Gispen, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. Physiological reviews. 1992,72:825-52.

[43] Kalueff, A. V., Tuohimaa, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. Journal of neuroscience methods. 2005,143:169-77.

[44] Katz, R. J., Roth, K. A. Stress induced grooming in the rat--an endorphin mediated syndrome. Neuroscience letters. 1979,13:209-12.

[45] van Erp, A. M., Kruk, M. R., Meelis, W., Willekens-Bramer, D. C. Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. Behavioural brain research. 1994,65:47-55.

[46] Rodgers, R. J., Holch, P., Tallett, A. J. Behavioural satiety sequence (BSS): Separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 2010.

[47] Harris, R. B., Palmondon, J., Leshin, S., Flatt, W. P., Richard, D. Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. Hormones and behavior. 2006,49:615-25.

[48] Hsu, D. T., Chen, F. L., Takahashi, L. K., Kalin, N. H. Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: an in situ hybridization analysis. Brain research. 1998,788:305-10.

[49] Kiss, A., Aguilera, G. Role of alpha-1-adrenergic receptors in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during stress. Cellular and molecular neurobiology. 2000,20:683-94.

[50] Romeo, R. D., Karatsoreos, I. N., Jasnow, A. M., McEwen, B. S. Age- and stress-induced changes in corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Neuroendocrinology. 2007,85:199-206.

[51] Waldherr, M., Nyuyki, K., Maloumby, R., Bosch, O. J., Neumann, I. D. Attenuation of the neuronal stress responsiveness and corticotrophin releasing hormone synthesis after sexual activity in male rats. Hormones and behavior. 2010,57:222-9.
[52] Thorsell, A., Svensson, P., Wiklund, L., Sommer, W., Ekman, R., Heilig, M. Suppressed neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat amygdala following restraint stress. Regulatory peptides. 1998,75-76:247-54.
[53] Conrad, C. D., McEwen, B. S. Acute stress increases neuropeptide Y mRNA within the arcuate nucleus and hilus of the dentate gyrus. Brain Res Mol Brain Res. 2000,79:102-9.
[54] Makino, S., Baker, R. A., Smith, M. A., Gold, P. W. Differential regulation of neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus and locus coeruleus by stress and antidepressants. Journal of neuroendocrinology. 2000,12:387-95.
[55] Baubet, V., Fevre-Montange, M., Gay, N., Debilly, G., Bobillier, P., Cespuglio, R. Effects of an acute immobilization stress upon proopiomelanocortin (POMC) mRNA levels in the mediobasal hypothalamus: a quantitative in situ hybridization study. Brain Res Mol Brain Res. 1994,26:163-8.
[56] Larsen, P. J., Mau, S. E. Effect of acute stress on the expression of hypothalamic messenger ribonucleic acids encoding the endogenous opioid precursors preproenkephalin A and proopiomelanocortin. Peptides. 1994,15:783-90.
[57] Liu, J., Garza, J. C., Truong, H. V., Henschel, J., Zhang, W., Lu, X. Y. The melanocortinergic pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior. Endocrinology. 2007,148:5531-40.
[58] Williams, D. L., Kaplan, J. M., Grill, H. J. The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation. Endocrinology. 2000,141:1332-7.
[59] Zheng, H., Patterson, L. M., Phifer, C. B., Berthoud, H. R. Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. American journal of physiology. 2005,289:R247-58.
[60] Zheng, H., Patterson, L. M., Rhodes, C. J., Louis, G. W., Skibicka, K. P., Grill, H. J., et al. A potential role for hypothalamomedullary POMC projections in leptin-induced suppression of food intake. American journal of physiology. 2010,298:R720-8.
[61] Bertolini, A., Tacchi, R., Vergoni, A. V. Brain effects of melanocortins. Pharmacol Res. 2009,59:13-47.
[62] Cone, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. Nature neuroscience. 2005,8:571-8.

[63] Garcia-Diaz, D. F., Campion, J., Milagro, F. I., Lomba, A., Marzo, F., Martinez, J. A. Chronic mild stress induces variations in locomotive behavior and metabolic rates in high fat fed rats. Journal of physiology and biochemistry. 2007,63:337-46.

Figures

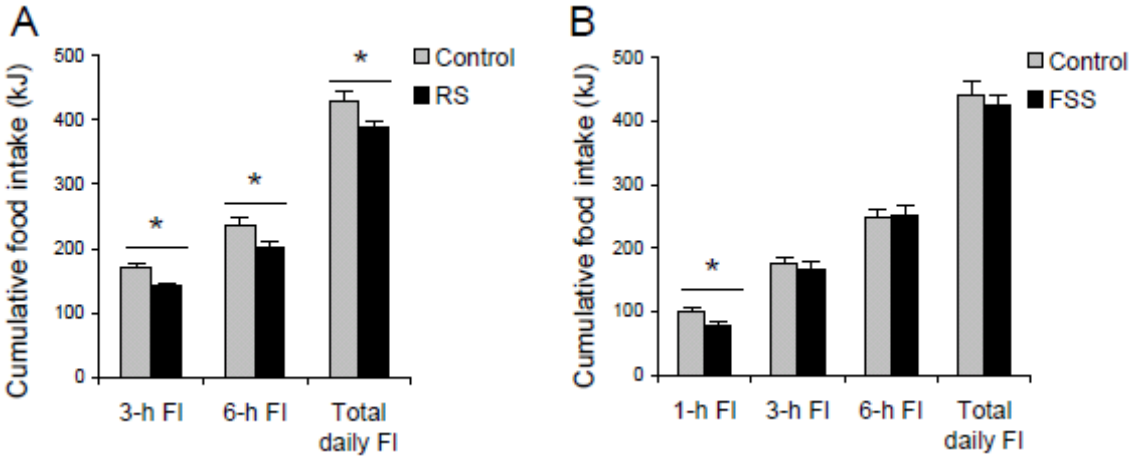


Fig. 1. Mean cumulative food intake (FI) measured after acute stress exposure in experiment 1. Data are expressed as means ± SE for groups of 8 rats. A: 3-h, 6-h and total daily food intake of RS rats and their controls. B: 1-h, 3-h, 6-h and total daily food intake of FSS rats and their controls. * Significant difference between control and stress groups ($P < .05$).

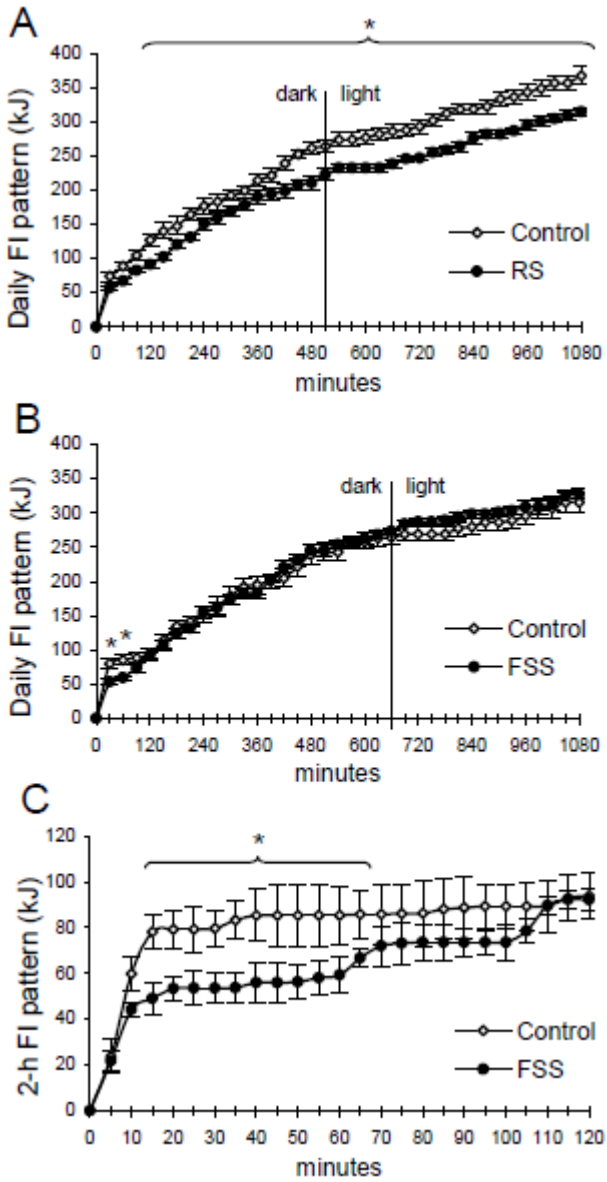


Fig. 2. Food intake (FI) pattern following stress in experiment 2. Data are expressed as means ± SE for groups of 7 rats. A: Daily food intake pattern following RS (group: P < .0001; time: P < .0001; group × time: P = .0002). B: Daily food intake pattern following FSS (group: NS; time: P < .0001; group × time: P = .008) and C: 2-h food intake pattern following FSS (group: P = .014; time: P < .0001; group × time: P < .0001). * Significant difference between control and stress groups within a period.

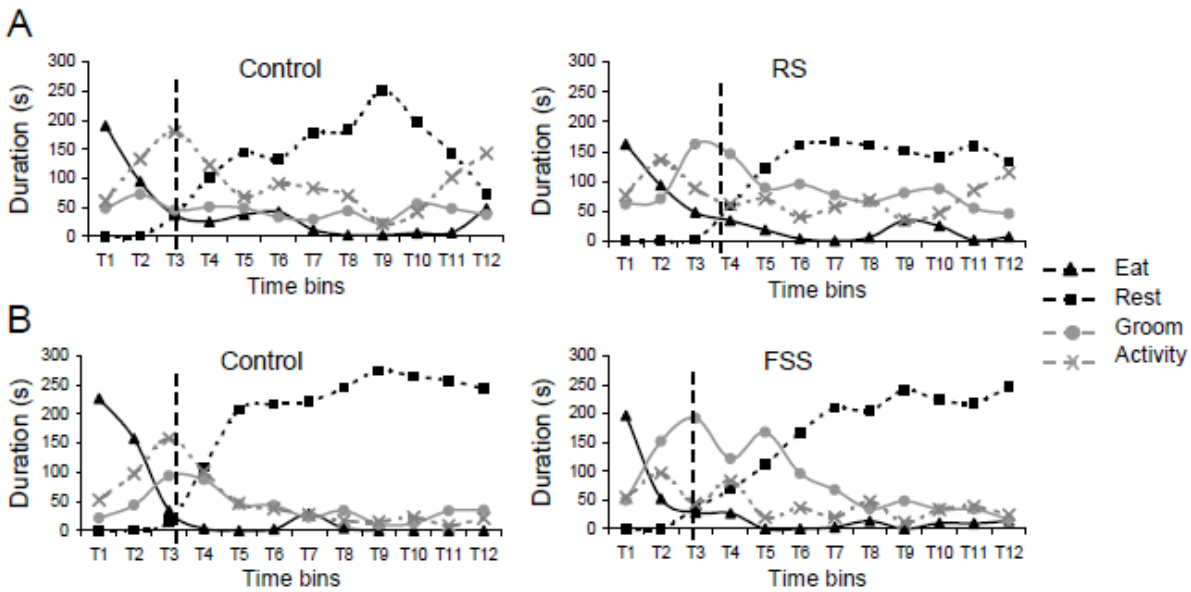


Fig. 3. Temporal profile of the behavioral satiety sequence after A: RS and B: FSS in control and stressed rats in experiment 2. Data are expressed as means ± SE for groups of 7 rats. Time bins T1-T12 are the twelve 5-min time bins comprising the 1-h behavioral analysis. Activity is the sum of sniffing, rearing and locomotion. The vertical dashed line indicates the approximate transition point between behaviors.

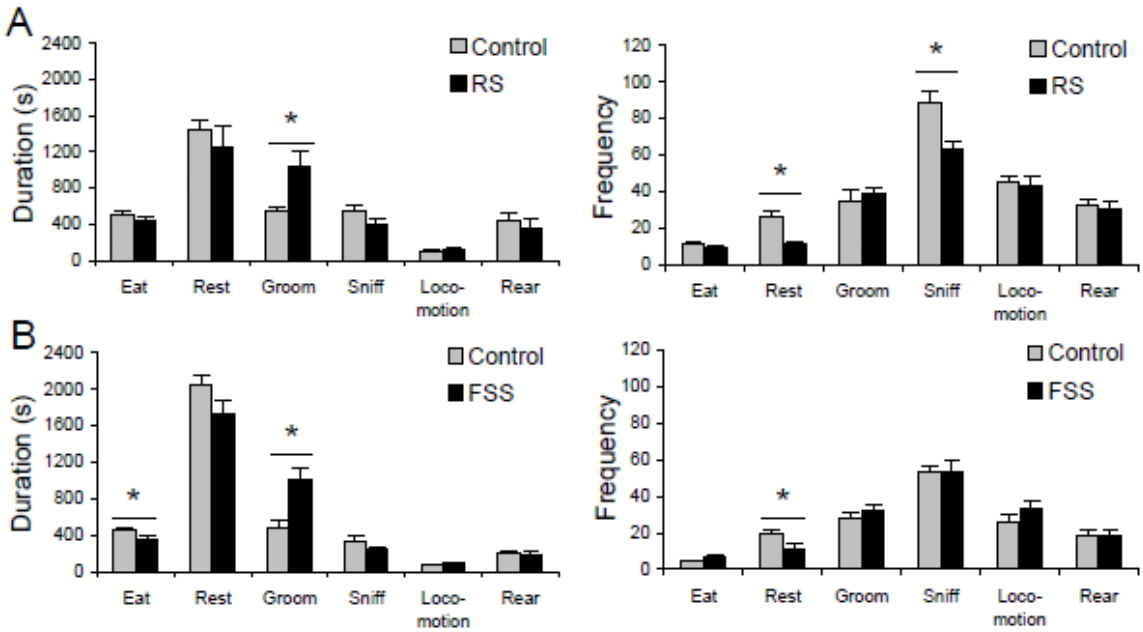


Fig. 4. Duration and frequency of behaviors expressed during 1 h of behavioral analysis immediately after A: RS and B: FSS in experiment 2. Data are expressed as means ± SE for groups of 7 rats. * Significant difference ($P < .05$) between RS rats and their controls or FSS rats and their controls.

Tables

Table 1. Plasma concentrations measured immediately after the end of acute RS or FSS exposure in experiment 1

	Corticosterone (µg/dl)	ACTH (pg/ml)	Glucose (mg/dl)
Restraint Stress			
Control	4.7 ± 1.7	13.3 ± 6.0	65.8 ± 2.9
RS	17.2 ± 4.0 *	46.8 ± 13.4 *	69.6 ± 2.4
Forced Swimming Stress			
Control	12.3 ± 3.6	141.3 ± 71.9	83.7 ± 2.6
FSS	36.0 ± 3.3 *	451.4 ± 92.2 *	103.5 ± 5.8 *

Data are expressed as mean ± SE for groups of 8 rats. * Significant difference ($P < .05$) between RS rats and their controls or FSS rats and their controls.

Table 2. Levels of neuropeptide mRNA (arbitrary units) in the hypothalamus measured immediately after acute RS or FSS exposure in experiment 1

	CRF	POMC	NPY
Restraint Stress			
Control	771 ± 152	154 ± 146	553 ± 247
RS	1062 ± 251	919 ± 217 *	850 ± 140
Forced Swimming Stress			
Control	503 ± 199	246 ± 60	283 ± 142
FSS	458 ± 198	392 ± 103	137 ± 52

Data are expressed as mean ± SE for groups of 8 rats. * Significant difference ($P < .05$) between RS rats and their controls or FSS rats and their controls.

Table 3. Meal-related parameters determined during continuous measurements of food intake in experiment 2, after acute exposure to RS or FSS

	Control	RS	Control	FSS
1-h recording session				
Computed total intake (kJ)	88 ± 7	62 ± 4 *	83 ± 7	59 ± 5 *
Total meal number	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.3
Average meal size (kJ)	60 ± 13	38 ± 4	70 ± 8	39 ± 9 *
Average meal duration (min)	18.3 ± 6.7	9.4 ± 2.3	7.9 ± 1.2	6.3 ± 1.8
Average mean ingestion speed (kJ/min)	4.1 ± 0.7	5.1 ± 0.9	7.9 ± 0.8	7.2 ± 1.4
Average inter-meal interval (min)	30 ± 3	28 ± 3	18 ± 2	29 ± 5
3-h recording session				
Computed total intake (kJ)	153 ± 12	120 ± 5 *	134 ± 8	124 ± 6
Total meal number	4.1 ± 0.6	5.1 ± 0.3	4.7 ± 0.6	4.3 ± 0.3
Average meal size (kJ)	39 ± 6	24 ± 2 *	33 ± 7	29 ± 2
Average meal duration (min)	14.6 ± 4.7	5.7 ± 0.6	6.0 ± 1.3	4.8 ± 0.7
Average mean ingestion speed (kJ/min)	3.5 ± 0.5	4.5 ± 0.6	7.4 ± 0.5	6.9 ± 1.1
Average inter-meal interval (min)	28 ± 4	33 ± 4	51 ± 15	39 ± 3
Total daily recording session				
Computed total intake (kJ)	367 ± 13	314 ± 5 *	346 ± 15	358 ± 12
Total meal number	14 ± 1	15 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
Average meal size (kJ)	27 ± 1	21 ± 2 *	27 ± 5	26 ± 1
Average meal duration (min)	8.1 ± 1.0	5.4 ± 0.4 *	6.5 ± 0.9	5.4 ± 0.4
Average mean ingestion speed (kJ/min)	3.7 ± 0.5	4.2 ± 0.6	5.0 ± 0.5	5.8 ± 0.5
Average inter-meal interval (min)	77 ± 6	71 ± 5	95 ± 16	89 ± 7

Data are expressed as means ± SE for groups of 7 rats. * Significant difference ($P < .05$) between RS rats and their controls or FSS rats and their controls.

ANNEXE 3 : ARTICLE 2 "CHRONIC VARIABLE STRESS INDUCES A DIMINUTION OF FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT GAIN IN RATS"

Chronic variable stress induces a diminution of food intake and body weight gain in rats

J CALVEZ[1,2,3], G FROMENTIN[1,2], P EVEN[1,2], N DARCEL[1,2], D TOME[1,2], N BALLET[3], C CHAUMONTET[1,2]

[1] INRA, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

[2] AgroParisTech, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

[3] Lesaffre Feed Additives, F-59520 Marquette-lez-Lille, France

Correspondence should be addressed to:

Catherine Chaumontet

UMR 914 INRA/AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05

catherine.chaumontet@agroparistech.fr

Fax number: 00 33 (0)1 44 08 18 58

Abstract

Chronic variable stress (CVS) consists in applying variable acute stress paradigms unpredictably and over several weeks and is considered a model of stress that resists habituation. The present study was designed to analyze the decrease in food intake and body weight gain induced in rats by CVS and to understand which mechanisms are responsible for them. Male Wistar rats were exposed to 13 days of CVS. CVS rats displayed increased anxiety levels as measured by open field activity, increased plasma corticosterone levels and decreased body weight gains, which validated the CVS paradigm. The reduction in food intake lasted throughout the study which can be explained by a higher level of corticotropin-releasing factor and a tendency towards lower neuropeptide Y expression measured at the end of the study in the hypothalamus. The reduced body weight gain was due to a specific loss of adipose tissue mass which, in addition to the decrease in food intake, might be explained by the lipolytic effects of corticosterone.

Key words

Chronic variable stress, food intake, body composition

1. Introduction

Stress is known to inhibit food intake in rodents both acutely [1-3] and chronically [4-6]. The precise mechanism at the origin of this effect is not entirely established but it is thought to be due to an increase in the corticotropin-releasing factor (CRF) secretion from the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus during stress [7]. Indeed, CRF is the first actor of the activation of the hypothalamus-pituitary-–adrenal (HPA) axis following stress exposure and has been proved to be an anorectic peptide [7] due either to a direct anorectic (for instance, through inhibition of the parasympathetic nervous system and its consequences on gastric motility and gastric emptying [8]), or via an inhibition of the expression of NPY and/or a stimulation of the expression of POMC in the hypothalamus. The activation of the HPA axis also includes the secretion of adrenocorticotropin hormone (ACTH) from the anterior pituitary and release of glucocorticoids, corticosterone for rodents, from the adrenal glands. This activation is shut off by glucocorticoid feedback to the brain when the stress exposure ends [9].

Chronic application of the same stressors induced habituation in rodents [10-12] leading to a diminution of the stress effects including a reduction of stress-induced food intake inhibition [13]. Chronic variable stress (CVS) consists in unpredictably applying variable acute stress paradigms over several weeks. Traditionally, CVS is proposed as a model of depression in rodent studies [14, 15] but CVS is also considered as a relevant stress model designed to be resistant to habituation since it induces a chronic hyperactivity of the HPA axis, as displayed by persistent elevated corticosterone levels [11, 16]. CVS is also known to systematically induce a decrease in body weight [11, 17], but few studies have investigated the effect of CVS on daily food intake.

Our objectives were to evaluate the effect of chronic variable stress on daily food intake and body weight gain and to assess the possible mechanisms underlying chronic variable stress-induced inhibition of food intake. In the present experiment, adult male rats were exposed to 13 days of CVS during which food intake and body weight were measured daily. Because rats exposed to CVS presented a decrease in body weight gain, body composition was carefully measured by dissection and weighing of the adipose deposits at the end of the CVS period. We evaluated the level of stress by assessing the activity of the HPA axis from corticosterone and ACTH plasma concentrations, hypothalamic expression of CRF. In addition, the open field test was used to determine the anxiety level of the rats. Plasma concentrations of hormones (insulin, leptin, and corticosterone) and hypothalamic expression of neurotransmitters (CRF, POMC, NPY) implicated in stress and/or food intake control were measured at the end of CVS to determine their possible involvement in changes induced by the chronic stress.

2. Material and methods

2.1. Animals and diet

Wistar adult male rats (Harlan, Ganat, France) initially weighting 275-300 g were housed in individual stainless steel cages in temperature- (23 ± 1 °C) and humidity- (55 ± 3 %) controlled rooms with an artificial 12:12 h light-dark cycle (light on at 06:00 am). In all experiments, rats were adapted to the laboratory conditions during the first 10 days. All experiments were carried out according to the guidelines of the French National Committee for Animal Care and the European Convention of Vertebrate Animals Used for Experimentation, under European Council Directive 86/609/EEC dated November, 1986. Rats were fed a standard AIN 93 M diet composed of 140 g/kg whole milk protein, 622.4 g/kg cornstarch, 100.3 g/kg sucrose, and 40 g/kg soybean oil [18, 19]. This diet was supplemented with minerals and vitamins and provided 14.6 kJ/g (UPAE, INRA, Jouy en Josas 78170, France). It contained 14 % of energy as protein, 76 % as carbohydrates and 10 % as lipids. The diet was moistened (water/powdered diet, 1:1) to minimize spillage and food containers were refilled daily with fresh food. Food and water were freely available throughout the experiment.

2.2. CVS protocol

Rats were randomly divided into two groups: a CVS group exposed to a variety of mild stressors (n = 12) and an unstressed control group (n = 12). The 2 groups were housed in separated rooms. After 2 weeks of baseline during which food intake and body weight gain were measured daily, the CVS protocol began for 13 days. It consisted of exposure to different stressors in variable schedules (Table 1). One, 2 or 3 stressors were applied in the housing room of stressed rats during the dark or the light phase each day. The stressors were: crowding (6 rats were placed in a collective cage usually made for 3 rats), crowding + cage tilt (crowded cages were tilted to 45 degrees from the horizontal), forced swimming in cold or warm water (rats were placed in plastic tank containing water at 18 °C or 25 °C), restraint (rats were placed into a perforated plastic tube of 6 × 20 cm in which they could not turn over), switching cage (rats were placed into the uncleaned cage of another rat), stroboscopic light (light flashes with frequency of 5 flashes/s during dark phase), light on (during dark phase) and light off (during light phase).

During CVS, body weight and food intake were measured every day at 12:00. Food intake was determined by the difference in the weight of the food cup before and after each experimental period, corrected for spillage and evaporation, then converted in kJ (1 g of powdered diet = 14.6 kJ). Twelve hours after the last stress applied in the CVS, animals were subjected to an open field test between 10:00 and 12:00 to measure their anxiety level. Thirty six hours after the last

stress applied in the CVS, rats were euthanized by decapitation between 12:00 and 16:00. Trunk blood was collected in EDTA-coated tubes, samples were centrifuged and plasma was aliquoted and stored at - 20 °C for measurements of corticosterone, ACTH, insulin and leptin concentrations. Brains were removed and the hypothalami were rapidly dissected out onto ice, stored in Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), snap-frozen in liquid-nitrogen and kept at -80 °C for further determination of mRNA expression encoding CRF, NPY and POMC. Adrenal glands and thymus were dissected and weighed in all rats and body composition was determined in 6 rats per group by removal and weighing to the nearest 0.01 g of the white adipose pads (WAT; including epididymal, retroperitoneal and subcutaneous fat pads) and the stripped carcass.

2.3. Open field test

A separate dark room with a red light was used for the open field test. The apparatus consisted of a round arena of 125 cm diameter, surrounded by a 60 cm high wall. At the beginning of the test, rats were placed one by one in the centre of the arena and their activity was recorded for 4 min by a digital video camera (Sony digital video camera recorder DCR-HC51E) for subsequent visual analysis. Rats were left undisturbed in the room during the test and returned to their home cage immediately after it. Open field activity was manually scored using ethological behavioral analysis software that makes real-time scoring of behavior possible through direct keyboard entry into a personal computer (The Observer XT 9.0). During the analysis, the open field arena was virtually divided into outer and inner zones, each divided into 4 squares. The measurements scored from videotapes were the total number of squares crossed, the total duration of grooming and rearing and the time spent in outer and inner zones.

2.4. Plasma analysis

Corticosterone and ACTH concentrations and insulin and leptin concentrations were analyzed using specific commercial kits (Rat stress hormone panel and Rat endocrine panel respectively from Linco Research, St. Charles, MI, USA) on a Bioplex 200 system (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

2.5. Quantification of the mRNA expression of hypothalamic neuropeptide

Total RNA was extracted from each hypothalamus with 1 ml of Tryzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and homogenized using a TissueLyser (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total RNA concentrations were determined by measuring absorbance at 260 nm with a Nanodrop spectrophotometer (Labtek, Paris, France). A synthesis of strand complementary DNA (cDNA)

was performed on 400 ng of total RNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers were designed using Primer Express software, and an 18S protein was used as a housekeeping gene to normalize the mRNA abundance of each gene. 18S is known to be a pertinent housekeeping gene for hypothalamic gene expression in food intake studies [20] and is not affected by acute or chronic stress in the PVN of the hypothalamus [21]. BLASTN searches were conducted against GenBank to check the total gene specificity of the nucleotide sequences chosen for the primers. The sequences of the PCR primers used were: 5'-CCGCAGCCGTTGAATTTCTT-3' (forward) and 5'-TTCTTCACCCATGCGGATCA-3' (reverse) for CRF, 5'-TTTTCCTAGTTTCCCCCCACAT-3' (forward) and 5'-CCTGGTGGTGGCATGCAT-3' (reverse) for NPY, 5'-AGGCCTTTCCCCTAGAGTTCAA-3' (forward) and 5'-GTCGGCCTTCTCGGTATCC-3' (reverse) for POMC and 5'-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3' and 5'-GGGTCGGGAGTGGGTAATTT-3' for 18S. PCR reactions were performed using a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Each cDNA was amplified in a 20 µl volume containing 15 µl of 2 × SYBR Green master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 500 nM concentrations of the gene-specific primer. Thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95 °C for 10 min and 40 amplification cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The cycle threshold for each sample was determined at a constant fluorescence threshold line. For each run, a melt curve was subsequently performed to analyze the products generated for any contaminations resulting from residual genomic DNA amplification (using a control without reverse transcriptase) and/or from the formation of primer dimers (controls containing no DNA template). Quantitative values for cDNA amplification were obtained from the threshold cycle number (Ct) at which the increase in signal was associated with exponential growth of the PCR products that were starting to be detected. The overall efficiency (E) of PCR was calculated from the slopes of the standard curves according to the equation: $E = (10^{-1/slope}) - 1$. All cDNA were amplified with efficiency higher than 98 %, indicating that 18S and the target gene were amplified with the same efficiency. Gene expression was determined using the $2^{-\Delta Ct}$ formula where ΔCt = (Ct target gene - Ct 18S).

2.6. Statistical analysis

Results are presented as means ± standard errors (SE). Statistical analyzes were performed using the SAS statistical package (SAS/STAT version 9.1; SAS Institute, Cary, USA). Differences between control and CVS groups were determined using an unpaired Student t-test. Because a

time effect was involved in food intake and body weight, differences between groups were determined using a mixed model for repeated measurements to test the group, time and group × time effects. Comparisons of group means at different time points were performed using Tukey–Kramer's post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Food intake

No difference was found between control and CVS groups in baseline food intake (data not shown). Cumulated 24-h food intake in rats during the CVS presented significant changes considering group ($P = 0.001$), time ($P < 0.0001$) and group × time ($P < 0.0001$) effects (Fig 1A). From the 9th day of CVS, stressed rats had a cumulated food intake significantly lower than control rats with final cumulative food intake of stressed rats during CVS (4449 ± 71 kJ) reduced by 10 % compared to control rats (4980 ± 105 kJ; $P = 0.0006$).

3.2. Body weight and composition

No differences were found between control and CVS groups in baseline evolution of cumulative body weight gain (data not shown). During CSV, cumulative body weight gain presented a significant time ($P < 0.0001$), group effect ($P < 0.0001$) and group × time effect ($P < 0.0001$; Fig. 1B). From the 9th to the end of the CVS, stressed rats displayed a constant significantly lower cumulative body weight gain than control rats and their total decrease of body weight gain during CVS (Table 2) was about 50 % of body weight gain in control rats (22 ± 1g and 42 ± 1 g respectively; $P < 0.0001$). Thus, the final body weight of stressed rats was significantly than that of control rats (403 ± 6 g for CVS group, 431 ± 7 g for control group; $P = 0.006$). Subcutaneous WAT of CVS rats was 31 % lower than in control rats ($P = 0.044$). Overall, total WAT (sum of epididymal, retroperitoneal and subcutaneous) was 25 % lower when compared to control rats ($P = 0.045$). The carcass weight was not affected by CVS. Moreover the absolute (Table 2) and relative (data not shown) weights of thymus and adrenal glands were not affected by CVS.

3.3. Open field test

Activity in the open field was modified by CVS (Table 3). Rats exposed to stress showed a tendency to spend more time in outer zones ($P = 0.097$) and a significant reduction in time spent in the inner zone ($P = 0.039$) leading to a reduction in the ratio of time spent in inner/outer zone of 40 % ($P = 0.039$). No effect of CVS was found on the other parameters.

3.4. Plasma analysis

After 13 days of CVS, the plasma corticosterone level was increased 2-fold (P = 0.028) and leptin concentration tended to be lower in CVS rats (P = 0.084). Plasma concentrations of ACTH and insulin were not affected (Table 4).

3.5. Hypothalamic CRF, NPY and POMC mRNA expression

Exposure to CVS induced a nearly 3-fold increase in hypothalamic expression of CRF mRNA (P = 0.041; Fig. 2). Furthermore, rats exposed to CVS displayed a tendency towards lower NPY mRNA expression (P = 0.10). No effect of CVS was found on POMC mRNA expression measured in the hypothalamus.

4. Discussion

CVS is known to induce a decrease in body weight gain but very few studies have accurately assessed food intake during CVS. We found that CVS induced a reduction in food intake throughout the study which can be explained by greater CRF and a tendency towards lower NPY expression measured in the hypothalamus. The reduced food intake might partly explain the decrease of body weight gain induced by CVS and, since it was due to a specific loss of adipose tissue mass, the lipolytic effects of corticosterone might also be determining factors.

CVS is considered as a stress model resistant to habituation as exposure to CVS seems to promote intense physiological changes by hampering the habituation to stress. Stressors used in CVS such as restraint, forced swimming stress or crowding applied acutely [1, 3, 22] induce a diminution of food intake. Thus, in our study, we logically found that rats exposed to CVS showed a reduced intake of diet. Few studies have investigated the effects of CVS on food intake despite a systematic reduction observed for body weight gain. When food intake was measured, it was usually treated as a secondary parameter among others. The effects of CVS on food intake are inconsistent since some studies have found no effect [23-26] and others a decrease in food intake [27, 28]. However, in some studies where CVS had no effect on food intake, CVS also had no effect on body weight [23, 26]. These discrepancies could be explained by differences in the CVS protocol, such as the duration of CVS, the frequency of stress exposure and the kind of stressors used. It seems that when the frequency of stress exposure (3 times/week) is low and/or the CVS period is short (~ 1 week), the CVS might not be sufficiently intense to induce body weight and/or food intake changes [23, 26, 29, 30]. Indeed, we found a diminution of cumulative food intake and body weight gain only from the 9th day of CVS. Furthermore, when no differences in food intake were found during CVS despite a reduction of

body weight gain, food intake was usually measured in collective cages [24, 25]. As Harris et al. [28], we measured food intake with rats placed in individual cages and found a reduction of food intake induced by CVS that was significant but which amounted to less than 10 %. Altogether these results suggest that precise measurements are necessary to detect the small but reproducible changes in food intake induced by CVS.

The present results show that 13 days of CVS induced an increase in corticosterone which is concordant with the literature [11, 16, 31] and might be interpreted as a failing habituation of rats to stress. Furthermore, we showed that mRNA expression of CRF in the hypothalamus was increased by CVS. This result corroborates previous findings showing that central CRF expression was up-regulated following CVS [32, 33]. The enhanced expression of CRF in the hypothalamus gives further evidence concerning chronic hyperactivity of the HPA axis since the negative glucocorticoid feedback was not efficient on CRF release. An open field test was also employed to assess the state of anxiety of rats and it showed that CVS induced an increase in the time spent in the outer zone to the detriment of the time spent in the inner zone, which indicates that CVS rats showed a decrease in their exploratory motivation due to enhanced anxiety compared to control rats [34]. These results are consistent with previous reports which showed that anxiety-like behaviours during an open field test in the days following the end of CVS were increased in stressed rats compared with unstressed rats [34, 35]. The hyperactivity of the HPA axis and the enhanced anxiety-like behaviours of CVS rats indicated a chronic state of stress provoked by the impossibility of foreseeing the presentation of stress in this chronic unpredictable stress paradigm. On the contrary, we did not find any modification in the ACTH level following CVS. Such dissociation between plasma corticosterone and ACTH levels is not uncommon in studies on CVS in rats [33, 36]. Indeed, it has been shown that chronic stress can induce an increase in the responsiveness of the adrenal glands to ACTH [37, 38] such that a given amount of ACTH provokes a greater corticosterone response explaining that CVS could increase corticosterone levels without affecting ACTH. Despite the hyperactivity of the HPA axis, we did not observe changes in the weight of the adrenal glands or thymi. The effects of CVS on adrenal glands and thymus weight reported in the literature are inconsistent since some studies found no effect [11, 33] and others observed an increase of adrenal glands weight and/or a decrease of thymus weight [17, 25, 32]. It has been demonstrated that the increase in the weight of the adrenal glands [6] and the involution of the thymus [39] depend on the intensity of the stress. Hence, the observed discrepancies might be due to differences in the CVS protocols leading to different intensities of stress. In our case, the mild stressors used might not have been sufficient or long enough to induce morphological changes.

CRF is a potent anorectic peptide abundantly expressed in the PVN of the hypothalamus which is considered to be a major control centre of feeding behaviour [40]. Both acute [41] and chronic [13] central administration of CRF inhibits feeding in rats. CRF is also involved in stress induced anorexia since intracerebroventricular administration of a CRF antagonist attenuates the diminution of food intake induced by stress [7, 42]. In the present study, CSV increased CRF and decreased food intake, which confirms that CRF is involved in the feeding response to CSV. One main process by which CRF affects food intake is through an inhibition of the orexigenic neural pathways involving NPY which is the most powerful central enhancer of appetite. The expression of NPY is predominant in the arcuate nucleus [43], which is innervated by CRF neurons from the PVN [44]. It has been shown that the feeding stimulatory effect of NPY is attenuated by administration of CRF [45] and that blockading CRF by a non selective CRF receptor antagonist in the PVN significantly potentiates the feeding effect of NPY [46]. Our results are consistent with this model since we found that NPY expression in the hypothalamus tended to be reduced. Consistently with this result, Kim et al. [47] showed that CVS induced a decrease in NPY expression in several hypothalamic nuclei. We found no effect of CVS on POMC expression in the hypothalamus and thus excluded the hypothesis of the possible involvement of a stimulatory effect of CRF on anorectic POMC neurons [48]. To our knowledge, no other study has evaluated the effect of CVS on POMC expression in the hypothalamus or hypothalamic nuclei. We found a small decrease in plasma leptin and no effect on insulin after CVS. Only a few studies have assessed the effect of CVS on leptin or insulin but among them some found a diminution of leptin by CVS [26]. Others found no effect [24, 49] and none reported any effect on insulin [16, 26]. The slight decrease in plasma leptin may be explained by the decrease in WAT since leptin is released from adipose tissue in direct proportion to the overall fat mass [50].

In accordance with the decreased food intake, we found that reduced body weight gain led to a smaller final body weight of the stressed rats. Many studies using different CVS protocols show the same result [11, 26, 27]. We found that the decrease in body weight induced by CVS was due to a specific decrease in WAT and more particularly of subcutaneous WAT. The increase in blood corticosterone raises the question as towhether the decrease in body weight and body fat observed in the CSV group is only the result of the decrease in food intake or has been exacerbated by the increased corticosterone levels. It is clear that under acute conditions, glucocorticoids stimulate lipolysis both directly [51] and by enhancing the lipolytic effects of catecholamines and the growth hormone [52]. However, chronically, the effects of

glucocorticoids may be different. It has been shown for example that, in the presence of insulin, glucocorticoids might favor the accumulation of visceral fat [53, 54]. However, other studies have pointed out a lipolytic chronic action of glucocorticoids on subcutaneous WAT [55, 56], suggesting that chronically elevated glucocorticoids levels may have a regional lipolytic effect [52]. We found no effect of CVS on abdominal WAT but we also found no effects on insulin levels which may have prevented the preferential accumulation of fat in the visceral depots. The fact that we observed a specific decrease in subcutaneous fat deposits makes it more probable that the mild increase in corticosterone over the 2-weeks CVS exerted a lipolytic action, especially on subcutaneous adipose tissues. To confirm this hypothesis, the index of lipolysis (for instance, the hormone sensitive lipase or perilipin activity in adipose tissue) should be measured or pair-fed rats should be used in further studies. Other possible hypotheses have to be studied concerning a possible preferential oxidation of lipids [26] or a well known catabolic effect of catecholamines [57] explaining the reduced WAT mass in CVS rats.

5. Conclusions

In conclusion, our study showed that CVS induced a constant state of stress characterized by a hyperactivation of the HPA axis as reflected by a slight increase in the corticosterone level and an enhancement of hypothalamic CRF expression. The state of chronic stress induced a decrease in food intake which can be explained by the anorectic effect of CRF and its possible inhibitory effect on NPY orexigenic pathways. The increase in corticosterone might have favoured the loss of subcutaneous fat by stimulating lipolysis in subcutaneous WAT but this effect remains to be demonstrated.

References

[1] Diane, A., Victoriano, M., Fromentin, G., Tome, D., Larue-Achagiotis, C. Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats. Appetite. 2008,50:397-407.

[2] Meerlo, P., Overkamp, G. J., Daan, S., Van Den Hoofdakker, R. H., Koolhaas, J. M. Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. Stress. 1996,1:21-32.

[3] Rybkin, II, Zhou, Y., Volaufova, J., Smagin, G. N., Ryan, D. H., Harris, R. B. Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. The American journal of physiology. 1997,273:R1612-22.

[4] Armario, A., Ortiz, R., Balasch, J. Effect of crowding on some physiological and behavioral variables in adult male rats. Physiology & behavior. 1984,32:35-7.

[5] Armario, A., Marti, J., Gil, M. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. Psychoneuroendocrinology. 1990,15:341-7.

[6] Marti, O., Marti, J., Armario, A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. Physiology & behavior. 1994,55:747-53.

[7] Krahn, D. D., Gosnell, B. A., Grace, M., Levine, A. S. CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding. Brain research bulletin. 1986,17:285-9.

[8] Stengel, A., Tache, Y. Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. Annual review of physiology. 2009,71:219-39.

[9] Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G. Endocrinology of the stress response. Annual review of physiology. 2005,67:259-84.

[10] Dal-Zotto, S., Marti, O., Armario, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. Behavioural brain research. 2000,114:175-81.

[11] Marin, M. T., Cruz, F. C., Planeta, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. Physiology & behavior. 2007,90:29-35.

[12] Stewart, L. Q., Roper, J. A., Young, W. S., 3rd, O'Carroll, A. M., Lolait, S. J. Pituitary-adrenal response to acute and repeated mild restraint, forced swim and change in environment stress in arginine vasopressin receptor 1b knockout mice. Journal of neuroendocrinology. 2008,20:597-605.

[13] Krahn, D. D., Gosnell, B. A., Majchrzak, M. J. The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures. Biological psychiatry. 1990,27:1094-102.

[14] Katz, R. J. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 1982,16:965-8.

[15] Willner, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. Neuropsychobiology. 2005,52:90-110.

[16] Rai, D., Bhatia, G., Sen, T., Palit, G. Comparative study of perturbations of peripheral markers in different stressors in rats. Canadian journal of physiology and pharmacology. 2003,81:1139-46.

[17] Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Engeland, W. C., Herman, J. P. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006,291:E965-73.

[18] Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, G. C., 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. The Journal of nutrition. 1993,123:1939-51.

[19] Bensaid, A., Tome, D., L'Heureux-Bourdon, D., Even, P., Gietzen, D., Morens, C., et al. A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. Physiology & behavior. 2003,78:311-20.

[20] Sellayah, D., Sek, K., Anthony, F. W., Hanson, M. A., Cagampang, F. R. Sensitivity of housekeeping genes in the hypothalamus to mismatch in diets between pre- and postnatal periods in mice. Neuroscience letters. 2008,447:54-7.

[21] Derks, N. M., Muller, M., Gaszner, B., Tilburg-Ouwens, D. T., Roubos, E. W., Kozicz, L. T. Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. Neuroscience. 2008,156:305-9.

[22] Chaouloff, F., Zamfir, O. Psychoneuroendocrine outcomes of short-term crowding stress. Physiology & behavior. 1993,54:767-70.

[23] Tauchi, M., Zhang, R., D'Alessio, D. A., Seeley, R. J., Herman, J. P. Role of central glucagon-like peptide-1 in hypothalamo-pituitary-adrenocortical facilitation following chronic stress. Experimental neurology. 2008,210:458-66.

[24] Gamaro, G. D., Prediger, M. E., Lopes, J., Bassani, M. G., Dalmaz, C. Fluoxetine alters feeding behavior and leptin levels in chronically-stressed rats. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 2008,90:312-7.

[25] Gamaro, G. D., Manoli, L. P., Torres, I. L., Silveira, R., Dalmaz, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. Neurochemistry international. 2003,42:107-14.

[26] Garcia-Diaz, D. F., Campion, J., Milagro, F. I., Lomba, A., Marzo, F., Martinez, J. A. Chronic mild stress induces variations in locomotive behavior and metabolic rates in high fat fed rats. Journal of physiology and biochemistry. 2007,63:337-46.

[27] Ulrich-Lai, Y. M., Ostrander, M. M., Thomas, I. M., Packard, B. A., Furay, A. R., Dolgas, C. M., et al. Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. Endocrinology. 2007,148:1823-34.

[28] Harris, R. B., Zhou, J., Youngblood, B. D., Smagin, G. N., Ryan, D. H. Failure to change exploration or saccharin preference in rats exposed to chronic mild stress. Physiology & behavior. 1997,63:91-100.

[29] Kubera, M., Basta-Kaim, A., Holan, V., Simbirtsev, A., Roman, A., Pigareva, N., et al. Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice. International journal of immunopharmacology. 1998,20:781-9.

[30] Pothion, S., Bizot, J. C., Trovero, F., Belzung, C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. Behavioural brain research. 2004,155:135-46.

[31] Bielajew, C., Konkle, A. T., Merali, Z. The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses. Behavioural brain research. 2002,136:583-92.

[32] Choi, D. C., Furay, A. R., Evanson, N. K., Ulrich-Lai, Y. M., Nguyen, M. M., Ostrander, M. M., et al. The role of the posterior medial bed nucleus of the stria terminalis in modulating hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness to acute and chronic stress. Psychoneuroendocrinology. 2008,33:659-69.

[33] Ostrander, M. M., Ulrich-Lai, Y. M., Choi, D. C., Richtand, N. M., Herman, J. P. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. Endocrinology. 2006,147:2008-17.

[34] Katz, R. J., Roth, K. A., Carroll, B. J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. Neuroscience and biobehavioral reviews. 1981,5:247-51.

[35] Harro, J., Tonissaar, M., Eller, M., Kask, A., Oreland, L. Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: effects on behavior and monoamine neurochemistry. Brain research. 2001,899:227-39.

[36] Herman, J. P., Larson, B. R., Speert, D. B., Seasholtz, A. F. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. Neurobiology of aging. 2001,22:323-32.

[37] Armario, A., Hidalgo, J., Giralt, M. Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. Neuroendocrinology. 1988,47:263-7.

[38] Riegle, G. D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. Neuroendocrinology. 1973,11:1-10.

[39] Dominguez-Gerpe, L., Rey-Mendez, M. Role of pre-T cells and chemoattractants on stress-associated thymus involution. Scandinavian journal of immunology. 2000,52:470-6.

[40] Nieuwenhuizen, A. G., Rutters, F. The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. Physiology & behavior. 2008,94:169-77.

[41] Richardson, R. D., Omachi, K., Kermani, R., Woods, S. C. Intraventricular insulin potentiates the anorexic effect of corticotropin releasing hormone in rats. American journal of physiology. 2002,283:R1321-6.

[42] Shibasaki, T., Yamauchi, N., Kato, Y., Masuda, A., Imaki, T., Hotta, M., et al. Involvement of corticotropin-releasing factor in restraint stress-induced anorexia and reversion of the anorexia by somatostatin in the rat. Life sciences. 1988,43:1103-10.

[43] Williams, G., Cai, X. J., Elliott, J. C., Harrold, J. A. Anabolic neuropeptides. Physiology & behavior. 2004,81:211-22.

[44] Richard, D., Lin, Q., Timofeeva, E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. European journal of pharmacology. 2002,440:189-97.

[45] Morley, J. E., Levine, A. S., Gosnell, B. A., Kneip, J., Grace, M. Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. The American journal of physiology. 1987,252:R599-609.

[46] Heinrichs, S. C., Menzaghi, F., Pich, E. M., Hauger, R. L., Koob, G. F. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. Brain research. 1993,611:18-24.

[47] Kim, H., Whang, W. W., Kim, H. T., Pyun, K. H., Cho, S. Y., Hahm, D. H., et al. Expression of neuropeptide Y and cholecystokinin in the rat brain by chronic mild stress. Brain research. 2003,983:201-8.

[48] Heinrichs, S. C., Richard, D. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. Neuropeptides. 1999,33:350-9.

[49] Gamaro, G. D., Prediger, M. E., Lopes, J. B., Dalmaz, C. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 2003,76:327-33.

[50] Baskin, D. G., Figlewicz Lattemann, D., Seeley, R. J., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Schwartz, M. W. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. Brain research. 1999,848:114-23.

[51] Xu, C., He, J., Jiang, H., Zu, L., Zhai, W., Pu, S., et al. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. Molecular endocrinology (Baltimore, Md. 2009,23:1161-70.

[52] Macfarlane, D. P., Forbes, S., Walker, B. R. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. The Journal of endocrinology. 2008,197:189-204.

[53] Wajchenberg, B. L., Bosco, A., Marone, M. M., Levin, S., Rocha, M., Lerario, A. C., et al. Estimation of body fat and lean tissue distribution by dual energy X-ray absorptiometry and abdominal body fat evaluation by computed tomography in Cushing's disease. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1995,80:2791-4.

[54] Rebuffe-Scrive, M., Walsh, U. A., McEwen, B., Rodin, J. Effect of chronic stress and exogenous glucocorticoids on regional fat distribution and metabolism. Physiology & behavior. 1992,52:583-90.

[55] Krsek, M., Rosicka, M., Nedvidkova, J., Kvasnickova, H., Hana, V., Marek, J., et al. Increased lipolysis of subcutaneous abdominal adipose tissue and altered noradrenergic activity in patients with Cushing's syndrome: an in-vivo microdialysis study. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca. 2006,55:421-8.

[56] Gravholt, C. H., Dall, R., Christiansen, J. S., Moller, N., Schmitz, O. Preferential stimulation of abdominal subcutaneous lipolysis after prednisolone exposure in humans. Obesity research. 2002,10:774-81.

[57] Carey, G. B. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. Advances in experimental medicine and biology. 1998,441:157-70.

Figures

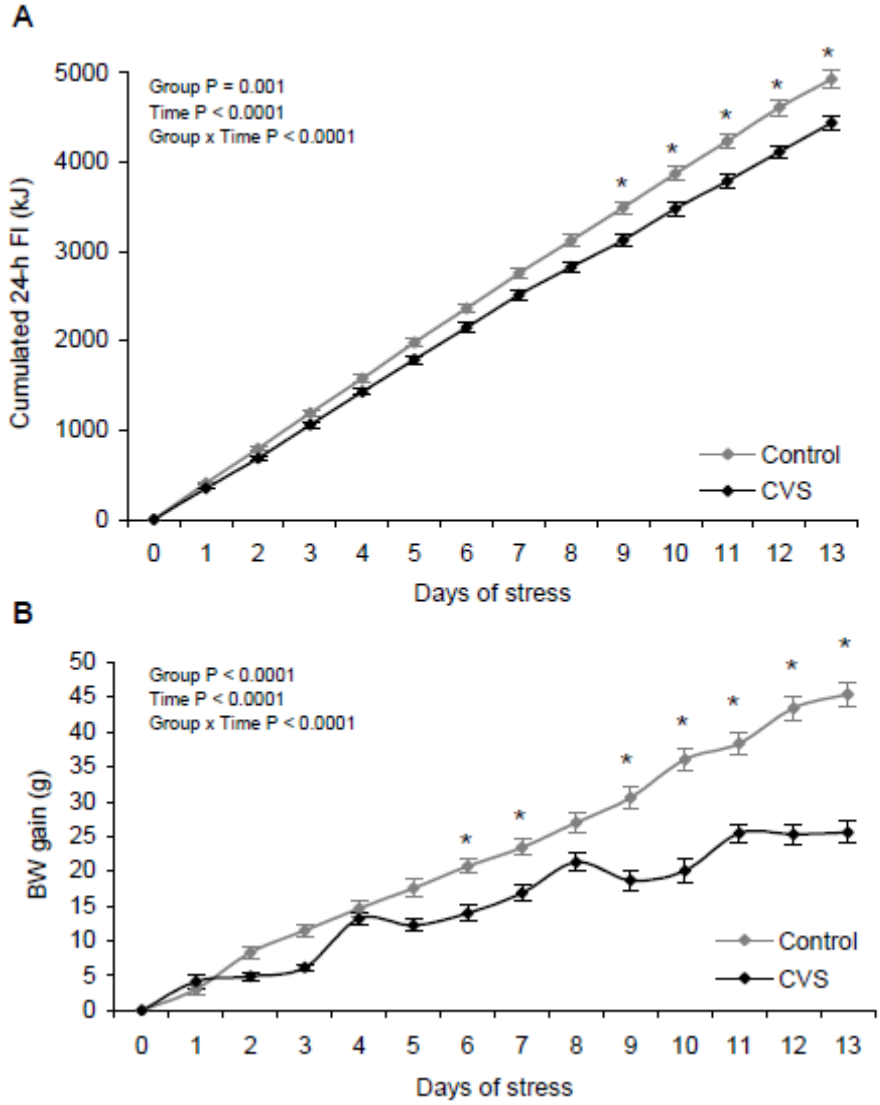


Fig. 1. Daily cumulative food intake (FI) (A) and daily cumulative body weight (BW) gains (B) during the CVS period in controls and CVS groups. Data are expressed as mean ± SE for groups of 12 rats. * indicates a significant difference between controls and CVS groups within a day ($P < 0.05$).

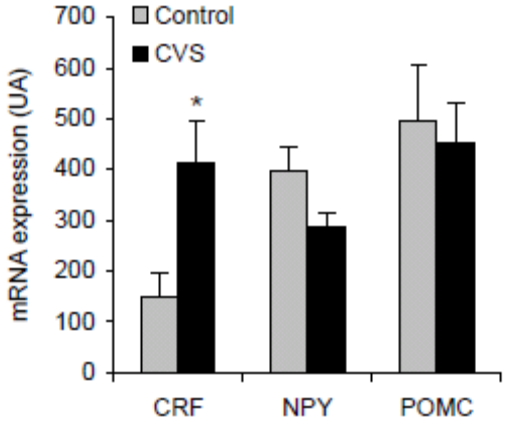


Fig. 2. Hypothalamic mRNA expression of CRF, NPY and POMC after the CVS period in controls and CVS groups. Data are expressed as mean ± SE for groups of 12 rats. * indicates a significant difference between controls and CVS groups ($P < 0.05$).

Tables

Table 1. CVS planning over 13 days.

Day	Stressor	Day	Stressor
1	Tilt+crowd 2h	8	Restraint 3h
	Forced swim cold 5min		Flash 8h
	Switch cage 14h	9	Forced swim warm 15min
2	Crowd 4h		Light off 3h
	Forced swim warm 15min		Tilt+crowd 3h
	Light on 12h		Light on 12h
3	Light off 2h	10	Forced swim cold 5min
	Restraint 2h		Restraint 2h
	Flash 3h	11	Light on 12h
4	Light on 12h	12	Tilt+crowd 1h
5	Crowd 1h		Switch cage 15h
	Flash 4h		Flash 12h
6	Forced swim warm 30min	13	Restraint 3h
	Restraint 2h		Crowd 2h
	Light off 3h		
7	Forced swim cold 5min		
	Crowd 2h		
	Switch cage 14h		

Table 2. Body weight gains, body composition and absolute thymus and adrenal glands weight in controls and CVS groups.

	Control	CVS
Final body weight gain (g)	42 ± 1	22 ± 1 *
Retroperitoneal WAT (g)	15 ± 1	12 ± 1
Epididymal WAT (g)	15 ± 1	12 ± 1
Subcutaneous WAT (g)	36 ± 4	25 ± 1 *
Total WAT (g)	65 ± 6	49 ± 3 *
Carcass (g)	183 ± 4	182 ± 2
Thymus (mg)	666 ± 53	661 ± 47
Adrenal glands (mg)	66 ± 3	66 ± 3

Data are expressed as mean ± SE for groups of 12 rats for final body weight gains, thymus and adrenal glands weight and for groups of 6 rats for WAT and carcasses. Total WAT was the sum of retroperitoneal, epididymal and subcutaneous WAT. * indicates a significant difference between controls and CVS groups ($P < 0.05$). WAT: white adipose tissues.

Table 3. Open field parameters of controls and CVS groups after the CVS period.

	Control	CVS
Squares crossed	32 ± 2	34 ± 3
Time in outer zone (s)	233 ± 5	245 ± 4
Time in inner zone (s)	36 ± 5	24 ± 2 *
Ratio time inner/outer zone	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.01 *
Grooming (s)	2.3 ± 2.0	5.5 ± 2.9
Rearing	21 ± 3	22 ± 2

Data are expressed as mean ± SE for groups of 12 rats. * indicates a significant difference between controls and CVS groups ($P < 0.05$).

Table 4. Plasma parameters of controls and CVS groups after the CVS period.

	Control	CVS
Corticosterone (µg/dl)	11 ± 3	21 ± 3 *
ACTH (pg/ml)	67 ± 5	71 ± 8
Insulin (pmol/l)	962 ± 66	810 ± 79
Leptin (pmol/l)	990 ± 71	797 ± 77

Data are expressed as mean ± SE for groups of 12 rats. * indicates a significant difference between controls and CVS groups ($P < 0.05$).

ANNEXE 4 : PROCESS DE FABRICATION DES LEVURES PAR LES BIOTECHNOLOGIES

http://www.lesaffrehumancare.fr/nous-connaitre/levures-et-biotechnologies/process-de-fabrication.html

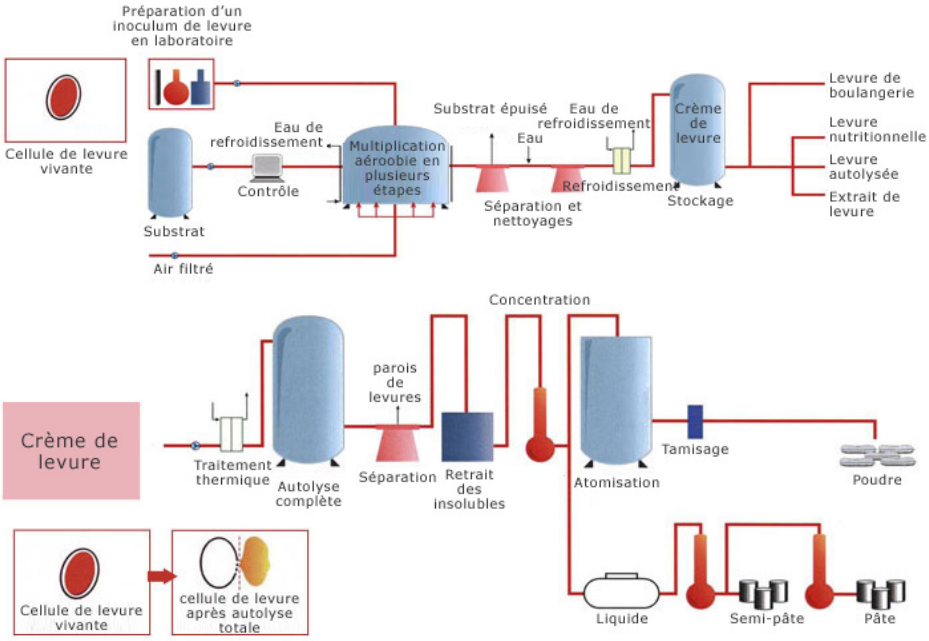
Leader mondial de la production de levure et de ses dérivés depuis plus de 150 ans, Lesaffre utilise une procédure automatisée et précisément contrôlée pour faire croître ses levures. On peut distinguer 4 étapes :

Etape 1: Ensemencement
La base de tous les produits dérivés de la levure Lesaffre est la culture d'une souche pure de Saccharomyces cerevisiae non génétiquement modifiée. Nos techniciens préparent la culture en laboratoire en suivant des procédures de contrôle de la qualité très strictes. La levure ensemencée croît dans des fioles stériles puis elle est transférée dans de grandes cuves de fermentation en acier inoxydable où elle sera mise en culture.

Etape 2: Culture
Pendant le processus de culture, Lesaffre contrôle précisément la température, le pH et le substrat sur lequel la levure se développe de façon à optimiser les conditions de croissance. La levure se développe en condition aérobie.

Etape 3: Récolte
Une fois que la levure s'est suffisamment multipliée, le liquide obtenu est passé dans un centrifugeur qui le concentre et débarrasse complètement les cellules de levure des impuretés. Le produit résultant de cette opération est un liquide blanc cassé appelé "crème de levure".

Etape 4: Séchage
La levure est séchée soit sur des tambours rotatifs soit sur des lits fluidisés puis elle est tamisée ou un extrait de levure est produit (voir schéma).



ANNEXE 5 : TABLEAU RECAPITULATIF DES ETUDES REALISEES TESTANT L'EFFET ANTI-STRESS D'EXTRAITS DE LEVURE LORS DE MODELES DE STRESS AIGU

	Stresseur	Protocole expérimental [1]	Poids rats	n/groupe	PA % niveau de base (moyenne de 2 j) [2]					Corticostérone (µg/dl)			
					Intervalle	Effet stress [3] ↓ PA	Exl testés [4]	Effet exl: Effet groupe [5]	Effet exl: Différences *Post hoc* [6]	Effet stress [3] ↑ CORT.	Exl testés [4]	Effet exl: Effet groupe [5]	Effet exl: Différences *Post hoc* [6]
NF1	**Nage forcée 10 min**	3 j (PA : J1-J2-J3)	275-300 g	6	PA1h	P < 0,05	Exl2006-1	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$				
							Exl2006-1b	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$				
							Exl18	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$				
							FP	P < 0,05	$NS^a\ S^{ab}\ Exl^b$				
NF2	**Nage forcée 30 min**	2 j (PA : J1-J2)	275-300 g	6	PA1h	P < 0,05	Exl2006-1	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$				
NF3	**Nage forcée 30 min**	2 j (PA : J1-J2)	275-300 g	6	PA1h	P < 0,05	Exl2006-1	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$				
							Exl2006-1b	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$				
							Exl18	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$				
CONT1	**Contention 3 h**	3 j (PA : J1-J2-J3)	275-300 g	6	PA24h	P < 0,05	Exl2006-1	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^{ab}$				
CONT2	**Contention 3 h**	5 j (PA : J1-J2-J3-J4-J5)	275-300 g	6	PA24h	P < 0,05	Exl2006-1	P < 0,05	$NS^a\ S^{ab}\ Exl^b$				
							Exl2006-1b	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$				
							Exl18	P < 0,05	$NS^a\ S^{ab}\ Exl^b$				
CONT3	**Contention 3 h** ***PA ad libitum 6 h/j***	3 j (PA : J1-J2 ; CORT : J3)	275-300 g	8	PA6h	P < 0,05	Exl2006-2	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$	P < 0,05	Exl2006-3	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^a$
							Exl2006-3	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$		Exl2006-4	P < 0,1	
							Exl2006-4	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$		Exl2006-5	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^{ab}$
							Exl2006-5	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$		Exl2006-6	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^a$
							ExlSAM	P < 0,05	$NS^a\ S^{ab}\ Exl^b$		ExlSAM	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^{ab}$
CONT4	**Contention 3 h** ***PA ad libitum 6 h/j***	3 j (PA : J1-J2 ; CORT : J3)	275-300 g	7	PA6h	P < 0,05	Exl2006-2	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$	P < 0,05	Exl2006-3	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^{ab}$
							Exl2006-4	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$		Exl2006-5	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^{ab}$
							Peptone	ns			Peptone	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^{ab}$
DS	**Défaite sociale 1 h**	3 j (PA : J1-J2 ; CORT : J3)	200-225 g	9	PA3h	P < 0,05	Exl2006-2	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$	ns	Exl2006-3	ns	
							Peptone	P < 0,05	$NS^a\ S^b\ Exl^b$		Peptone	ns	

[1] Le stresseur peut être appliqué durant 2 à 5 jours, la prise alimentaire est mesurée lors de 2 à 5 jours et la concentration plasmatique de corticostérone (CORT.) lors du dernier jour de stress (généralement le 3ème jour).
[2] Bien que la prise alimentaire soit mesurée lors d'une période de 2 à 5 jours, par soucis d'uniformité, les données présentées dans ce tableau correspondent à la moyenne de la prise alimentaire des 2 premiers jours de stress. La prise alimentaire suite au stress est présentée en pourcentage du niveau de base (moyenne des 2 jours précédant l'application du stresseur) : PA stress (%) = PA stress (kJ) x 100/PA base (kJ).
[3] Test T non pairé entre les groupes non stressé et stressé : P < 0,05 indique une diminution de la prise alimentaire ou une augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone (cort.) du groupe stressé par rapport au groupe non stressé.
[4] Les extraits de levure testés sont soit issus de différents lots de production de l'exl2006 (exl2006-1 à 6), soit une fraction peptidique de l'exl2006 (FP), soit des extraits de levure autre qu'exl2006 mais potentiellement anti-stress (exlSAM et peptone), soit des extraits levures témoins (exl18). Tous les extraits de levure sont administrés à la dose de 50 mg/kg par jour à l'exception de l'exlSAM administré à la dose de 250 mg/kg de poids corporel.
[5] Analyse de la variance à un facteur, groupe (3 niveaux : non stressé" = NS, stressé = S et stressé+exl = Exl) : P < 0,05 indique un effet significatif du groupe. ns : non significatif.
[6] Après une différence statistique, la comparaison *post hoc* des moyennes 2 à 2 est effectuée en utilisant le test de Tukey Kramer. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.