



HAL
open science

**Stress néonatal et régulation à long terme de la prise
alimentaire chez le rat : explorations
neuroendocriniennes, morphofonctionnelles et
comportementales**

Zsuzsa Penke

► **To cite this version:**

Zsuzsa Penke. Stress néonatal et régulation à long terme de la prise alimentaire chez le rat : explorations neuroendocriniennes, morphofonctionnelles et comportementales. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT : 2002NAN10250 . tel-01747497

HAL Id: tel-01747497

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747497>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique - BP 11
54601 VILLERS-LES-NANCY Cédex



U.F.R. des Sciences & Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie et Santé
Université Henri Poincaré – Nancy 1

Ecole Doctorale Neurosciences
Université Semmelweis - Budapest

N° attribué par la bibliothèque : _____

THESE

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-1 et de
Docteur de l'Université Semmelweis, Budapest
Discipline : Neurosciences et Comportement

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2002 par

Zsuzsa PENKE

**Stress néonatal et régulation à long terme de la prise alimentaire chez le rat :
explorations neuroendocriniennes, morphofonctionnelles et comportementales.**

*Directeurs de thèse : Docteur Arlette Burlet
Professeur Csaba Nyakas*

MEMBRES DU JURY :

RAPPORTEURS

Mme Stéfania MACCARI Professeur, Université Lille-1
Mme Ágnes NEMESKÉRI Professeur, Université Semmelweis

EXAMINATEURS

Mme Arlette BURLET Chargée de recherches, Université Nancy-1
Mme Ida GERENDAI Professeur, Université Semmelweis
M. György LÉVAY Directeur de recherches, EGIS, Budapest
M. Simon THORNTON Professeur, Université Lille-1
Mme Odile VILTART Maître de conférences, Université Lille-1

Ce travail a été effectué en collaboration entre des laboratoires français et hongrois, au sein de l'équipe de recherches sur les " Systèmes Neuromodulateurs des Comportements d'Ingestion ", EA 3453 de l'Université Nancy-1, et l'Institut pour la Médecine Clinique et Expérimentale de Laboratoire de l'Université Semmelweis de Budapest.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Claude Burlet pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour m'avoir encouragé à faire une thèse et pour m'avoir aidée à mener à bien ce travail.

Je suis très reconnaissante au Docteur Arlette Burlet pour sa direction efficace, pour m'avoir appris de nombreuses méthodes, pour son aide lors de la rédaction des publications et du mémoire et pour les discussions enrichissantes.

Je remercie Monsieur le Professeur Csaba Nyakas pour avoir rendu possible par sa flexibilité l'expérience enrichissante d'une collaboration internationale, et pour avoir obtenu les conditions matérielles permettant mon travail en Hongrie.

Mes remerciements vont également à Madame le Professeur Stéfania Maccari et au Docteur Ágnes Nemeskéri qui ont accepté la lourde tâche de rapporteur,

A Madame le Professeur Ida Gerendai, au Docteur György Lévay, au Docteur Odile Viltart et à Monsieur le Professeur Simon Thornton pour avoir accepté de juger la qualité de ce travail,

A Monsieur le Professeur Paul Luiten et au Docteur Katalin Horváth de l'Université de Groningen, pour avoir rendu possible une collaboration très intéressante,

A Brigitte Fernet pour son amitié et son aide, toujours offerte de bon cœur,

A Mária Sasvári pour son soutien précieux,

A Edith Angel, Thierry Anthony, Stéphanie Blanchard et Antoine Fillion pour leur contribution importante dans de nombreuses étapes de ce travail,

A l'ensemble des personnes de l'équipe 3453 et du laboratoire de l'Institut pour la Médecine Clinique qui m'ont aimablement accueillie.

J'exprime ma gratitude à Yann pour avoir corrigé le mémoire, écouté mes explications intarissables et pour m'avoir soutenue pendant les moments difficiles,

A la famille Verdier pour son aide et sa confiance,

A tous les amis rencontrés en France, qui m'ont apporté joie et réconfort,

A mes parents et ma famille qui, malgré la distance, a toujours su rester présente.

ABRÉVIATIONS	4
INTRODUCTION	5
1 Fonctionnement et développement de l'axe corticotrope	7
1.1 Fonctionnement de l'axe corticotrope	7
1.1.1 Circuits centraux contrôlant l'axe corticotrope	9
1.1.2 Noyau paraventriculaire : CRH, VP	9
1.1.3 Hypophyse : ACTH	12
1.1.4 Surrénales : glucocorticoïdes	13
1.1.5 Rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope par les glucocorticoïdes	17
1.2 Développement de l'axe corticotrope	18
1.2.1 Le système hypothalamo-hypophysaire : NPV et adénohypophyse	18
1.2.2 Surrénales et récepteurs aux corticostéroïdes	20
1.2.3 La période d'hypo-réponse aux stimuli stressants	21
2 La régulation du comportement alimentaire	22
3 Axe corticotrope et comportement	26
3.1 Axe corticotrope et comportement alimentaire	26
3.1.1 La famille CRH des peptides	27
3.1.2 Glucocorticoïdes	28
3.1.3 Stress et comportement alimentaire	29
3.2 Axe corticotrope et anxiété	30
3.3 Troubles psychologiques humains liés à l'axe corticotrope	31
3.3.1 Troubles du comportement alimentaire	31
3.3.2 Dépression, maladies affectives, d'anxiété	32
3.3.3 Schizophrénie	33
4 Manipulations périnatales	33
4.1 <i>Handling</i> (manipulation) néonatal(e)	34
4.2 Stress prénatal	34
4.3 Séparation maternelle de 24 heures	35
4.3.1 Effets immédiats	35
4.3.2 Effets à long terme	39
4.4 Séparation maternelle répétée	44
4.4.1 Effets immédiats	44
4.4.2 Effets à long terme	45
MATÉRIELS ET MÉTHODES	46
1 Animaux et maintenance	46
2 Séparation néonatale de la mère	47
3 Protocoles expérimentaux et effectifs	47
3.1 Effets immédiats	47
3.2 Effets persistants	48
3.2.1 Animaux nourris du régime standard	48
3.2.1.1 Comportement alimentaire basal	48
3.2.1.2 Comportement alimentaire après une contention de 3 heures	49

3.2.1.3	Comportement alimentaire après une injection intracérébroventriculaire de leptine	49
3.2.1.4	Comportement alimentaire après une injection intrapéritonéale de dexfenfluramine (dF)	50
3.2.1.5	Comportement d'anxiété dans un appareil " open field "	50
3.2.1.6	Réponse neuroendocrinienne à la contention	50
3.2.1.7	Réponse neuroendocrinienne à un jeûne de 48 heures	51
3.2.1.8	Prélèvements basaux à la fin des expériences	51
3.2.2	Animaux nourris au régime des trois macronutriments séparés	52
3.2.3	Animaux nourris au régime " cafétéria "	52
4	Régimes	53
4.1	Régime standard	53
4.2	Régime de trois macronutriments dissociés	53
4.3	Régime cafétéria	53
5	Injection intracérébroventriculaire de la leptine	54
6	Stress de contention	55
6.1	Méthode de contention	55
6.2	Canulation jugulaire et prélèvements	55
6.2.1	Méthode opératoire	55
6.2.2	Prélèvements sanguins et méthode de contention	56
7	" Open field "	57
8	Etude des ARN messagers par hybridation in situ	57
9	Etude de neuropeptides par immunocytochimie (ICC)	62
10	Analyse biochimique de la liaison des récepteurs aux glucocorticoïdes	65
11	Quantification des récepteurs aux glucocorticoïdes par Western Blot	66
12	Dosages radioimmunologiques	68
13	Analyses statistiques	69
RÉSULTATS		71
1	Effets immédiats	71
1.1	Poids corporel	71
1.2	Observations neuroendocriniennes	72
1.2.1	ARN messagers des neuropeptides CRH et VP dans le NPV	72
1.2.2	Immunoréactivité des protéines CRH et VP	74
1.2.2.1	Dans le NPV	74
1.2.2.2	Dans l'éminence médiane	77
1.2.3	Taux d'ACTH et de CORT	80
1.2.4	Poids des surrénales	81
1.2.5	Récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'adénohypophyse	82
2	Effets persistants	83
2.1	Observations neuroendocriniennes	83
2.1.1	ARN messagers des neuropeptides CRH et VP dans le NPV	83
2.1.2	Taux plasmatiques d'ACTH et de CORT	86
2.1.2.1	Taux basaux	86
2.1.2.2	Après une contention de 30 minutes	88
2.1.2.3	Après un stress d'éther	89
2.1.2.4	Après 48 heures de jeûne	90

2.1.3	Poids des surrénales	91
2.1.4	Récepteurs aux glucocorticoïdes	93
2.1.4.1	Liaison biochimique dans l'hippocampe	93
2.1.4.2	Western Blot	93
2.2	Observations comportementales	96
2.2.1	Comportement alimentaire	96
2.2.1.1	Comportement alimentaire basal sur un régime de nourriture standard	96
2.2.1.2	Comportement alimentaire basal sur un régime de trois macronutriments dissociés	97
2.2.1.3	Comportement alimentaire basal à partir d'un régime "cafétéria"	100
2.2.1.4	Comportement alimentaire après un stress de contention de 3 heures	101
2.2.1.5	Comportement alimentaire après une injection intracérébroventriculaire de leptine	101
2.2.1.6	Comportement alimentaire après une injection i. p. de dexfenfluramine (dF)	102
2.2.2	Comportement d'anxiété	103
DISCUSSION		105
1	Maturation normale de l'axe corticotrope	105
2	Effets immédiats de la séparation maternelle	107
3	Effets persistants de la séparation maternelle	114
CONCLUSIONS		127
BIBLIOGRAPHIE		130
PUBLICATIONS		151

ABRÉVIATIONS

- 5-HT** : sérotonine
 α -MSH : alpha-mélanocortine
ACTH : corticotrophine
ADN : acide désoxyribonucléique
AGRP : *agouti-related peptide*
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARNhn : acide ribonucléique hétéronucléaire
ARNm : acide ribonucléique messenger
CART : *cocaine- and amphetamine regulated transcript*
CBG : corticostérone-binding globuline, protéine de transport des corticostéroïdes
CCK : cholécystokinine
CORT : corticostérone
CRH : corticolibérine
CRH-R1 : récepteur(s) à CRH du type 1
CRH-R2 : récepteur(s) à CRH du type 2
dF : dexfenfluramine
dNF : dexnorfenfluramine
EBDS : eau bidistillée stérile
EM : éminence médiane
EME : éminence médiane externe
EMI : éminence médiane interne
GABA : acide gamma-aminobutyrique
GH : hormone de croissance
GLP-1 : *glucagon-like peptide 1*
GnRH : gonadolibérine
ip : intrapéritonéal
HD : hypothalamus dorsal
HPF : hypothalamus périfornical
HL : hypothalamus latéral
(période) HRS : période d'hypo-réponse aux stimuli stressants
ICC : immunocytochimie
JF : jour fœtal
JPN : jour postnatal
LCR : liquide céphalo-rachidien
LH : hormone lutéotrope
MCH : hormone de mélanocortine
MC-R2 : récepteurs aux mélanocortines du type 2
MC-R4 : récepteurs aux mélanocortines du type 4
NArc : noyau arqué
NDM : noyau dorsomédian de l'hypothalamus
NGFI-B : *nerve growth factor-induced gene B*
NPV : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
NPY : neuropeptide Y
NSCh : noyau suprachiasmatique
NSEP : (rats) non séparés de la mère
NSO : noyau supraoptique
NTS : noyau du tractus solitaire
NVM : noyau ventromédian de l'hypothalamus
PAP : peroxydase anti-péroxydase
POMC : proopiomélanocortine
PRL : prolactine
RG : récepteur(s) aux glucocorticoïdes (type II de récepteurs aux corticostéroïdes)
RM : récepteur(s) aux minéralocorticoïdes (type I de récepteurs aux corticostéroïdes)
SDS : sodium-dodecyl-sulphate
SEM : erreur standard de la moyenne (*standard error of the mean*)
SEP : (rats) séparés de la mère pour 24 heures soit entre le JPN 5 et 6, soit entre le JPN 14 et 15
SEP14 : (rats) séparés de la mère pour 24 heures entre le JPN 14 et 15
SEP5 : (rats) séparés de la mère pour 24 heures entre le JPN 5 et 6
SSC : solution contenant 150 mM NaCl et 15 mM C₆H₅Na
TdT : terminal désoxynucléotidyl transférase (récepteur) **V1a** : récepteur à vasopressine du type 1a (récepteur) **V1b** : récepteur à vasopressine du type 1b
VP : vasopressine

INTRODUCTION

A l'âge précoce, le cerveau possède une plasticité importante, ce qui le rend très sensible à la programmation environnementale prénatale ou postnatale. Cette programmation peut modifier de nombreux systèmes du cerveau, et ainsi influencer la réactivité de l'organisme aux stimuli stressants, ses réactions comportementales face à des situations nouvelles, mais aussi le cours du vieillissement.

Les effets des événements périnataux peuvent être très divergents selon la nature plus ou moins invasive de la stimulation. La stimulation néonatale de l'animal par une manipulation (*handling*) ou par les soins de la mère induit, à l'âge adulte, une diminution de la réponse corticotrope, une diminution de la peur face à la nouveauté et protège par un effet neuroprotecteur l'organisme des déficits d'apprentissage liés à l'âge [1-3]. Au contraire, la séparation prolongée de la mère peut avoir des effets néfastes à l'âge adulte, notamment une augmentation de la réponse corticotrope, et une augmentation des déficits de mémoire liés à l'âge [4, 5].

La fonction principale du système corticotrope est d'assurer la réponse de l'organisme aux facteurs de stress, mais il joue également un rôle important dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, dont la prise alimentaire, l'anxiété et l'apprentissage. Puisque l'axe corticotrope est particulièrement sensible à la programmation périnatale, la régulation de toutes ces fonctions physiologiques peut être modifiée par des facteurs néonataux de l'environnement.

La réactivité du système corticotrope étant déterminée autant par des facteurs génétiques que par des facteurs environnementaux, en particulier périnataux, la conjonction de ces deux facteurs peut être responsable de la provocation ou l'exacerbation de nombreuses perturbations physiologiques et psychologiques liées au stress. Ces perturbations peuvent survenir chez l'homme comme chez l'animal, et comprennent non seulement des maladies psychosomatiques classiques, mais aussi des maladies immunitaires, cardio-vasculaires et des maladies affectives comme la dépression ou des troubles alimentaires [6a,b,c].

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail était d'explorer les effets persistants de la perturbation précoce de l'axe corticotrope en utilisant un modèle animal du stress néonatal : la séparation maternelle de 24 heures du rat. Nous avons introduit la séparation à deux moments du développement : le 5^{ème} jour postnatal, quand le rat traverse une période d'hypo-réponse aux stimuli stressants, et le 14^{ème} jour postnatal, quand cette période est terminée et la réponse aux stimuli stressants est similaire à celle des adultes.

Nous avons dans un premier temps évalué la réponse des différents niveaux du système corticotrope des jeunes rats aux stimuli stressants qui composent la séparation maternelle. Ensuite, nous avons étudié les effets persistants de la séparation maternelle sur l'axe corticotrope chez les rats adultes. Notre hypothèse de travail était que la séparation maternelle de 24 heures aurait des effets importants à court et à long terme sur le système corticotrope des rats, et que ces effets seraient moins importants ou inexistantes si la séparation est faite pendant la période d'hyporéponse de l'axe corticotrope. Finalement, nous nous sommes intéressés aux effets que les modifications de l'axe corticotrope ou d'autres systèmes du cerveau peuvent avoir sur le comportement alimentaire. Dans ce cadre, notre hypothèse de travail était que la séparation maternelle de 24 heures induirait une modification du comportement alimentaire.

Le but ultime de ce travail était d'établir si la séparation maternelle peut servir de modèle animal pour explorer les mécanismes menant au développement des troubles alimentaires et de la dépression chez l'homme.

1 Fonctionnement et développement de l'axe corticotrope

1.1 Fonctionnement de l'axe corticotrope

Les actions qui perturbent l'homéostasie de l'organisme sont appelées facteurs de stress ou stimuli stressants (*stressors* en anglais). Le stress est la réaction de l'organisme aux facteurs de stress ; cette réaction vise à rétablir l'homéostasie.

Les facteurs de stress peuvent être classés en deux catégories, différant dans leur nature [7]. La première catégorie comprend les facteurs de stress " neurogéniques ", qui sont émotionnels et/ou psychologiques, comme la contention (*restraint*), un nouvel environnement ou la peur. La deuxième catégorie comprend les facteurs de stress " systémiques ", qui sont physiques et menacent directement la survie, comme une perte de sang, une anesthésie ou le froid.

L'organisme réagit aux facteurs de stress par des réponses endocriniennes, qui déclenchent dans divers tissus de l'organisme les actions nécessaires au rétablissement de l'homéostasie. Les réponses endocriniennes aux facteurs de stress comprennent deux " vagues ". La première vague, qui survient en quelques secondes, est constituée de (1) l'augmentation de la sécrétion de catécholamines du système nerveux sympathique ; (2) la libération par les neurones hypothalamiques de la corticolibérine (CRH) et de la vasopressine (VP), et 10 secondes plus tard, l'augmentation de la sécrétion de la corticotrophine (ACTH) hypophysaire ; (3) la diminution de la libération de la gonadolibérine (GnRH) de l'hypothalamus, et dans un court laps de temps, la diminution de la sécrétion des gonadotrophines de l'hypophyse ; (4) la sécrétion de la prolactine (PRL) et, chez les primates, de l'hormone de croissance (GH) de l'hypophyse, ainsi que la sécrétion du glucagon du pancréas. La deuxième vague est plus lente, et comprend l'augmentation de la sécrétion de glucocorticoïdes et la diminution de la sécrétion de stéroïdes gonadiques [8].

Conformément à leur apparition, l'action de ces changements endocriniens sur les tissus cibles se déroule également selon une cinétique dans le temps. En particulier, les hormones de la première vague induisent la plupart de leurs effets par des cascades rapides de seconds messagers, et agissent en quelques secondes, ou au plus, en quelques minutes. Par contre, puisque la plupart des actions de stéroïdes sont génomiques, peu d'actions de

glucocorticoïdes sont identifiables moins d'une heure avant l'application du stress, et les conséquences de la diminution des niveaux de stéroïdes gonadiques n'apparaît pas avant plusieurs heures [8].

Le système corticotrope représente une voie finale commune à tous les types de stimuli stressants (qu'ils soient neurogéniques ou systémiques). Il est composé (Figure 1) : (1) des neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (NPV), qui représentent la voie finale commune pour l'intégration de la réponse aux stimuli stressants dans le cerveau, qui sécrètent la CRH et, pour une partie d'entre eux, la VP ; (2) : des cellules corticotropes de l'hypophyse, qui sécrètent l'ACTH en réponse à la stimulation par la CRH et la VP ; (3) des cellules de la corticosurrénale, qui sécrètent des glucocorticoïdes en réponse à la stimulation par l'ACTH. La réponse de l'axe corticotrope aux facteurs de stress sera détaillée plus loin.

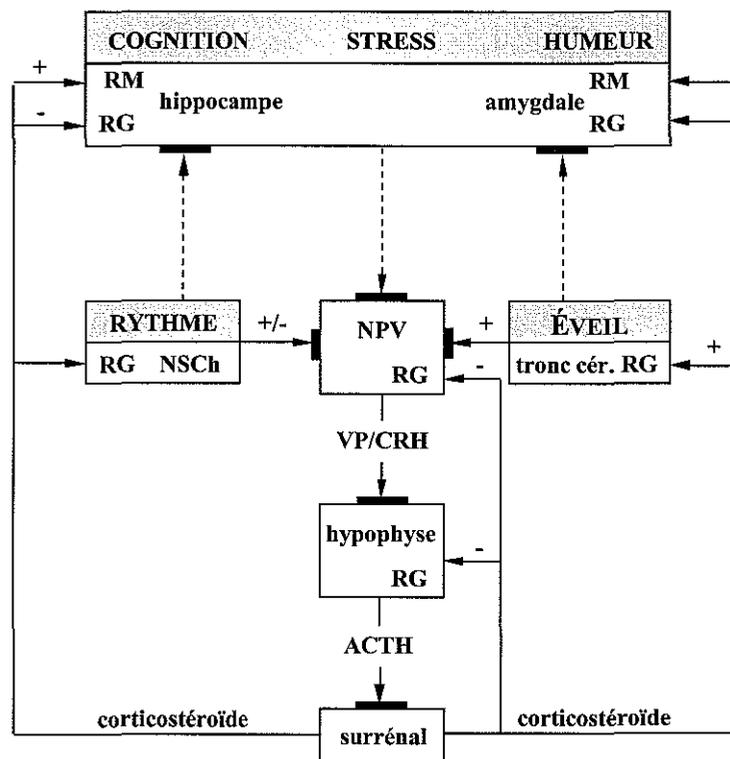


Figure 1. Organisation de l'axe corticotrope, et les éléments majeurs de sa régulation [9].

L'axe corticotrope montre à tous les niveaux un rythme nyctéméral, avec un pic d'activité au début de la période active. Le pic des taux circulants de glucocorticoïdes au début de la période active est précédé de 3 à 4 heures par une expression et une sécrétion élevées de la CRH dans le NPV, suivies par une augmentation de la libération de la CRH vers l'hypophyse. Ce rythme est contrôlé d'une part par des actions rétrocontrôle des

glucocorticoïdes à tous les niveaux de l'axe corticotrope, et d'autre part par le noyau suprachiasmatique (NSCh) et l'hippocampe [10] (Figure 1).

1.1.1 Circuits centraux contrôlant l'axe corticotrope

Des structures cérébrales impliquées dans l'éveil et le traitement de l'information participent dans la régulation de l'axe corticotrope (Figure 1). Les facteurs de stress "neurogéniques" activent les aires corticales et limbiques (cortex préfrontal, hippocampe, amygdale) qui vont stimuler l'axe corticotrope. Les facteurs de stress "systémiques" activent l'axe corticotrope par la voie ascendante catécholaminergique du tronc cérébral en contournant le traitement cognitif. Le NSCh transmet au NPV son activité *pacemaker* excitatrice et inhibitrice : cette action est également modulée par des corticostéroïdes. (Le NSCh régule également, par des projections spinales, le rythme circadien de la sensibilité des surrénales à l'ACTH et leur sécrétion de corticostéroïdes.) Les neurones GABA-ergiques de l'hypothalamus et de l'aire préoptique inhibent directement l'activité du NPV. Ces trois systèmes sont régulés par les récepteurs aux glucocorticoïdes (RG) [9].

Des afférences limbiques du NPV ainsi que les neurones GABA de l'hypothalamus (qui inhibent l'activité de l'axe corticotrope) expriment, en plus des RG, des niveaux élevés de récepteurs aux minéralocorticoïdes (RM). Les afférences issues de l'hippocampe augmentent l'activité GABA-ergique de l'hypothalamus, en supprimant l'activité de l'axe corticotrope. A l'inverse, les afférences venant de l'amygdale diminuent l'activité GABA-ergique de l'hypothalamus, en stimulant (par désinhibition) l'activité de l'axe corticotrope.

1.1.2 Noyau paraventriculaire : CRH, VP

La CRH et la VP sont donc les deux neuromédiateurs majeurs des NPV impliqués dans la mise en jeu du système corticotrope.

La CRH est un peptide de 41 acides aminés [11]. Des neurones de l'axe corticotrope sécrétant la CRH sont situés dans la subdivision dorsale médiale de la partie parvocellulaire du NPV [12], et dans d'autres sites cérébraux – noyau central de l'amygdale, noyaux du lit de

la strie terminale – qui sont impliqués dans le traitement cognitif des informations stressantes [13].

La CRH produite dans le NPV stimule par ses voies neuroendocriniennes la sécrétion de l'ACTH, la transcription de la proopiomélanocortine (POMC) et les mitoses des cellules corticotropes de l'hypophyse [14]. De plus, elle contribue directement, sans la participation de l'ACTH, donc par des voies paracrines, à l'activation du système sympathique pendant la réponse stress, et stimule ainsi la réponse cardio-vasculaire au stress [8]. La localisation immunohistochimique de la CRH démontre une distribution extra-hypothalamique large dans le système nerveux central, où elle produit de nombreux effets autonomes, électrophysiologiques et comportementaux qui sont bien compatibles avec un rôle neurotransmetteur ou neuromodulateur dans le cerveau [15].

La CRH exerce ses effets par l'activation de récepteurs liés aux protéines G. Deux types de récepteurs à CRH ont été clonés : le type 1 (CRH-R1) et le type 2 (CRH-R2), pour lequel une variante courte et longue ont été distinguées (sous-types CRH-R2 α et CRH-R2 β ; revue [16]). Le CRH-R1, qui transmet les actions de la CRH aux cellules corticotropes de l'hypophyse, est largement distribué dans le cerveau, alors que le CRH-R2 α est localisé dans des régions plus restreintes, notamment dans la région limbique (les CRH-R2 β n'ont pas été localisés dans les éléments neuronaux [16, 17]). Le CRH-R1 est lié à une protéine G qui active la voie de signalisation adénylate-cyclase – protéine-kinase A [18-20]. La voie de signalisation protéine-kinase C joue également un rôle important dans l'effet de la CRH [21, 22].

Il a été établi dans diverses conditions expérimentales qu'il n'existe pas de corrélation entre la sensibilité de l'hypophyse aux stimuli stressants et le nombre de récepteurs à CRH de l'hypophyse [14]. Par conséquent, le nombre de ces récepteurs n'est pas un facteur majeur déterminant la réponse hypophysaire aux stimuli stressants, et une réponse ACTH complète peut être induite par l'occupation partielle des récepteurs.

La VP (aussi appelée hormone antidiurétique) est un nonapeptide produit dans les noyaux hypothalamiques paraventriculaires et supraoptiques. La VP participant dans la régulation de la sécrétion de l'ACTH provient de la partie parvocellulaire du NPV. Elle est sécrétée dans les capillaires portes de l'hypophyse à partir des terminaisons axonales de la lame externe de l'éminence médiane (EM) [23].

La VP seule est un stimulus faible de la sécrétion de l'ACTH, mais elle amplifie fortement l'action de la CRH. Le mécanisme de la synergie entre la CRH et la VP comprend une potentialisation, relayée par la protéine kinase C, de la production de l'AMPc stimulée par la CRH et par d'autres mécanismes [24]. En plus de son rôle de régulateur de la fonction des cellules corticotropes, la VP participe au métabolisme de fluides. Dans certaines conditions, l'augmentation de la VP d'origine magnocellulaire (participant généralement à la régulation du métabolisme des fluides) peut aussi faciliter la sécrétion de l'ACTH par l'hypophyse [24].

La VP active trois types majeurs de récepteurs (V1a,b et V2), qui sont codés par des gènes différents. Les récepteurs situés dans l'hypophyse, du type V1b, participent à la réponse aux stimuli stressants, et leur activité est liée à l'activation de la phospholipase C [24]. La régulation de récepteurs V1b dans l'hypophyse joue un rôle important dans la sensibilité des cellules corticotropes, puisqu'il existe une bonne corrélation entre le contenu en récepteurs de l'hypophyse et les réponses ACTH [25].

Un stress aigu stimule la libération de CRH et de VP de l'EM dans la circulation porte de l'hypophyse et augmente l'expression des deux peptides dans les neurones parvocellulaires du NPV [24]. Quel que soit le stimulus stressant utilisé, on observe d'abord une augmentation très rapide de la quantité du transcrite primaire (ARN_{hn}) de la CRH et de la VP, qui est suivie par une augmentation plus lente de l'expression de leurs ARNm, significative 1 ou 2 h après le début du stress [24]. L'augmentation des ARN de VP est retardée par rapport à celle des ARN de CRH, et elle est due à la fois à l'augmentation de la densité des transcrits et à l'augmentation de nombre de cellules parvocellulaires exprimant l'ARN_{hn} et l'ARNm de la VP [26].

La mesure des changements d'ARN_{hn} a révélé que la cinétique de l'activation de la transcription de la CRH et de la VP peut être différente, et que chacune dépend du paradigme de stress utilisé [24, 27]. Ceci démontre que l'expression de ces gènes est régulée par différentes voies de signalisation et par différents facteurs de transcription.

La réponse ACTH diminue dans la plupart des cas après une exposition chronique ou répétée au même type de stimulus stressant (stress *homotypique*), comme dans le cas de la contention. Elle peut aussi rester inchangée, comme dans le cas de l'injection intrapéritonéale de soluté hypertonique. Cependant, la réponse ACTH à un autre type de stimulus stressant (stress *hétérotypique*) est invariablement préservée ou même augmentée, que le

stress soit chronique ou répété. Ce phénomène est lié au fait que l'expression de la CRH diminue avec l'exposition répétée à un stimulus stressant homotypique, alors que l'expression de la VP augmente. Notamment, il a été démontré dans divers paradigmes de stress répété, que l'augmentation de l'expression de l'ARN_{hn} et de l'ARN_m de la VP dans les neurones parvocellulaires après un stimulus stressant homotypique est similaire ou plus importante par rapport au stress aigu, et au fil des jours on observe une augmentation progressive des réserves de VP, de la colocalisation de VP dans les terminaisons nerveuses à CRH, et de la libération de VP depuis les terminaisons de l'EM. Au contraire, une augmentation progressive des réserves de CRH de la zone externe de l'EM, ainsi qu'une réponse à un stimulus stressant homotypique de l'expression de l'ARN_{hn} et de l'ARN_m de la CRH dans le NPV est observée seulement dans les paradigmes du stress répété où une réponse des hormones plasmatiques est préservée [24, 28]. Un stress chronique induit également une augmentation de la concentration des récepteurs V1b dans les cellules corticotropes de l'hypophyse [25]. Comme la réponse de l'expression de la CRH à un stimulus stressant hétérotypique n'est pas affectée par un stress chronique ou répété [29], c'est donc l'augmentation de l'expression de la VP (en synergie avec la CRH) dans le NPV et/ou de l'expression des récepteurs V1b dans l'hypophyse, induites par le stress répété ou chronique qui entraîne une amplification de la réponse ACTH à un stimulus stressant hétérotypique.

1.1.3 Hypophyse : ACTH

L'ACTH est un polypeptide de 39 acides aminés produit dans les cellules corticotropes de l'hypophyse, qui constituent 5 à 10% de toutes les cellules produisant des hormones de l'hypophyse mature. Ces cellules produisent une molécule précurseur de plusieurs peptides, la POMC [30]. Le clivage de la POMC dans l'hypophyse produit l'ACTH et la β -lipotrophine. La β -lipotrophine est coupée encore une fois, produisant la β -endorphine [30]. Ces produits sont appelés mélanocortines.

Le rôle principal de l'ACTH est de stimuler la synthèse et la sécrétion des glucocorticoïdes dans la corticosurrénale. L'ACTH produit son effet sur les cellules de la corticosurrénale par des récepteurs aux mélanocortines du type 2 (MC-R2), qui sont

exprimées principalement dans les cellules de la zone réticulée et fasciculée, mais aussi dans quelques cellules de la médullosurrénale [31].

L'ACTH liée à son récepteur active la voie adénylate-cyclase et active la protéine kinase A, ainsi que la protéine kinase C. Après une stimulation à long terme, l'ACTH augmente la synthèse et la sécrétion des glucocorticoïdes dans la corticosurrénale en augmentant l'expression de plusieurs enzymes stéroïdogéniques [32].

1.1.4 Surrénales : glucocorticoïdes

Le glucocorticoïde majeur de l'axe corticotrope est le cortisol chez l'homme et les primates, et la corticostérone (CORT) chez les rongeurs habituellement utilisés dans les laboratoires. Cependant, ces deux molécules sont présentes chez tous les mammifères. La production de glucocorticoïdes de la zone fasciculée des surrénales est principalement régulée par l'ACTH [32].

Les glucocorticoïdes contribuent au fonctionnement de l'organisme à l'état basal, et ils l'aident à traverser la crise en situation de stress [8]. Ils pénètrent sans obstacle dans le cerveau, où ils coordonnent, avec d'autres composants du système de stress, la capacité de l'organisme à répondre au stress. Ils orientent l'énergie vers les tissus qui en ont besoin, et contrôlent l'excitabilité de réseaux neuronaux qui sous-tendent les processus d'apprentissage et de mémoire. Cependant, seulement une faible partie des actions de glucocorticoïdes est observée dans l'heure suivant le début d'un stress. De plus, les glucocorticoïdes n'induisent pas uniquement la mobilisation des ressources de l'organisme, mais ils contribuent aussi au freinage de ce mécanisme. C'est pourquoi il est important de différencier leurs effets selon leur relation au stress [8] :

a. les actions *permissives* amorcent les mécanismes de défense par lesquels l'organisme répond aux stimuli stressants, elles apparaissent aux niveaux basaux de glucocorticoïdes ;

b. les actions *suppressives* apparaissent quand les niveaux de glucocorticoïdes s'élèvent à cause du stress, donc au moins une heure après que le stimulus stressant a commencé à agir ; ces actions freinent les mécanismes de défense activés par le stress et les préviennent de l'*overshoot* ;

c. les actions *stimulantes* des glucocorticoïdes apparaissent également quand les niveaux de glucocorticoïdes s'élèvent à cause du stress, mais contrairement aux actions suppressives, elles augmentent les effets des autres hormones de stress.

Les glucocorticoïdes agissent sur nombreuses fonctions de l'organisme, et le caractère permissif, suppressif ou stimulant de leurs actions peut devenir prédominant suivant leur concentration (revue [8]). Les glucocorticoïdes agissent sur :

(1) *Le métabolisme.*

L'organisme a besoin de maintenir les taux sanguins de sources d'énergie (glucose, acides gras, acides aminés) pendant le stress qui est énergiquement très coûteux. Les glucocorticoïdes contribuent à cela de plusieurs manières. Au début du stress, ils ont un *rôle permissif* : présents à des taux basaux, ils stimulent la glycogénolyse et la gluconéogénèse par le glucagon et les catécholamines qui apparaissent dans la réponse immédiate à un facteur de stress. Ils ont également un *rôle stimulant* : à des taux induits par le stress (ainsi qu'à des taux basaux) ils stimulent directement la gluconéogénèse hépatique et la lipolyse, et inhibent le transport et l'utilisation périphérique du glucose [8].

(2) *Le système cardio-vasculaire.*

Pendant le stress, les vaisseaux sanguins se contractent et le cœur bat plus vite, ce qui mène à une augmentation de la pression sanguine. Les glucocorticoïdes jouent un *rôle permissif* dans la réaction cardio-vasculaire induite par la plupart des facteurs de stress, puisque leur présence aux taux basaux est nécessaire pour que les catécholamines et les autres vasoconstricteurs puissent exercer leurs actions sur les vaisseaux sanguins et sur le cœur [8].

(3) *L'utilisation cérébrale du glucose.*

L'activation du système nerveux sympathique induit une augmentation de l'utilisation cérébrale du glucose quelques secondes après le début du stress. Par la suite, la présence de glucocorticoïdes aux taux induits par le stress inhibe l'utilisation du glucose dans le cerveau, ce qui leur confère un rôle suppressif [8].

(4) *Le volume sanguin.*

Pendant un stress d'hémorragie, l'organisme met en route des mécanismes pour augmenter le volume sanguin. Les glucocorticoïdes jouent un *rôle suppressif* dans cette réaction, puisque leur présence aux taux basaux ou induits par le stress stimule l'excrétion de l'eau. Ce rôle passe par plusieurs actions : les glucocorticoïdes inhibent la libération de la VP, augmentent la filtration glomérulaire, et augmentent la sécrétion et l'efficacité du polypeptide atriale natriurétique [8].

(5) *L'immunité et l'inflammation.*

Quand l'organisme rencontre un facteur de stress infectieux, le système immunitaire est activé immédiatement. Les glucocorticoïdes ont à ce stade un rôle permissif : ils sont nécessaires à des taux basaux au fonctionnement normal du système immunitaire. Cependant, après ce stade précoce, les glucocorticoïdes à des taux induits par le stress ont un *rôle suppressif*, puisqu'ils inhibent l'inflammation et le système immunitaire. L'immunosuppression est importante notamment pour diminuer la probabilité d'un *overshoot* auto-immun [8].

(6) *L'appétit et la prise alimentaire.*

Les glucocorticoïdes ont un *rôle suppressif* sur l'appétit et la prise alimentaire à des taux induits par le stress. Cependant, à des taux basaux, ils peuvent stimuler la prise alimentaire, ces effets seront détaillés plus loin [8].

(7) *La formation de la mémoire.*

Les facteurs de stress aigus stimulent la formation de la mémoire. Ce phénomène est induit par les catécholamines, mais les taux basaux de glucocorticoïdes ont un *rôle permissif* dans la formation de la mémoire, puisqu'ils stimulent la plasticité synaptique dans l'hippocampe. Cependant, pendant le stress chronique, la formation de la mémoire est inhibée, ce qui est en grande partie dû à des taux élevés de glucocorticoïdes qui ont un *rôle suppressif*, puisqu'ils perturbent la plasticité synaptique, et à long terme, induisent l'atrophie des neurones hippocampiques [8].

(8) *La physiologie reproductive.*

L'exposition à des facteurs de stress inhibe la physiologie et le comportement reproductifs. Ce phénomène est induit surtout par des hormones sécrétées dès le début du stress. Les glucocorticoïdes ont un *rôle stimulant* en contribuant à cet effet, puisque leur taux élevé diminue la libération du GnRH de l'hypothalamus ainsi que celui de l'hormone lutéotrope (LH) hypophysaire [8].

L'action des corticostéroïdes passe par la liaison de l'hormone à des RM (récepteurs de type I) ou à des RG (récepteurs de type II). Ces récepteurs sont intracellulaires, et agissent comme des facteurs de transcription de gènes. Les deux types de récepteurs ont été clonés et leur structure primaire est connue [33]. Les RM et les RG présentent une homologie de séquence de 94 % dans le domaine liant l'ADN et une homologie de 57 % dans le domaine liant le stéroïde, et ont donc un potentiel de contrôle des réseaux de gènes similaires [34].

Une différence critique entre les deux types de récepteurs est leur affinité pour des ligands naturels et synthétiques. Les RM ont une affinité importante pour la CORT et l'aldostérone (K_d 0,5 nM). Les RG ont la plus forte affinité pour des glucocorticoïdes synthétiques comme la dexaméthasone, RU 26988 et RU 28362, une affinité plus faible pour des glucocorticoïdes naturels comme la CORT (2,5-5 nM), et une affinité bien plus faible à l'aldostérone (revue [9]). En conséquence, la fraction de CORT "libre" (non liée à la protéine de transport des corticostéroïdes, le CBG) occupe la majorité des RM dans des conditions basales de repos, alors qu'une occupation substantielle des RG survient seulement au moment du pic circadien et pendant le stress [35]. Ainsi, une même molécule, la CORT, peut activer deux voies différentes par les RM et les RG [36].

L'expression des RM dans le cerveau est limitée aux neurones de la formation hippocampique, du septum latéral, de l'amygdale, du noyau olfactif, de la deuxième couche du cortex et des neurones sensoriels et moteurs du tronc cérébral, où ils apparaissent en forte densité [37]. Les RG ont une distribution plus étendue dans les neurones et les cellules gliales dans le cerveau [9, 38]. De hautes concentrations de RG se trouvent dans le système limbique (hippocampe, septum), dans les neurones parvocellulaires du NPV et dans les cellules corticotropes de l'hypophyse. Les RG sont présents aussi à des concentrations relativement élevées dans les neurones ascendants monoaminergiques du tronc cérébral. Des concentrations modérées se trouvent dans de nombreux noyaux thalamiques, dans les aires striatales et dans le noyau central de l'amygdale, dans les noyaux arqués hypothalamiques (NArc), ainsi que dans le cortex.

L'accès des corticostéroïdes (naturels ou synthétiques) aux récepteurs du cerveau est déterminé par de nombreux facteurs, comme la CBG, des enzymes métabolisant des stéroïdes et le P-glycoprotéine *mdr1A* [9].

Le premier facteur déterminant l'accès des corticostéroïdes au cerveau est la CBG. La CORT circulante est liée à la CBG (K_d ~50 nM) et, avec une affinité bien plus faible, à la sérumalbumine. Moins de 5 % de la CORT circulante est libre et biologiquement disponible [39]. Cette quantité est dans l'intervalle de K_d des récepteurs aux corticostéroïdes. Les niveaux de CBG sont régulés par un grand nombre de signaux, par exemple, les glucocorticoïdes, le stress, les œstrogènes. La CBG est aussi exprimé de manière intracellulaire dans l'hypophyse, où elle entre en compétition avec les RG, ce qui entraîne une forte diminution de la capture de CORT dans les noyaux des cellules corticotropes [9].

Le deuxième facteur déterminant l'accès des corticostéroïdes au cerveau est une enzyme, donc un régulateur dynamique. Cette enzyme est la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD) qui peut transformer la CORT en 11-déshydro-corticostérone, qui n'active pas les récepteurs aux corticostéroïdes. La fonction de cette enzyme est vraisemblablement de protéger les cellules d'une surexposition à la CORT [9].

Le troisième facteur déterminant l'accès des corticostéroïdes (important surtout dans le cas des molécules synthétiques, p. ex. la dexaméthasone) est le P-glycoprotéine mdrla. Cette protéine est exprimée dans les cellules de la barrière hémato-encéphalique. Elle fonctionne comme une pompe qui limite l'accès des agents xénobiotiques, dont les stéroïdes synthétiques, au cerveau [9].

1.1.5 Rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope par les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes exercent deux types de rétrocontrôle. Le premier type est le rétrocontrôle " proactif ", qui maintient l'activité basale du système corticotrope et contrôle la sensibilité de l'axe corticotrope aux stimuli stressants. Cette action des glucocorticoïdes est transmise par des RM du système limbique et, à des concentrations faibles de glucocorticoïdes circulantes, c'est le type dominant de rétrocontrôle [9].

Le maintien de l'activité basale de l'axe corticotrope par des glucocorticoïdes passe notamment par l'inhibition de l'expression de la CRH et de la VP [24]. En ce qui concerne la CRH, cette inhibition est réalisée plutôt par la régulation de la stabilité de l'ARNm que par l'inhibition de la transcription, alors que l'inhibition de l'expression de la VP passe plutôt par l'inhibition de la transcription [29, 40].

La modulation de la réponse de l'axe corticotrope aux stimuli stressants par des glucocorticoïdes est réalisée par la modulation de la sensibilité des neurones parvocellulaires. Un stimulus stressant mineur, comme l'injection de solution saline, n'entraîne aucun changement dans les niveaux de l'ARNhm de la CRH et de la VP chez les rats ayant des surrénales intactes. Cependant, des expériences sur des rats surrénalectomisés montrent que la même injection de solution saline augmente fortement l'expression de l'ARNhn de la CRH et de la VP en absence de glucocorticoïdes, ce qui indique que l'absence des glucocorticoïdes rend les neurones parvocellulaires beaucoup plus sensibles aux stimuli stressants [41a,b]. Les taux basaux de glucocorticoïdes diminuent donc la sensibilité des neurones parvocellulaires, ce qui sert de mécanisme de protection pour empêcher l'activation inadéquate de l'organisme

par des facteurs de stress mineurs qui surviennent fréquemment dans les conditions physiologiques.

Le second type de rétrocontrôle est “ rétroactif ”, et joue un rôle dans la suppression de l’activation de l’axe corticotrope induit par le stress. Ce type de rétrocontrôle est transmis par les RG des cellules corticotropes de l’hypophyse et du noyau paraventriculaire. Ce rétrocontrôle ne peut être important que quand les taux de CORT sont élevés, puisque l’accès de la CORT au gène POMC de l’hypophyse est diminué par une liaison compétitive aux molécules intracellulaires de CBG [9].

1.2 Développement de l’axe corticotrope

Le développement de l’axe corticotrope, depuis l’âge fœtal, se prolonge jusqu’à l’âge adulte. Il est régi par des facteurs génétiques, qui sont immuables, et par des facteurs environnementaux, qui sont variables. L’environnement de l’âge périnatal façonne le développement de l’axe corticotrope et définit en grande partie son fonctionnement à l’âge adulte. Des facteurs qui peuvent intervenir à l’âge prénatal comprennent la nutrition de la mère, le degré du stress qu’elle subit et les éventuels agents pharmacologiques qui entrent dans son organisme. Dans la période suivant la naissance, les facteurs influençant le développement de l’axe corticotrope comprennent la quantité de nourriture, la température extérieure, le comportement de la mère et les éventuels agents pharmacologiques qui entrent dans l’organisme du jeune enfant.

Nous présentons dans les paragraphes suivants l’ontogenèse périnatale normale des différents composants de l’axe corticotrope chez le rat.

1.2.1 Le système hypothalamo-hypophysaire : NPV et adénohypophyse

Les neurones parvocellulaires du NPV sont identifiables autour du jour fœtal (JF) 16 [42], et commencent à exprimer la CRH dans les 24 heures suivantes, c’est-à-dire le JF 17 [43-45]. Dans l’EM, l’immunoréactivité de type CRH apparaît le JF 17 [44]. L’expression de l’ARNm de la CRH dans le NPV diminue à l’âge prénatal, spécifiquement entre les JF 19 et 21, mais augmente par la suite, et atteint les niveaux adultes dès le jour postnatal (JPN) 4

[43]. La concentration hypothalamique de la CRH augmente de façon constante avec l'âge [46, 47].

La présence des CRH-R1 n'a pas été explorée à l'âge fœtal, mais ils sont sûrement présents dans le cerveau des rats dès le JPN 2, notamment dans l'hippocampe, l'amygdale, le cortex et le NPV [48]. Il n'existe pas de données concernant l'apparition des CRH-R1 dans l'hypophyse. Cependant, il a été établi que la CRH endogène commence à jouer un rôle physiologique dans la régulation de l'ACTH et de la CORT à partir du JF 17 [49]. De plus, l'hypophyse répond à la CRH exogène dès le JF 15 [50, 51]. Ces effets sont certainement transmis par les CRH-R1 de l'hypophyse.

La VP ainsi que son ARNm sont détectés dans le NPV à partir du JF 18 [52-54]. Le contenu en VP du cerveau fœtal augmente graduellement par la suite [55]. Le contenu en VP de l'hypophyse augmente rapidement du JF 19 jusqu'à la naissance [55]. Les cellules à VP apparaissent dans le NPV le JF 18 [55]. Dès le JF 17, les fibres contenant la VP peuvent être observées dans l'EM [55]. L'expression de l'ARNm de la VP dans l'hypothalamus diminue entre le JF 20 et le JPN 1, et augmente par la suite [47]. Les niveaux de la VP, par contre, augmentent de façon relativement constante entre le JF 20 et le JPN 15 [47].

Les récepteurs à VP apparaissent le JF 18 dans l'hypophyse [56], ce qui coïncide avec l'apparition de la VP immunoréactive dans le NPV. Il n'existe pas de données concernant leur évolution, mais il semble probable que l'affinité des récepteurs à VP varie ou que leur nombre change pendant le développement de l'animal [56].

Dans l'hypophyse, la production de l'ARNm du POMC apparaît le JF 13, et la production du peptide dérivé du POMC une journée plus tard [51, 57, 58a,b]. L'expression de l'ARNm du POMC dans l'hypophyse évolue parallèlement avec les variations de l'ARNm de CRH dans l'hypothalamus, et présente un pic le JF 21 [45]. L'expression de l'ARNm du POMC de l'hypophyse antérieure diminue entre les JPN 4 et 7, et augmente constamment par la suite [45]. Pendant les trois premières semaines de la vie, l'expression de l'ARNm de la POMC et la quantité de ses peptides dérivés augmentent avec l'âge dans l'hypophyse [59]. Notamment, la quantité d'ACTH de l'hypophyse est multipliée par quatre entre la naissance et le JPN 21 [60].

Les taux détectables d'ACTH apparaissent dans le sang fœtal le JF 16, et augmentent de façon constante par la suite [49]. Pendant les 14 premiers jours de la vie, les niveaux plasmatiques d'ACTH sont relativement constants, puis ils augmentent [60].

Les récepteurs à ACTH sont probablement présents sur les surrénales dès le JF 17, puisque des anticorps anti-CRH diminuent la concentration de la CORT dans le sang à partir de ce jour [49].

1.2.2 Surrénales et récepteurs aux corticostéroïdes

Les taux détectables de CORT apparaissent dans le sang le JF 16, et augmentent graduellement pendant la gestation, à la fin de laquelle ils sont comparables à ceux des adultes [60, 61]. A la naissance, ces taux diminuent de façon importante, puis augmentent entre le JPN 14 et 21 [60].

Le JPN 14, la corticosurrénale semble être plus sensible à l'ACTH que pendant la première semaine, puisque malgré des taux plasmatiques d'ACTH similaires, les taux de CORT sont plus importants. A l'inverse, la sensibilité de la corticosurrénale diminue le JPN 21, puisque malgré l'augmentation des niveaux d'ACTH, il n'y a pas d'augmentation correspondante des niveaux de CORT [60].

L'expression de l'ARNm des RM apparaît le JF 16 dans l'hypophyse, le JF 17 dans l'hippocampe et le JF 18 dans l'hypothalamus [61]. Les RM sont présents à des concentrations élevées dans l'hippocampe dès la naissance. A partir du JPN 8, l'affinité et la capacité de ces récepteurs ressemblent à celles des récepteurs des adultes [62].

Dans l'hippocampe, l'expression de l'ARNm des RG apparaît le JF 14 [61, 63] et atteint rapidement des niveaux égaux à ceux des adultes [64]. Pendant la première semaine de la vie, la concentration des RG dans l'hippocampe est plus basse (20% des taux adultes), et commence à augmenter par la suite parallèlement aux taux plasmatiques de CORT [64, 65]. Environ 65 à 80 % de la concentration adulte de RG est atteinte à l'âge de 3 semaines [64, 66, 67].

Dans l'hypothalamus, l'expression de l'ARNm des RG apparaît le JF 13 [61], et une immunoréactivité de RG apparaît dans le NPV le JF 18 [68]. La concentration de RG dans l'hypothalamus, où sont localisés les neurones qui sécrètent de la CRH, est extrêmement faible pendant la période néonatale, ce qui rend peu probable qu'ils constituent à cet âge la cible majeure du rétrocontrôle négatif de CORT par les RG [67, 69, 70].

Dans l'hypophyse, l'ARNm des RG est déjà synthétisé le JF 13 [61], et la protéine présente une immunoréactivité le JF 17 [68] et peut-être même avant. Pendant toute la période néonatale, les niveaux des RG dans l'hypophyse restent constants et similaires aux niveaux adultes [71].

Malgré les niveaux de récepteurs relativement similaires aux adultes, au moment du sevrage, la suppression par les glucocorticoïdes de l'axe corticotrope est encore immature chez les rats [72]. A cet âge, l'exposition aux stimuli stressants (éther, isolation de la mère) induit un pic robuste d'ACTH et de CORT plasmatique, mais le retour aux niveaux basaux est plus lent [73-75]. L'incapacité des jeunes animaux à terminer rapidement la réponse surrénale suivant certains facteurs de stress est due à plusieurs causes : (1) immaturité des surrénales, qui entraîne une augmentation ralentie des taux plasmatiques de CORT ; (2) immaturité de l'hypophyse et/ou du cerveau qui entraîne un rétrocontrôle négatif moins efficace par la CORT [74].

1.2.3 La période d'hypo-réponse aux stimuli stressants

L'axe corticotrope du rat fœtal et néonatal est fondamentalement différent de celui de l'adulte, tant sur le plan structural que fonctionnel. Les deux premières semaines postnatales sont caractérisées par une hyporéactivité aux stimuli stressants, ce stade est appelé période d'hypo-réponse aux stimuli stressants (HRS) [76]. Notamment, entre les jours postnataux 4 et 12, les rats répondent peu à nombreux facteurs de stress, comme la chirurgie et la manipulation qui entraînent pourtant une augmentation importante de CORT chez des animaux plus âgés. Chez le rat néonatal, les amplitudes des réponses ACTH et CORT sont limitées, et la cinétique de la réponse est spécifique au type du stress [77]. Le caractère hypo-réactif de l'axe corticotrope est présent à tous les niveaux de l'axe, il existe notamment : (1) une diminution de la sécrétion de l'ACTH dans l'hypophyse, qui est due à plusieurs facteurs : l'immaturité des entrées neurales aux neurones sécrétant la CRH dans le NPV, le contenu faible de peptides dans l'hypophyse ; (2) une diminution de la sensibilité des surrénales à l'ACTH plasmatique ; et (3) une augmentation de l'efficacité du rétrocontrôle négatif de la CORT circulante au niveau de l'hypophyse, due aux caractéristiques des récepteurs aux corticostéroïdes [9].

2 *La régulation du comportement alimentaire*

La prise alimentaire, fonction physiologique primaire de l'individu, répond aux exigences métaboliques de l'organisme. Cependant, si la consommation de l'énergie par l'organisme, et par conséquent ses besoins, sont continus, son réapprovisionnement en énergie s'effectue par la prise de repas, qui est essentiellement périodique. Par conséquent, le corps est dans un état permanent de déséquilibre entre *output* et *input* énergétique, et une homéostasie énergétique peut être atteinte uniquement à moyen ou à long terme. La prise alimentaire est donc un processus complexe, qui est soumis à deux types de régulation : à court et à long terme [78]. De plus, la prise alimentaire peut être modifiée par des facteurs environnementaux permissifs ou aversifs, qui constituent des facteurs de la régulation de prise alimentaire ; elle s'inscrit alors dans un comportement complexe, le comportement alimentaire. La régulation de la prise alimentaire est schématiquement représentée sur la Figure 2, et sera détaillée par la suite.

Le contrôle à court terme de la prise alimentaire permet l'occurrence intermittente des repas, et fonctionne grâce aux signaux de rétrocontrôle à court terme. Ces signaux sont liés à la quantité et à la qualité de la nourriture ingérée et comprennent des informations sensorielles, celles concernant la présence de la nourriture dans les intestins (dont des signaux humoraux comme la cholécystokinine) et des facteurs psychosociaux. Les signaux concernant la nourriture sont transmis dans le noyau du tractus solitaire (NTS) par des fibres afférentes du nerf vague et d'autres afférents qui passent dans la moelle épinière du tractus gastro-intestinal haut [79].

L'initiation d'un repas répond à un contrôle anticipé, puisque cette initiation est corrélée à la prise calorique lors du repas précédent et à la vitesse de l'utilisation de l'énergie depuis ce repas. Un repas est initié directement par une chute discrète des taux plasmatiques de glucose, qui est liée à une baisse du contenu du tract gastro-intestinal et aux rythmes endogènes. Cependant, les informations externes, notamment la vision et l'odeur de la nourriture, peuvent influencer le déclenchement d'un repas. Ces informations appartiennent aux régulateurs environnementaux du comportement alimentaire. Pendant le repas, un rassasiement survient graduellement, et stoppe finalement la prise alimentaire. Il est dû à des stimuli de diverses origines. Les signaux de la phase oro-sensorielle (odeur et goût de la nourriture) jouent un rôle. Notamment, l'expérience acquise lors des précédentes ingestions

ou d'origine génétique peut également arrêter la prise alimentaire en cas de dégoût. Le rassasiement intervient alors que les besoins énergétiques ne sont pas couverts. La stimulation mécanique et chimique de l'estomac et de l'intestin grêle pendant l'ingestion de la nourriture, et les changements du métabolisme énergétique du foie, ne sont donc pas les facteurs majeurs de la survenue du rassasiement (lors du repas), mais ils sont les acteurs majeurs de la satiété (entre les repas) [78-81].

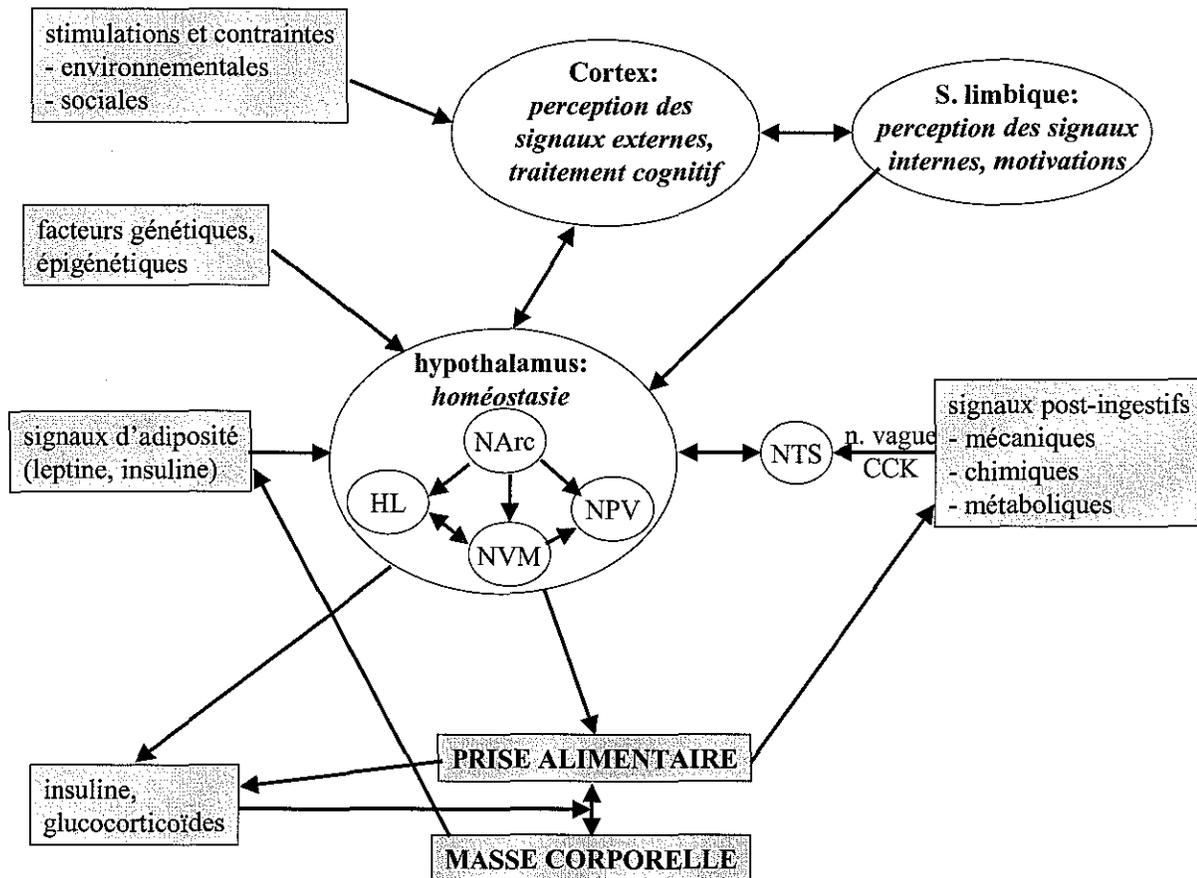


Figure 2. Représentation schématique de la régulation du comportement alimentaire (d'après Claude Bulet et [78,79]). Abréviations : HL : hypothalamus latéral, NArC : noyau arqué, NPV : noyau paraventriculaire, NVM : noyau ventromédian, n. vague : nerf vague, CCK : cholécystokinine.

La régulation de la prise alimentaire à long terme, qui permet d'atteindre une homéostasie énergétique (stabilité de la quantité de l'énergie du corps stockée sous forme de graisse) fonctionne grâce aux signaux de rétrocontrôle à long terme, qui sont des signaux d'adiposité. L'information de l'adiposité corporelle est transmise par deux hormones, l'insuline et la leptine. Elles ont toutes les deux des caractéristiques qui leur permettent de fonctionner en tant que signaux d'adiposité, notamment : elles sont présentes dans le sang à

des niveaux proportionnels à la quantité de graisse corporelle [82, 83], et elles entrent dans le système nerveux central en proportion de leurs taux plasmatiques [84, 85]. On considère actuellement que les deux molécules agissent en synergie : la leptine initierait les voies de signalisation JAK-2 et STAT-3 mais n'entraîne à elle seule qu'une faible activation des étapes ultérieures de déroulement de cette voie ; à l'inverse l'insuline ne serait pas capable d'activer JAK-2 et STAT-3, mais sa présence serait indispensable pour l'activation complète des voies de signalisation initiées par la leptine [86].

L'information concernant les signaux d'adiposité est traitée par un réseau de noyaux hypothalamiques, puis elle est transmise par des voies centrales autonomes au tronc cérébral caudal, notamment au NTS et au noyau dorsomoteur du nerf vague, où arrivent également les signaux de rassasiement. Les signaux à court et à long terme sont intégrés dans ces noyaux qui génèrent une réponse nerveuse et neuroendocrinienne déterminant la taille et le nombre des repas [79, 80, 87]. Il semble que c'est surtout le rassasiement (taille de repas) plutôt que l'initiation de repas qui peut être influencé par des signaux d'adiposité dans le but de maintenir une homéostasie énergétique.

La mise en jeu centrale des signaux d'adiposité dans les réseaux hypothalamiques est complexe, puisque leurs récepteurs sont présents sur des neurones de plusieurs noyaux interconnectés [80]. Il est généralement admis que c'est principalement dans le NArc que l'information transportée par l'insuline et la leptine est "captée et traduite". Ce point de vue est supporté par le fait que ces hormones entrent dans l'hypothalamus médiobasal par la barrière hémato-encéphalique modifiée du NArc-EM ; que leur injection dans le NArc induit une hypophagie et finalement, que leurs récepteurs sont abondants dans ce noyau [88].

Du fait de l'importance du NArc dans la réception des signaux d'adiposité, on admet que ce noyau a un rôle crucial dans le réseau de noyaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire. Les NArc seraient à l'origine des signaux primaires orexigènes ou anorexigènes, qui arriveraient et seraient intégrés dans d'autres noyaux (noyau ventromédian de l'hypothalamus : NVM, noyau dorsomédian de l'hypothalamus : NDM, hypothalamus latéral : HL) et la réponse finale est générée principalement dans le NPV, l'HL, le NDM et le NVM [87]. De nombreuses molécules (neuropeptides et neurotransmetteurs) sont impliquées dans la mise en jeu de ces réseaux, et leurs interactions, qui ne sont pas toutes bien connues, sont très complexes. Les principales molécules impliquées dans la régulation hypothalamique de la prise alimentaire sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Principales molécules jouant un rôle dans la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique : sites de production, de libération/action, récepteurs et régulation par des signaux d'adiposité. Sources : [79, 81, 87-93]. Régions de l'hypothalamus : HD : hypothalamus dorsal , HL : hypothalamus latéral, HPF : hypothalamus périfornical, NArc : noyau (n.) arqué, NDM : n. dorsomédian, NPV : n. paraventriculaire, NSO : n. supraoptique, NVM : n. ventromédian.

Molécules	Sites de production	Sites de libération et/ou d'action	Récepteurs	Régulation par signaux d'adiposité
OREXIGÈNES				
NPY	NArc, NDM, tronc cérébral	NPV, NDM, NArc	Y ₁ -R, Y ₅ -R	↓
AGRP	NArc	NPV, NDM	antagoniste de MC3-R, MC4-R	↓
MCH	HL, <i>zona incerta</i>	NPV	MCH-R1 ou MCH-R2 ?	↓
hypocrétines/orexines	HD, HL	NPV, HL, HPF	orexin-2-R	↓
galanine	NArc, NDM, NPV	NPV, HL, NVM	GAL-R1, R2 ou R3 ?	?
β-endorphine	NArc	NPV, NVM, NDM	μ-opioïde-R	?
dynorphine A	NArc, NPV		κ-opioïde-R	?
noradrénaline	tronc cérébral	NPV	α2-R	↓
glutamate	nombreux sites hypothalamiques	HL	NMDA-R	?
GABA	nombreux sites hypothalamiques	NPV, NVM, NDM	GABA _A -R	?
ANOREXIGÈNES				
α-MSH	nombreux sites hypothalamiques	NPV, NVM, NDM	MC4-R (ou MC3-R)	↑
CRH	NPV	NPV, NVM, NArc	CRH-R1, CRH-R2	(↑)
urocortine	HL, NSO	NVM	CRH-R2	?
CART	NArc, NPV, NSO, NVM	nombreux sites hypothalamiques	non identifié	↑
GLP-1 +	nombreux sites hypothalamiques, NTS	NPV, NArc	GLP-1-R	?
neurotensine	NArc, NPV, NDM	NPV	NT-R 1, 2 ou 3 ?	?
sérotonine	tronc cérébral	NPV, HL, NVM	5HT-2C, 5HT1A	?

Les molécules du réseau hypothalamique de la régulation du comportement alimentaire, qui sont principalement étudiées depuis ces dix dernières années, sont des neuropeptides, mais le rôle joué par certains neurotransmetteurs classiques reste important. Les actions de ces derniers peuvent être directes ou indirectes par la stimulation de la

libération de neuropeptides. Ainsi, la stimulation des récepteurs α_2 du NPV par la noradrénaline désinhibe directement les fibres descendantes du NPV dans le tronc cérébral caudal [92]. La sérotonine, quant à elle, stimule dans le NPV la libération de la CRH, qui est anorexigène [94, 95].

Il faut actuellement admettre que le schéma organisationnel de régulation du comportement alimentaire est loin d'être établi. En effet, il faut mettre en place des réseaux interconnectés et non pas une hiérarchie ; le receveur du signal, loin d'être passif, peut modifier l'émetteur du signal. Ainsi il est possible d'identifier les connexions *directes* de ce réseau qui peuvent amplifier l'effet de la molécule originale. Par exemple, la CART (anorexigène) stimule la sécrétion de la CRH (anorexigène) dans le NPV [96]. Le neuropeptide Y (NPY ; orexigène) stimule la sécrétion de la galanine (orexigène) dans le NPV, qui stimule la libération de la β -endorphine (orexigène) dans le NArc [87]. Il existe d'autres connexions où un effet inverse se produit, la molécule dont la sécrétion est stimulée freine l'effet de la molécule originale. Ainsi, le NPY (orexigène) stimule la sécrétion de la CRH (anorexigène) dans le NPV [97-99].

3 *Axe corticotrope et comportement*

3.1 Axe corticotrope et comportement alimentaire

Il a été démontré que l'administration de certaines molécules jouant un rôle dans le fonctionnement de l'axe corticotrope (CRH, ACTH, CORT) affecte le comportement alimentaire. Cependant, la signification de ces résultats n'est souvent pas claire : dans des conditions physiologiques, les récepteurs où agissent ces molécules ont des ligands naturels apparentés (CRH – urocortine, ACTH – α -MSH), et ces molécules ne font pas partie de l'axe corticotrope. De plus, une partie de l'effet de la CRH sur la prise alimentaire n'est pas due à ses actions corticotropes [100]. C'est pourquoi nous présentons un résumé des effets des seules molécules qui semblent affecter la prise alimentaire au moins en partie par la voie corticotrope : la CRH et la CORT.

3.1.1 La famille CRH des peptides

De nombreuses études ont démontré que les systèmes à CRH du cerveau jouent un rôle dans la régulation de l'appétit et de la balance d'énergie. L'administration centrale de la CRH induit une diminution de la prise alimentaire et de la prise de poids (revue [101]). Cependant, les souris knock-out pour les gènes de la CRH ou du CRH-R1 ont une prise alimentaire normale, ce qui peut être dû à une adaptation du cerveau [102].

Les expériences conduites chez le rat suggèrent que le site où la CRH exerce son effet anorexique est le NPV, puisque c'est seulement l'injection dans ce site qui induit une hypophagie, contrairement aux effets d'injections faites dans l'HL, le NVM, le globus pallidus ou le striatum [103].

L'action anorexigène de la CRH est en partie indépendante de l'hypophyse et de la surrénale, puisque la dexaméthasone, qui inhibe la sécrétion de l'ACTH et donc des glucocorticoïdes, n'inhibe pas l'action anorexigène de la CRH [100]. Cependant, la CRH pourrait affecter le comportement ingestif indirectement – par la stimulation de la sécrétion de l'axe corticotrope –, puisque les glucocorticoïdes sont des agents orexigènes (voir plus bas).

L'identité des récepteurs qui transmettent l'effet anorexigène de la CRH n'est pas tout à fait établie. L'axe corticotrope des souris *knock-out* pour le gène du récepteur CRH-R1 n'est pas fonctionnel, mais la prise alimentaire journalière de ces souris est similaire au type sauvage [104]. Cependant, le rythme circadien de ces souris est perturbé, mais se normalise avec une administration de CORT [104]. Ceci suggère que les récepteurs CRH-R1 agissent sur le comportement alimentaire par l'intermédiaire des glucocorticoïdes. Par contre, les récepteurs CRH-R2 semblent agir plus directement sur la prise alimentaire : bien que la consommation journalière des souris *knock-out* pour le gène du récepteur CRH-R2 soit normale, l'injection de l'urocortine (peptide de la famille CRH) ainsi que l'isolation sociale entraînent une plus faible réponse anorexigène que chez le type sauvage [105].

L'action de nombreux systèmes neurochimiques sur le comportement alimentaire est dépendante de la CRH. Les propriétés anorexigènes et thermogéniques des agonistes sérotoninergiques dépendent de la CRH du cerveau, ce qui rend probable l'interaction de la CRH et de la sérotonine dans le contrôle de l'équilibre énergétique [106, 107]. Le fait que l'injection centrale de la CRH inhibe l'effet orexigène du NPY [108]; [99] et d'autres résultats suggèrent que l'équilibre entre les fonctions neuronales de la CRH et du NPY joue un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire [101]. Finalement, une interaction

entre la leptine et la CRH a été démontrée, puisque l'injection de la leptine stimule la sécrétion de la CRH dans l'hypothalamus et dans le système limbique [109, 110]. Cependant, d'autres études ont démontré que la leptine inhibe l'activation du système CRH hypophysiotrope et l'axe corticotrope [111], ce qui suggère que les actions centrales de la leptine sur les neurones à CRH contrôlant la prise alimentaire sont dissociables des interactions périphériques dans le contrôle de l'activation de l'axe corticotrope [101].

3.1.2 Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes participent à la régulation de la prise alimentaire, ce qui est bien illustré par le fait que les animaux surrénalectomisés ont une consommation journalière diminuée de 20 à 30 %. Chez les rats surrénalectomisés nourris par des macronutriments purs, la consommation de glucides et de lipides est généralement diminuée, et on observe des changements variables de la prise de protéines [10].

Les RM, qui répondent à des taux sanguins bas de glucocorticoïdes, sont à l'origine de la stimulation de la prise et du dépôt des lipides, et cette action est exprimée tout le long du cycle nycthéral. Ceci est démontré par le fait que les agonistes de RM sont capables de restaurer une prise alimentaire et un dépôt de graisse normales chez les rats surrénalectomisés [112-114]. Les RM stimulant de façon constante la prise des lipides sont situés majoritairement dans le NPV, puisque l'implantation des agonistes de RM dans ce noyau restaure la prise de lipides des rats surrénalectomisés durant tout le cycle nycthéral, et cette réponse est bloquée par l'administration d'une antagoniste de RM dans ce noyau [115].

Les RG répondent à des niveaux moyens ou élevés de glucocorticoïdes, ainsi ils fonctionnent pendant le pic circadien de ces stéroïdes, au début de la période active, quand l'ingestion et le métabolisme des glucides sont les plus importants. L'activation des RG durant cette période joue un rôle important dans le maintien des réserves de glucides. Ceci est démontré par le fait que l'administration périphérique de la CORT ou d'un agoniste de RG au début de la période active stimule fortement la prise des glucides chez les rats [116]. Cette action n'apparaît pas si les RG sont stimulés à la fin de la période active, ou pendant la période inactive [113, 117]. Les RG induisant l'ingestion des glucides au début de la période active sont situés majoritairement dans le NPV, puisque l'implantation des antagonistes RG dans ce noyau inhibe complètement ce comportement [115, 117]. Des récepteurs situés dans

d'autres régions du cerveau peuvent également participer dans l'action des glucocorticoïdes, puisque les rats surrénalectomisés et avec des lésions de NPV répondent aux effets des glucocorticoïdes sur la prise alimentaire [118, 119].

Les glucocorticoïdes jouent un rôle dans la transmission des effets d'autres molécules agissant sur le comportement alimentaire. Notamment, ils jouent un rôle permissif dans les actions hyperphagiques de la NPY [120, 121] et de la noradrénaline [122]. C'est les RG du NPV qui participent à cet effet [123].

3.1.3 Stress et comportement alimentaire

Plusieurs composants de l'axe corticotrope agissant sur le comportement alimentaire, il n'est pas étonnant que chez le sujet humain et chez l'animal, le stress puisse induire une modification de la prise alimentaire. Ces dérèglements se traduisent soit par des actes consommateurs inappropriés, soit par des phases transitoires d'anorexie et d'hypophagie.

Chez les animaux, une hyperphagie est induite par les modèles de stress aigus faibles comme le " *tail pinch* " (qui " ennuie " l'animal par des pincements de la queue [124]) et la manipulation [125], ainsi que par le stress chronique de l'isolation sociale [124]. La réponse hyperphagique au stress dépend de l'intégrité fonctionnelle non seulement du système CRH-ergique [126] mais aussi des systèmes opioïdérique [127] et dopaminergique [128].

Des facteurs de stress plus sévères induisent une réponse hypophagique chez les animaux. Ces stimuli stressants comprennent l'opération [129], la contention [130-133], le stress émotionnel [134], l'immobilisation [135], et le bruit irrégulier [136]. La réponse hypophagique dépend des systèmes CRH-ergique [132], sérotoninergique [137], et des mélanocortines [138] dans le cas de la contention et de l'immobilisation.

Chez le sujet humain, il existe des différences individuelles très importantes concernant la réponse ingestive à un stress. Il est donc difficile de trouver un effet général du stress sur le comportement alimentaire [124]. Cependant, le comportement alimentaire basal des individus permet de faire des prédictions concernant leurs réactions face à une situation de stress. Notamment, les personnes qui sont au régime, ou qui sont des " mangeurs restreints " (ne mangeant jamais à leur faim) montrent une hyperphagie face au stress, alors que le stress ne change pas la prise alimentaire des gens qui n'ont pas un comportement alimentaire " restreint " [124, 139-143]. Dans quelques cas, les individus " non-restreints " peuvent aussi répondre au stress par une hypophagie [124, 139, 142]. Récemment, il a été

démontré que l'hyperréactivité du cortisol à un stimulus stressant est accompagnée d'une hyperphagie, alors que l'hyporéactivité de cortisol est plutôt accompagnée d'une hypophagie [144].

3.2 Axe corticotrope et anxiété

De nombreuses études ont montré que la CRH joue un rôle dans les aspects anxiogènes du stress. Le stress active la transcription de la CRH non seulement dans le NPV (qui active l'axe corticotrope), mais aussi dans l'amygdale où la CRH contribue à la coordination des réactions comportementales au stress [13, 145]. L'amygdale semble être le centre majeur induisant les réactions comportementales au stress, puisque ses lésions, et non pas celles du NPV, perturbent la réponse comportementale au stress [146].

L'administration de la CRH dans les ventricules cérébraux augmente la fréquence des comportements considérés comme " anxieux " ou " induits par la peur " chez le rat. Par exemple, la CRH augmente la fréquence du toilettage et de l'immobilisation, mais diminue les redressements et le nombre d'approches à un morceau de nourriture dans un nouvel environnement, augmente le sursaut au son, diminue l'interaction sociale [147-151]. Ces effets sont inhibés par l'injection des antagonistes de CRH dans l'amygdale ou dans les ventricules cérébraux, mais ne le sont pas par le blocage de l'axe corticotrope avec la dexaméthasone [100, 149, 150, 152]. L'effet anxiogène de la CRH est donc central et non-corticotrope. L'effet de la CRH semble être transmis par le récepteur CRH-R1, puisqu'il peut être inhibé avec des antagonistes [153] et avec des oligodésoxynucléotides antisens [154] ; de plus, les souris *knockout* pour le gène du récepteur CRH-R1 ont une anxiété diminuée [155, 156].

L'expression de la CRH dans l'amygdale est stimulée par des glucocorticoïdes dans le noyau central de l'amygdale chez le rat [13]. Cette stimulation entraîne une augmentation des comportements anxieux, notamment l'immobilisation induite par la peur [13]. Les glucocorticoïdes, qui agissent par un rétrocontrôle négatif sur le NPV pour terminer la réponse de l'axe corticotrope aux facteurs de stress, favorisent donc au contraire l'activation des comportements anxiogènes dans l'amygdale.

La CRH et les glucocorticoïdes pouvant augmenter l'anxiété chez les animaux, la recherche clinique s'est intéressée aux caractéristiques des composants de l'axe corticotrope dans les maladies psychiatriques humaines liées à l'anxiété.

3.3 Troubles psychologiques humains liés à l'axe corticotrope

Chez l'homme, l'origine de nombreuses maladies psychiatriques et de maladies du comportement alimentaire a été liée au stress et à l'axe corticotrope.

3.3.1 Troubles du comportement alimentaire

Les troubles du comportement alimentaire constituent un groupe de maladies humaines où le stress et l'axe corticotrope jouent un rôle important. Ces troubles apparaissent généralement pendant l'adolescence et affectent plus de femmes que d'hommes. Souvent, un événement stressant [157] ou un régime [158] précède leur apparition. Ces troubles peuvent être divisés en trois catégories majeures : l'anorexie mentale, la boulimie "nerveuse" et le trouble compulsif boulimique.

L'anorexie mentale [159] se caractérise par un désir pathologique de garder un poids corporel inférieur au 85% du normal (pour l'âge et la taille), une peur de grossir et une perception irréaliste du poids corporel. Il s'ensuit un comportement d'évitement partiel ou total de nourriture qui peut alterner avec des épisodes boulimiques.

La boulimie nerveuse [159] et le trouble compulsif boulimique [160] se caractérisent par des épisodes de boulimie, qui se reconnaissent par une consommation excessive d'aliments, absorbés rapidement et sans pause, pendant laquelle le malade perd tout contrôle sur la prise de nourriture. Dans le cas de la boulimie nerveuse, les accès de boulimie sont suivis par des comportements de compensation inappropriés pour prévenir la prise de poids, comme l'induction de vomissement, l'utilisation de laxatifs, de diurétiques, le jeûne ou l'exercice physique excessif.

Les troubles du comportement alimentaire sont accompagnés de nombreux changements endocriniens qui montrent des traits similaires à ceux observés dans la dépression et d'autres maladies liées à l'anxiété [161]. Notamment, des malades anorexiques et boulimiques sont caractérisés par un dérèglement des systèmes monoaminergiques du cerveau [161, 162]. L'axe corticotrope de ces malades se trouve également modifié : chez les anorexiques on trouve des niveaux augmentés de CRH et de cortisol [163, 164], chez les boulimiques, des niveaux élevés d'ACTH et de cortisol [165]. Bien que les données suggèrent

que l'hyperactivité de l'axe corticotrope soit secondaire au déficit de prise alimentaire, il est probable qu'elle contribue à un cercle vicieux perpétuant la maigreur [164].

Les causes des troubles du comportement alimentaire ne sont pas bien connues, mais il est reconnu qu'elles comprennent des facteurs génétiques, neurochimiques, psychodéveloppementaux et socioculturels [162]. Il est important de noter qu'un stress précoce sous forme d'abus émotionnel, physique et/ou sexuel pendant l'enfance augmente fortement le risque de l'apparition de ces troubles [166].

L'obésité peut également être entraînée par un trouble du comportement alimentaire ; cependant ses causes peuvent être multiples et sont souvent difficiles à déterminer. Des déficiences génétiques (par exemple, du système de la leptine), des causes endocriniennes et neuroendocriniennes entrent en jeu, mais l'exposition à un régime riche en graisse prédispose de nombreux individus à l'obésité [167]. Certaines formes d'obésité, de types "central" et/ou "viscéral", se caractérisent par un axe corticotrope dérégulé, qui implique une hypercortisolémie, et une réaction de cortisol exagérée aux stimuli stressants et à l'ACTH [168, 169].

Les facteurs périnataux ont également été impliqués dans la pathogenèse de l'obésité centrale. Ainsi des enfants qui sont petits pour leur âge gestationnel développent souvent ce type d'obésité à l'âge adulte [168].

3.3.2 Dépression, maladies affectives, d'anxiété

La dépression a été traditionnellement liée au dérèglement de systèmes monoaminergiques, notamment à la diminution des niveaux de la sérotonine, de la noradrénaline, et/ou de la dopamine dans le cerveau. En conséquence, son traitement médicamenteux visait le rééquilibrage de ces systèmes (revue [170]). Bien que l'efficacité de ces médicaments ne soit pas en question, il semble que la déficience des systèmes monoaminergiques ne soit pas la cause primaire de la dépression [171].

Actuellement, une altération de la régulation de l'axe corticotrope est mise en cause dans la genèse de la dépression et des maladies psychiatriques apparentées, y compris les maladies d'anxiété. Une multitude de changements de l'axe corticotrope a été démontrée, dont une hypercortisolémie basale, une suppression inappropriée de l'axe corticotrope par la corticostéroïde synthétique dexaméthasone, et une sécrétion d'ACTH augmentée après

l'injection de la dexaméthasone et de la CRH (revue [172]). Ces changements indiquent que la cause primaire de la dépression pourrait être une augmentation des niveaux de CRH dans l'hypothalamus induisant une *down-regulation* des récepteurs à CRH dans l'hypophyse [173]. L'augmentation des niveaux de CRH serait due à la diminution du rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes [172]. Cette diminution est vraisemblablement due à la conjonction de l'exposition chronique au stress avec une vulnérabilité constitutionnelle au stress. Cette vulnérabilité peut être d'origine génétique ou induite par des stress néonataux, car il a été démontré que l'abus à l'âge précoce induit une augmentation de l'incidence d'anxiété et de la dépression [174]. Par conséquent, des nouveaux modèles animaux de la dépression sont caractérisés par une hyperactivité de l'axe corticotrope, génétiquement ou suite à un stress précoce, par exemple, la séparation maternelle [173, 175].

3.3.3 *Schizophrénie*

Le dérèglement des systèmes de dopamine et de sérotonine est traditionnellement considérée comme la cause de la schizophrénie [176-178]. Cependant, à l'origine de cette maladie on trouve non seulement un génotype vulnérable mais aussi des situations stressantes subies à un âge précoce. Les facteurs de stress qui augmentent l'incidence de la schizophrénie comprennent divers types de stress prénataux et néonataux, induisant des problèmes du développement précoce, comme l'exposition à une épidémie de grippe [179-181], la pauvreté, la mauvaise nutrition et la dépression de la mère pendant la grossesse [182-185] (revue [186]). Les modèles animaux utilisés dans la recherche sur la schizophrénie comprennent donc le stress périnatal, comme la séparation maternelle et l'isolation sociale [186].

4 *Manipulations périnatales*

La plupart des espèces mammifères sont très sensibles aux effets des manipulations environnementales précoces. Des conséquences aiguës et à long terme de ces manipulations sur les systèmes endocriniens, le système corticotrope en particulier, ainsi que sur le comportement des animaux ont été étudiées systématiquement depuis les années 1950.

4.1 Handling (manipulation) néonatal(e)

Chez le rat, un des premiers procédés de manipulation environnementale extensivement étudié et encore utilisé de nos jours a été introduit en 1956 par Levine et ses collaborateurs [187]. Il consiste à séparer brièvement (15 minutes) et quotidiennement des petits de la mère pendant la période de la lactation. Cette procédure est généralement appelée *handling* (manipulation) néonatal(e), bien qu'elle ne comprenne que peu de manipulation. Le *handling* néonatal produit des effets neuroendocriniens et comportementaux relativement consistants chez l'animal adulte, et contrairement à la plupart des perturbations périnatales, ses effets sont plutôt bénéfiques. Notamment, les animaux qui ont subi un *handling* à l'âge précoce ont un axe corticotrope moins réactif au stress que les animaux contrôles : leur libération de CRH, l'élévation des taux sanguins de l'ACTH et de la CORT est moins importante ; le rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope par la CORT est plus efficace, probablement grâce aux concentrations élevées des RG dans l'hippocampe [2]. Ces animaux sont également moins anxieux dans les situations induisant la peur [188]. De plus, ces animaux vieillissent mieux que les animaux témoins : ils sont protégés par le *handling* des dysfonctionnements cognitifs et neuroendocriniens liés à l'âge [189].

4.2 Stress prénatal

Une autre manipulation bien étudiée chez le rat est le stress de la mère pendant la gestation, appelé aussi stress prénatal, qui a des effets souvent opposés à ceux du *handling*. Ce stress peut être réalisé en soumettant la mère à un stimulus stressant répété, comme une contention quotidienne dans un tube en plastique [190, 191]. Les rats issus de mères qui ont subi un stress pendant la gestation réagissent à l'âge adulte aux stimuli stressants avec une augmentation des taux sanguins de CORT plus importante et plus prolongée que les animaux témoins ; le rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope est moins efficace, ce qui est probablement dû à la diminution de la concentration des RG dans l'hippocampe [192-194]. Les animaux stressés à l'âge prénatal sont aussi plus anxieux dans les situations pouvant induire la peur [195-197] ; de plus, le comportement sexuel des mâles stressés à l'âge prénatal est démasculinisé [198]. Ces animaux sont touchés plus tôt par un déficit de mémoire dû au

vieillessement, ce qui est vraisemblablement dû à l'exposition accrue de l'hippocampe à la CORT [189].

4.3 Séparation maternelle de 24 heures

Le stress prénatal qui agit sur le cerveau quand il est en développement induit les changements importants de la physiologie de l'animal, qui persistent jusqu'à l'âge adulte. Le développement intensif du cerveau se poursuit dans la période suivant immédiatement la naissance. Un stress subi pendant cette période peut donc également induire des changements physiologiques à long terme, qui sont qualitativement différents des effets du stress prénatal. Une procédure de stress néonatal particulièrement étudié est séparation maternelle (*maternal deprivation*), qui consiste à séparer des petits de leur mère pendant une période plus ou moins prolongée. La séparation peut être unique ou répétée, et peut durer de 1 à 24 heures. C'est un modèle qui comprend plusieurs facteurs stressants : manque de nourriture, d'eau, de la présence et du comportement maternels. Les effets de la séparation maternelle sont différents selon sa durée, sa fréquence, et l'âge auquel elle est subie, mais quelle que soit la procédure utilisée, ils subsistent jusqu'à l'âge adulte.

La procédure de la séparation maternelle de 24 heures est infligée aux ratons à des périodes bien définies du développement du système nerveux central, et permet ainsi de discerner les effets du stress subi à des âges différents. Elle consiste habituellement à enlever la mère de la cage et à mettre la cage avec des ratons pour 24 heures sur une plaque chauffante ou dans une couveuse, afin de maintenir leur température corporelle dans les limites normales, puisque leur système thermorégulateur n'est pas complètement développé avant le sevrage [199].

4.3.1 Effets immédiats

Les effets immédiats de la séparation maternelle sur les éléments de l'axe corticotrope chez le rat sont représentés dans le Tableau 2. Différentes études ont montré différents changements, mais on observe généralement une activation de l'axe corticotrope,

Tableau 2. Etat de l'axe corticotrope après 24 heures de séparation maternelle. LE : Long-Evans, LExSD : hybride Long-Evans et Sprague-Dawley, SD : Sprague-Dawley, W : Wistar. Références [200-222]

jour de la séparation (postnatal)	3-4	5-6	7-9	10-12	14-16	17-19	20-22
souche	SDxLE	LE, SD, SDxLE, W	SD, SDxLE, W	LE, SD, SDxLE	LE, SDxLE	SD, SDxLE	LE, SDxLE
ARNm de <i>c-fos</i> dans le NPV		=		↑		=	↑
ARNm de NGFI-B dans le NPV				↑			↑
ARNhn de CRH dans le NPV		=		=		=	
ARNm de CRH dans le NPV		↓, =	=	↓, =		=	↓
ARNm de VP dans le NPV		=		=		=	
CRH dans l'EM				↓		=	
récepteurs de CRH dans l'hypophyse				=		↓	
ACTH plasmatique	=	(↑), =	=	(↑), =	↑	↑	↑
CORT plasmatique	=	↑, =	↑, (=)	↑, (=)	↑, (=)	↑, =	↑
CBG plasmatique		↓			↓		
sensibilité des surrénales à l'ACTH	=, ↑		↑	↑	↑		
ARNm de RG dans l'hippocampe		= CA1, 3, 4, DG	↓ CA1 ; = CA1, 3, 4, DG	↓ CA1 ; = CA1, 3, 4, DG			
ARNm de RM dans hippocampe		= CA1, 3, 4, DG	↓ CA1 = CA3, 4, DG	↓ CA1 = CA3, 4, DG			
ratio de ARNm RM:RG dans le hippocampe (CA1)		=	↓	↓			
ARNm de RG dans le NPV			↓	↓			

dont l'élément le plus consistant est l'augmentation des taux plasmatiques de CORT. Cette activation apparaît systématiquement à partir du JPN 7, ce qui implique que la séparation maternelle est un stress très fort, puisqu'il est capable de surmonter l'hyposensibilité des rats

au stress pendant la période durant laquelle ils ne réagissent qu'aux facteurs de stress plus forts (JPN 4-12).

L'augmentation de l'expression de l'ARNm des gènes immédiats précoces (*c-fos*, *NGFI-B*) dans le NPV indique l'activation de l'axe corticotrope à ce niveau [200]. Cependant, les études qui ont mesuré l'expression de l'ARNm de la CRH ou de la VP dans le NPV ne mettent en évidence aucune augmentation [200-205]. Il est cependant possible que les quantités de CRH ou de VP atteignant l'hypophyse soient augmentées sans augmentation de la transcription : dans un premier temps, par la libération accrue de la CRH/VP par les terminaisons nerveuses de l'EM, et dans un deuxième temps, par l'augmentation de la traduction des ARNm induisant l'augmentation de la synthèse de ces hormones. A des âges différents, l'importance relative de ces deux mécanismes est différente : le JPN 10, la diminution des concentrations de la CRH dans l'EM indique la libération de ce peptide par des terminaisons nerveuses ; une telle diminution n'apparaît pas le JPN 18, probablement grâce à l'évolution des neurones du NPV, qui peuvent alors assurer une production soutenue de la CRH [206]. En conclusion, il n'est pas établi si l'augmentation des taux plasmatiques de CORT est précédée à tous les âges, ou même à certains âges, par une augmentation de la libération de la CRH ou de la VP.

Les taux de l'ACTH plasmatique après une séparation maternelle de 24 heures sont normaux ou légèrement élevés selon les études : en règle générale, une séparation subie au début de la période néonatale et pendant la période HRS n'augmente pas ou peu l'ACTH sanguin, cependant, à partir du JPN 14, l'augmentation est démontrée [207, 208].

Bien qu'il n'y ait pas d'élévation des taux sanguins d'ACTH, les niveaux de CORT sont légèrement ou fortement élevés après une séparation maternelle à partir du JPN 7 selon la plupart des études [200-212, 214-216, 218, 219, 222, 223, 224]. De plus, les taux sanguins de CORT après une injection d'ACTH s'élèvent plus chez les rats séparés de leur mère que chez les rats témoins [214, 215, 217]. En conclusion, l'élévation des taux plasmatiques de CORT après une séparation maternelle peut être due à l'augmentation des taux plasmatiques d'ACTH et/ou à l'augmentation de la sensibilité des surrénales à l'ACTH.

L'augmentation des taux plasmatiques de la CORT met en jeu un rétrocontrôle négatif par des RG dans plusieurs régions liées à l'axe corticotrope, dont l'hippocampe. Quand la séparation maternelle est réalisée le JPN 5, elle induit une faible augmentation des niveaux de CORT, et l'expression des ARNm des RG hippocampiques ne change pas [205].

Cependant, lorsque la séparation maternelle est réalisée après le JPN 8, elle induit une forte réponse de CORT, et on observe une diminution de l'expression des ARNm de RM et de RG dans l'hippocampe (surtout dans la région CA1) et dans le NPV [204, 205]. Ces changements peuvent perdurer longtemps après la fin du stress, et peuvent donc influencer la réponse corticotrope de ces animaux.

L'axe corticotrope activé des rats séparés de leur mère répond différemment aux stimuli stressants que celui des rats témoins (Tableau 3). Cependant, le changement de la réponse dépend non seulement de l'âge, mais aussi du type de stimulus stressant. La plus robuste modification induite par la séparation maternelle se produit pendant la période HRS. Des rats séparés de leur mère pendant cette période réagissent à des stimuli stressants avec une réponse endocrinienne (ACTH, CORT), alors que les mêmes stimuli n'induisent aucune réponse chez les rats témoins (injection de soluté physiologique [202, 203, 213, 215]; contention [200]). La réponse endocrinienne à d'autres stimuli stressants – qui induisent une réponse même chez les témoins – est également amplifiée (froid [201]). En dehors de la période HRS, l'effet de la séparation maternelle est plus équivoque : elle a plutôt tendance à réduire la réponse ACTH aux stimuli stressants [202, 203], alors que la réponse CORT ne change pas ou est amplifiée [200, 202, 203].

Le mécanisme induisant une amplification de la réponse endocrinienne aux stimuli stressants après une séparation maternelle pendant la période HRS n'est pas clairement identifié. Il ne semble pas être lié à la sécrétion de la CRH ou de la VP, puisque l'expression de l'ARNm de ces peptides n'est pas augmentée chez les rats séparés de la mère [200, 202, 203].

En dehors de ses effets sur l'axe corticotrope, la séparation maternelle agit sur d'autres systèmes neuronaux. Notamment, la sécrétion de l'hormone de croissance diminue, ainsi que l'activité de l'ornithine décarboxylase, qui est un index sensible de la croissance et de la différenciation [212]. L'activité du système sérotoninergique augmente : une augmentation des niveaux de la sérotonine et du 5-HIAA est observée dans le tronc cérébral [226].

Les différents changements des systèmes neuronaux décrits sont induits par différents aspects du stress complexe qu'est la séparation maternelle. Cette question a été étudiée par le remplacement artificiel des manipulations tactiles ou nutritionnelles maternelles. Le léchage ano-génital est nécessaire aux jeunes rats pour les faire uriner. Son imitation en caressant les rats séparés de la mère avec une brosse dans la région ano-

génitale a empêché les changements des taux plasmatiques d'ACTH, de GH et d'ornithine décarboxylase [204, 212, 219, 227]. Cette manipulation ne normalise cependant pas les niveaux de CORT. En combinant les caresses ano-génitales avec la nutrition artificielle des animaux, les taux plasmatiques de CORT restaient aux niveaux normaux [204, 219].

Tableau 3. Réponse de l'axe corticotrope à un facteur de stress après 24 heures de séparation maternelle. LE : Long-Evans, LExSD : hybride Long-Evans et Sprague-Dawley, SD : Sprague-Dawley, W : Wistar. Références: [200-203, 205-215, 218-222, 225, 226]

jour de la séparation (postnatal)	3-4	5-6	7-9	10-12	14-16	17-19	19-21
souche	SDxLE	LE, SD, SDxLE, W	SD, SDxLE, W	LE, SD, SDxLE, W	LE, SDxLE	SD, SDxLE	SD, SDxLE
ARNm de <i>c-fos</i> dans le NPV		↓		↑, (=)		↓	↓
ARNm de NGFI-B dans le NPV				↑			=
ARNhn de CRH dans le NPV		↓		↓		↓	
ARNm de CRH dans le NPV		↓		↓, (=)		↓, =	↓
ARNm de VP dans le NPV		=		↑		=	
ACTH plasmatique	↑	↑, =	↑	↑	↑	↓, =	↓
CORT plasmatique	↑, =	↑, (=)	↑	↑	↑	↑	↓

4.3.2 Effets à long terme

La séparation maternelle de 24 heures peut avoir des conséquences durant plusieurs semaines, et même jusqu'à l'âge adulte. Ces conséquences sont neuroendocriniennes, nerveuses et comportementales.

Les modifications persistantes de l'axe corticotrope des rats qui ont été séparés de la mère à l'âge néonatal ont été étudiées principalement chez des rats très jeunes, avant même le sevrage (Tableau 4). Chez ces rats juvéniles, l'expression basale de l'ARNm de la CRH dans

Tableau 4. Etat de l'axe corticotrope à l'âge adulte des rats séparés de la mère pour 24 heures à l'âge précoce. BN : Brown Norway, LExSD : hybride Long-Evans et Sprague-Dawley, SD : Sprague-Dawley, W : Wistar. Références: [5, 216, 221, 224, 228, 229, 231-234]

jour de la séparation (postnatal)		3-4	7-9	10-12
souche		BN, LExSD, W	LExSD	LExSD, SD, W
Etat basal	ARNm de CRH dans le NPV	↓, =	=	=
	ARNm de <i>c-fos</i> dans le NPV	=		=
	ACTH plasmatique	↓, ↑, =	=	=
	CORT plasmatique	↑, =	=	(↓), =
	poids des surrénales	↑, =		
	GR mRNA dans l'hippocampe	= CA1, 3, 4, DG	↓ CA1, 3, 4, DG	↓ CA1, 3, 4, DG
	MR mRNA dans l'hippocampe	=CA1, 3, 4, DG	= CA1, 3, 4, DG	↓ CA1, = CA3, 4, DG
	GR Bmax dans l'hippocampe	↓, =		
	MR Bmax dans l'hippocampe	↓, =		
	GR Bmax dans l'hypothalamus	↓, =		
	GR mRNA dans le NPV	↓	↓	↓
	GR mRNA dans l'hypophyse	↓		
Réponse aux stimuli stressants	ARNm de CRH dans le NPV	↑		↓
	ARNm de <i>c-fos</i> dans le NPV	↑		=
	ACTH plasmatique	↓, ↑, =	=	↓, =
	CORT plasmatique	↓, ↑, =	=	↓, ↑, =

le NPV, ainsi que les taux plasmatiques basaux d'ACTH et de CORT sont généralement normaux [5, 216, 221, 224, 228, 229], mais la réponse aux facteurs de stress est modifiée. Cette modification dépend de l'âge auquel la séparation a été subie : une réponse d'ACTH exagérée apparaît chez les rats qui ont été séparés le troisième jour postnatal, la réponse est

similaire à celle des témoins chez les rats qui ont subi la séparation le cinquième jour postnatal, finalement, elle est diminuée chez les rats qui ont été séparés le onzième jour postnatal [5, 221]. L'augmentation des taux d'ACTH chez les rats ayant subi une séparation le troisième jour postnatal semble être due directement à l'augmentation de la sécrétion de la CRH, puisqu'on observe une augmentation de l'ARNm de la CRH et du *c-fos* dans le NPV [221]. Les modifications de la réponse CORT ne suivent pas toujours celles de la réponse ACTH [221]. Ceci peut s'expliquer par une relation non-linéaire entre l'ACTH et la CORT [215, 230].

Il a été envisagé que la modification de la réponse ACTH à un stimulus stressant chez les rats ayant subi une séparation maternelle soit due à la modification du rétrocontrôle de l'axe corticotrope par les récepteurs aux corticostéroïdes [5]. Cependant, les changements de l'expression de l'ARNm des RG et des RM dans l'hippocampe et dans le NPV ne concordent pas avec les changements de la réponse ACTH [5]. Ces résultats peuvent être expliqués des deux façons : soit les récepteurs aux glucocorticoïdes ne sont pas impliqués dans la modification de la réponse ACTH, soit la mesure de l'expression de l'ARNm ne reflète pas bien la capacité de liaison et le fonctionnement de ces récepteurs [5, 231].

Peu d'études ont été conduites sur les caractéristiques de l'axe corticotrope des rats adultes qui ont été séparés à l'âge précoce. Une étude a démontré que l'expression de l'ARNm de la CRH dans le NPV est diminuée [231]. Les résultats des différentes études concernant les hormones de stress sont contradictoires : les taux basaux d'ACTH et de CORT sont soit élevés, soit normaux [224, 231]. Enfin, les récepteurs aux corticostéroïdes ont été étudiés par plusieurs travaux : la capacité de liaison des RG et des RM dans l'hippocampe des mâles séparés de la mère à l'âge de trois jours est soit diminuée, soit inchangée selon l'âge de l'évaluation et la méthode utilisée [232, 233] ; l'expression de l'ARNm des RG et des RM est inchangé dans l'hippocampe des rats séparés, et diminuée ou inchangée dans le NPV et dans l'hypophyse antérieure [231, 233]. Ces résultats ne donnant pas une image claire de l'axe corticotrope des adultes séparés de la mère à l'âge néonatal, des études supplémentaires sont donc nécessaires.

La séparation maternelle a des effets persistants sur les systèmes neuronaux différents de l'axe corticotrope et sur le comportement, qui ont été étudiés chez les rats adultes (Tableau 5). Le poids corporel de ces animaux est généralement diminué indépendamment de l'âge à la séparation, mais cette diminution disparaît avec l'âge de l'animal [224, 231, 235, 236]. Le

Tableau 5. Caractéristiques (non corticotropes) des adultes ayant subi une séparation néonatale. BN : Brown Norway, CR : Charles River, LExSD : hybride Long-Evans et Sprague-Dawley, SD : Sprague-Dawley, W : Wistar. Références: [4, 224, 228, 231, 235-237, 240-242]

jour de la séparation (postnatal)		3-4	5-6	7-9	10-12	14-16	17-19
souche		BN, LExSD,W	W	W	LExSD, SD, W	CR	W
poids corporel		↓, = (avec l'âge)		↓, = (avec l'âge)	↓	↓	↓, = (avec l'âge)
sys. 5-HT	récepteurs 5-HT1A dans l'hippocampe	↑					
	ARNm de Tyr-hydroxylase dans la subst. nigra	↑					
système catécholaminergique	activité induit par l'apomorphine			↓, ↑, =			
	mastication induite par l'apomorphine	↑		↑, =			
"gating" sensorimoteur	amplitude basale du sursaut au bruit	=	↓	(↑), =			=
	inhibition par un pré-signal	↓, =	↓	↓, =			=
anxiété		=		=	↓		=
mémoire	immobilisation conditionnée	↓		↓			↓
	évitement actif	↓		↑			=
	apprentissage spatial	↓		↑			=

système dopaminergique nigrostriatal des animaux séparés est activé et plus sensible : l'expression de l'ARNm de la tyrosine hydroxylase sont élevés dans les neurones A9 et l'apomorphine induit plus d'activités locomotrices et de mastication [231, 237, 238]. Ces résultats sont consistants avec une hypersensibilité de l'axe corticotrope, puisque les études sur des souches de rats génétiquement sélectionnées ont montré que la sensibilité à la dopamine est liée à la sensibilité corticosurrénalienne à l'ACTH et à l'efficacité du rétrocontrôle de CORT [239]. Les études sont contradictoires concernant le sursaut au bruit et l'inhibition par un pré-signal, paramètres comportementaux liés au système dopaminergique. Notamment, une étude a démontré une diminution de ces deux paramètres, ce qui indiquerait

une hyperactivité du système dopaminergique [240], mais une autre étude n'a pas confirmé ces résultats [241]. L'anxiété des animaux séparés est normale ou diminuée [228, 235]. Les données concernant l'apprentissage des animaux ne sont pas très consistantes : l'immobilisation conditionnée est déficitaire quel que soit l'âge à la séparation, alors que l'évitement est déficitaire chez les animaux séparés avant la période HRS, accru chez les animaux séparés pendant cette période et normal chez les animaux séparés plus tard. De plus, ces effets dépendent aussi du sexe des animaux [235].

L'identité des facteurs induisant les modifications persistantes dues à la séparation maternelle n'a pas été clairement déterminée. Trois causes possibles ont été suggérées : le manque nutritionnel, qui induit par divers médiateurs un retard dans le développement de plusieurs systèmes neuronaux, le comportement de la mère, qui peut être influencée par la séparation et l'élévation prolongée des taux de CORT.

La sous-nutrition sans séparation maternelle a été étudiée en créant artificiellement des larges portées que la mère ne pouvait pas suffisamment nourrir, en ligaturant une partie des tétones de la mère ou encore en sous-nourrissant la mère allaitante. Ces procédures ne sont pas anodines, puisque chacune influence le comportement de la mère, ce qui est un variable additionnelle à la sous-nutrition des petits. La nutrition réduite induit des forts changements négatifs à l'âge néonatal, puisque l'animal est en train de traverser une période de croissance rapide. Les rats sous-nourris ont des taux sanguins de glucose et de CORT diminués [243]. Des rats juvéniles ou adultes qui faisaient partie des portées sous-nourries se caractérisent par un poids corporel diminué, des déficits de la structure cérébrale, notamment de l'hippocampe, ainsi qu'un toilettage élevé [244-246].

Le comportement de la mère envers ses petits suivant une séparation prolongée n'a pas été étudié, il est cependant probable qu'il est modifié, puisqu'une séparation de courte ou de moyenne durée (de 15 à 240 minutes) augmente la fréquence des comportements maternels (léchage, toilettage [247, 248]). Il est significatif que les rats issus de mères qui montrent spontanément plus de comportements maternels ressemblent en bien des points aux rats qui ont subi un *handling* : la réponse neuroendocrinienne aux stimuli stressants est diminuée, la sensibilité des RG dans l'hippocampe est augmentée, l'anxiété est diminuée [1]. Cette coïncidence a été interprétée dans le sens où tous les effets du *handling* seraient induits par la modification du comportement maternel. Il est difficile de prédire si une séparation prolongée induit les changements du comportement maternel dans le même sens, mais si c'est le cas, ils pourraient diminuer les effets néfastes de la sous-nutrition.

L'effet d'un traitement périnatal par la CORT dépend largement de la quantité introduit dans l'organisme. Les taux sanguins très élevés de CORT (similaires à ceux atteints pendant une séparation maternelle), peuvent induire de nombreux effets négatifs sur la croissance du cerveau et la prolifération des cellules. Notamment, ils inhibent la neurogenèse et la gliogenèse dans les régions qui sont en cours de division active, retardent la myélination, la formation des épines dendritiques, la croissance axonale et la synaptogenèse dans les neurones qui ont déjà fini de se diviser [249]. Les rats ayant eu des taux sanguins élevés de CORT ont moins de RG dans l'hippocampe [250]. Au contraire, les concentrations modérément élevées de la CORT pendant la période néonatale peuvent induire des effets bénéfiques : plus de récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe, une réponse neuroendocrinienne aux stimuli stressants diminuée, ainsi qu'une performance améliorée dans les tests de mémoire et une anxiété diminuée [251-253].

4.4 Séparation maternelle répétée

Nous avons vu qu'entre le *handling* – une séparation de la mère de 15 minutes – et la séparation maternelle de 24 heures, il existe une multitude de protocoles visant à établir les effets de l'absence de la mère sur les petits. Il est impossible d'acquérir une image globale des effets de ces manipulations, notamment à cause de leur hétérogénéité : la séparation peut durer d'une heure jusqu'à 8 heures, et peut être unique ou répétée jusqu'à une fréquence journalière. Une revue excellente traite en détail les effets de ces procédures [254], dont quelques-uns seront mentionnés ici afin de démontrer qu'ils peuvent être très différents des effets de la séparation maternelle de 24 heures.

4.4.1 Effets immédiats

Les effets de la séparation maternelle sur l'axe corticotrope sont en relation directe avec la durée de la séparation : un minimum de deux heures de séparation est requis pour induire des élévations significatives de CORT [201, 206, 212, 255], et au moins 8 heures de séparation sont nécessaires pour faire apparaître une hypersensibilité de l'axe corticotrope aux stimuli stressants [218, 255].

Les effets aigus des procédures de séparation maternelle répétée ont été peu étudiés. Toutefois, une séparation maternelle d'une heure par jour semble sensibiliser les rats aux effets de la séparation [256]. Ainsi, la séparation maternelle répétée augmente les niveaux plasmatiques basaux de CORT pendant la période HRS, ce qui démontre des effets cumulatifs des séparations courtes et quotidiennes. Cependant, les effets d'une séparation maternelle répétée plus espacée et plus longue (trois fois 8 heures, les JPN 7, 9 et 11) ne sont pas cumulatifs, comme les taux plasmatiques de CORT sont augmentés immédiatement après chaque séparation, mais cet effet n'est pas durable [216].

4.4.2 Effets à long terme

Les effets prolongés de la séparation maternelle répétée sur l'axe corticotrope ne sont pas consistants entre les études, probablement à cause de la variété de protocoles utilisés. Certains travaux ont trouvé une augmentation de la réponse neuroendocrinienne aux stimuli stressants, comme suivant une séparation de 24 heures [257-260], d'autres une réponse diminuée, comme suivant le *handling* [261, 262], et les autres travaux n'ont pas trouvé de changements de réponse [216, 263, 264].

Les autres effets persistants de la séparation maternelle répétée sont également inconsistants. Le système dopaminergique des animaux ayant subi une séparation maternelle répétée a été étudié en mesurant l'activité induite par l'amphétamine ; celle-ci peut être augmentée [265-267], normale [268] ou diminuée [269]. L'anxiété de ces animaux peut également être augmentée [257, 260, 262], normale [259, 270, 271] ou diminuée [271-273].

La prise alimentaire de ces animaux a été étudiée dans peu d'expériences : leur ingestion de nourriture standard est inchangée [274], mais ils peuvent consommer plus d'aliments très palatables [271].

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 Animaux et maintenance

Les animaux utilisés sont obtenus dans notre animalerie par le croisement de femelles et de mâles Long-Evans provenant de l'élevage CERJ (Le Genest, France). Trois semaines au moins avant le début de la reproduction et durant toutes les expériences, les animaux sont soumis à un cycle de lumière inversé (extinction à 10 h, allumage à 22 h). Ils sont installés dans des boxes d'animalerie dont la température est maintenue constante ($23 \pm 1^\circ\text{C}$).

L'âge des animaux est déterminé en contrôlant les naissances deux fois par jour à 10 h et à 18 h, et le jour de la naissance est désigné comme JPN 0. Les portées entières sont maintenues avec la mère dans les cages en polypropylène (20 x 32 x 19 cm), avec comme litière de la sciure et des copeaux. Ils ont à leur disposition des croquettes standard de reproduction (A03, UAR, France) et de l'eau de ville *ad libitum*. Le jour suivant la naissance (JPN 1), les portées sont ajustées à 9 ratons en éliminant des ratons surnuméraires sans critère spécifique. Ainsi, toutes les portées sont composées de mâles et de femelles, mais dans des proportions variées. A partir de ce moment, les animaux ne sont plus manipulés jusqu'à la séparation maternelle, et par la suite, jusqu'au sevrage. Cela est fait pour minimiser les risques de la perturbation de la relation mère-enfant en dehors de la séparation maternelle expérimentale.

Tandis que d'autres études incluent souvent un procédé de randomisation de la distribution de ratons entre les mères ayant mis bas le même jour, notre méthode ne perturbe pas les ratons jusqu'au jour de la séparation, dans le but de prévenir l'introduction d'une nouvelle variable : l'adoption. En effet, l'adoption en elle-même modifie le comportement adulte et diminue la réponse neuroendocrinienne aux stimuli stressants, probablement en augmentant l'incidence des soins maternels après la redistribution des ratons [190, 275].

Les rats sont sevrés à l'âge de 22 jours. Les expériences sur les adultes sont conduites entre l'âge de 2 et 4 mois. Pour chaque groupe adulte expérimental, des animaux utilisés proviennent d'au moins 6 portées, donc, généralement, seulement 2 animaux sont issus de la même portée.

2 Séparation néonatale de la mère

Les ratons sont séparés de la mère pour 24 heures, pour le groupe SEP5 de 15 h le JPN 5 jusqu'à 15 h le JPN 6, et pour le groupe SEP14 de 15 h le JPN 14 jusqu'à 15 h le JPN 15. La portée entière est mise dans une cage en plastique contenant la litière de la cage de reproduction, alors que la mère reste dans la cage de reproduction. Les ratons sont pesés ensemble et placés dans une couveuse réglée à 35°C et à 40% d'humidité, où ils restent pour 24 heures. Pendant la séparation, les ratons n'ont accès ni à la nourriture, ni à l'eau. Les portées témoins (NSEP) sont séparées de la mère et pesées tout comme les portées SEP, mais restent seulement pour 3 minutes dans la couveuse et sont ensuite réunies dans la cage d'origine avec la mère. Vingt-quatre heures après le début de la séparation, les portées SEP et NSEP sont de nouveau pesées, et sont ensuite réunies avec la mère.

3 Protocoles expérimentaux et effectifs

Dans cette partie, seuls sont présentés le principe des protocoles expérimentaux et les effectifs (entre parenthèses). Les régimes, les méthodes utilisées pour les expériences, les prélèvements et les dosages sont détaillées par la suite.

3.1 Effets immédiats

Les portées entières SEP (14 SEP5, 15 SEP14) sont pesées au début et à la fin de la séparation maternelle, et les portées NSEP (9 NSEP5, 9 NSEP14) aux moments correspondants.

A la fin de la séparation (pour les SEP) ou au moment correspondant (pour les NSEP), deux animaux de chaque portée sont choisis au hasard et sacrifiés. Leur sang est prélevé afin de permettre un dosage d'ACTH (14 NSEP5, 14 SEP5, 11 NSEP14, 11 SEP14 ; section 12) et de CORT (4 NSEP5, 8 SEP5, 6 NSEP14, 7 SEP14 ; section 12). Leur cerveau est prélevé pour l'évaluation de l'expression des ARNm par hybridation *in situ* (VP : 10 NSEP5, 8 SEP5, 10 NSEP14, 8 SEP14 ; CRH : 10 NSEP5, 8 SEP5, 10 NSEP14, 7 SEP14 ;

section 8) et pour les dosages de neuropeptides par immunocytochimie dans le noyau paraventriculaire (VP : 11 NSEP5, 11 SEP5, 6 NSEP14, 7 SEP14 ; CRH : 9 NSEP5, 9 SEP5, 6 NSEP14, 7 SEP14 ; colocalisation VP : 9 NSEP5, 9 SEP5, 4 NSEP14, 5 SEP14 ; section 9) et dans l'éminence médiane (VP dans la zone interne : 5 NSEP5, 8 SEP5, 5 NSEP14, 5 SEP14 ; VP dans la zone externe : 4 NSEP5, 4 SEP5, 5 NSEP14, 5 SEP14 ; CRH dans toute l'EM : 7 NSEP5, 7 SEP5, 5 NSEP14, 4 SEP14). Les hypophyses des animaux sont prélevées pour la quantification des récepteurs aux glucocorticoïdes par Western Blot (5 NSEP5, 8 SEP5, 6 NSEP14, 7 SEP14 ; section 11). Finalement, les surrénales sont prélevées et pesées immédiatement (22 NSEP5, 30 SEP5, 20 NSEP14, 34 SEP14).

3.2 Effets persistants

3.2.1 *Animaux nourris du régime standard*

Les portées sont sevrées à l'âge de 22 jours, quand chaque portée est mise dans une cage propre. A l'âge de 28 jours, les mâles sont identifiés, pesés et placés dans les cages par groupes de 2 ou 3. Ils sont par la suite pesés une fois par semaine, au moment du nettoyage des cages. Ils ont à leur disposition des croquettes standard de reproduction et de l'eau de ville *ad libitum* jusqu'à l'âge de 8 semaines, quand ils sont mis individuellement dans les cages métalliques (22 x 28 x 19 cm) et les croquettes sont remplacées par des mangeoires contenant un régime standard sous forme de poudre.

3.2.1.1 Comportement alimentaire basal

Le comportement alimentaire est mesuré chez les rats ayant accès *ad libitum* au régime standard (27 NSEP, 20 SEP5, 22 SEP14). La mesure de la prise alimentaire commence à l'âge de dix semaines, après une période d'habituation de quinze jours, et dure quinze jours. Elle est réalisée en pesant des récipients de nourriture tous les jours cinq fois : à l'extinction de la lumière, deux et six heures après l'extinction, à l'allumage de la lumière et dix heures après l'allumage de la lumière (10h, 12h, 16h, 22h, 8h). Les valeurs moyennes de prise alimentaire durant les quinze jours des périodes ainsi définies sont calculées. Les périodes sont choisies en fonction des rythmes circadiens déjà décrits de CORT, d'insuline et d'autres hormones qui participent à la régulation de la prise alimentaire [10]. Il est ainsi

possible de détecter les changements de la prise alimentaire même s'ils sont restreints à une période courte de la journée, et de relier ces changements à des modifications endocriniennes. Le poids corporel des animaux est mesuré trois fois par semaine.

Ces animaux et d'autres ayant été habitués au régime standard sous forme de poudre participent dans d'autres expériences, comme décrit par la suite. Entre chaque expérience, il existe une période de récupération d'au moins une semaine.

3.2.1.2 Comportement alimentaire après une contention de 3 heures

Dans cette expérience, les rats (8 NSEP, 10 SEP5, 11 SEP14) sont leurs propres témoins. Pendant la contention, les rats ne peuvent ni manger, ni boire, c'est pourquoi pendant la période témoin, les récipients de nourriture ainsi que l'eau sont enlevés de la cage. Ce jeûne débute 3 heures avant l'extinction de la lumière, et dure 3 h. La contention est imposée après cinq jours de récupération. Les animaux sont contraints pendant 3 h (début de la contention : 3 h avant l'extinction de la lumière) dans les tubes en plastique (section 6.1). Les mangeoires sont pesées toutes les 24 heures pendant 2 jours après la contention et le jeûne. Les animaux sont pesés avant le début de la contention et le jeûne et 2 jours plus tard.

3.2.1.3 Comportement alimentaire après une injection intracérébroventriculaire de leptine

Les animaux (9 NSEP, 9 SEP5 et 9 SEP14 rats) sont canulés bilatéralement dans les ventricules latéraux (section 5). Avant le début des injections, les rats sont manipulés tous les jours pendant 2 semaines afin de les habituer à rester immobiles pendant la durée des injections et pour leur éviter tout stress pendant ces injections.

Les rats subissent une injection avec de liquide céphalo-rachidien artificiel (LCR, 4 μ l) ou de 10 μ g / rat de leptine diluée dans 4 μ l de LCR (leptine de souris, Cat. No. 498-OB-01M, R&D Systems, UK). Le LCR artificiel est une solution d'eau distillée stérile contenant 124 mM NaCl, 3,3mM KCl, 1,24mM KH_2PO_4 , 1,3mM MgSO_4 , 2,5mM CaCl_2 , 26 mM NaHCO_3 et 10 mM glucose. Chaque rat est son propre témoin, et les injections sont faites dans l'ordre contrebalancé, avec une période de récupération de cinq jours entre les injections. Les injections sont réalisées chez les rats vigiles (*free-moving*) juste avant l'extinction de la lumière, quand les rats ont faim.

Les mangeoires sont pesées toutes les 24 heures pendant 5 jours après chaque injection. Les animaux sont pesés le jour précédent l'injection, 2 jours et 4 jours plus tard.

3.2.1.4 Comportement alimentaire après une injection intrapéritonéale de dexfenfluramine (dF)

A l'âge de trois mois, les rats (11 NSEP, 11 SEP5 et 11 SEP14) subissent une injection intrapéritonéale (ip) de soluté physiologique (1 ml / kg) ou du même volume de dF, diluée afin d'injecter 1 mg / kg poids corporel. Chaque rat est son propre témoin, et les injections sont faites dans l'ordre contrebalancé, avec une période de récupération de 48 heures entre les injections. Les injections sont effectuées juste avant l'extinction des lumières, quand les animaux ont faim. Les mangeoires sont pesées 2 heures et 6 heures après chaque injection. Les animaux sont pesés le jour précédant et le jour suivant les injections.

3.2.1.5 Comportement d'anxiété dans un appareil " open field "

Une mesure de l'anxiété des animaux est faite en observant leur comportement dans un nouvel environnement bien illuminé, qui est perçu comme menaçant par des animaux (section 7). L'expérience est conduite quand les rats (14 NSEP, 12 SEP5 et 10 SEP14) ont atteint l'âge de deux mois. Comme l'expérience requiert l'illumination, elle est conduite pendant la phase diurne, à partir de minuit (deux heures après l'allumage des lumières), dans une période où les taux d'ACTH sont relativement constants.

3.2.1.6 Réponse neuroendocrinienne à la contention

Des canules jugulaires sont implantées dans 11 rats NSEP, 10 SEP5 et 8 SEP14 pour permettre de réaliser des prélèvements sanguins successifs sur l'animal vigile (section 6.2). Une contention de 30 min est réalisée après une période de récupération de 4 jours (section 6.1). Les rats sont introduits dans des tubes en plastique à 13 h (3 heures après l'extinction de la lumière). Cette période est choisie à cause de raisons pratiques (cycle nyctéméral inversé), mais aussi parce qu'à cette heure de la journée, les taux plasmatiques d'ACTH sont relativement bas et constants. Cependant, des taux plasmatiques de CORT sont généralement encore élevés après le pic atteint au début de la nuit (voir par exemple [276]). Les

échantillons de sang sont prélevés à 15 et 30 minutes de stress, et 15, 30 et 60 minutes après la fin de la contention (section 6.2). Les taux d'ACTH et de CORT sont mesurés par dosage radioimmunologique (section 12).

3.2.1.7 Réponse neuroendocrinienne à un jeûne de 48 heures

Un jeûne de 48 h est appliqué aux animaux. Pendant cette période, les rats “ à jeun ” (6 NSEP, 6 SEP5, 6 SEP14) n'ont pas accès à la nourriture, mais ils ont à leur disposition de l'eau de ville *ad libitum*, les rats “ *ad libitum* ” (5 NSEP, 5 SEP5, 5 SEP14) ont aussi de la nourriture *ad libitum*.

A la fin de la période de 48 heures, les animaux sont sacrifiés entre 15 et 16 heures. Des prélèvements de sang sont effectués pour les dosages de CORT (section 12). L'adénohypophyse est prélevé pour les dosages de RG par Western Blot (section 11). Les surrénales sont également prélevées et pesées.

3.2.1.8 Prélèvements basaux à la fin des expériences

A l'âge de quatre mois, après au moins une semaine de récupération suivant la dernière expérience, les animaux sont sacrifiés entre 15 h et 16 h. Leur sang est prélevé afin de permettre un dosage d'ACTH (7 NSEP, 7 SEP5, 7 SEP14 ; section 12) et de CORT (31 NSEP, 21 SEP5, 21 SEP14 ; section 12). Leur cerveau est prélevé pour l'évaluation de l'expression des ARNm par hybridation *in situ* (VP : 9 NSEP, 5 SEP5, 5 SEP14 ; CRH : 10 NSEP, 5 SEP5, 4 SEP14 ; section 8). Pour la quantification des récepteurs aux glucocorticoïdes par Western Blot (section 11), les prélèvements d'hippocampe (16 NSEP, 10 SEP5, 10 SEP14), d'hypothalamus (16 NSEP, 9 SEP5, 10 SEP14), de cortex (12 NSEP, 8 SEP5, 9 SEP14) sont effectués. Pour les dosages de RG par binding assay, les prélèvements d'hippocampe sont effectués après une surrénalectomie (10 NSEP, 11 SEP5, 11 SEP14 ; section 10). Les surrénales des animaux n'ayant pas subi de surrénalectomie sont prélevées et pesées immédiatement (31 NSEP, 19 SEP5, 21 SEP14).

3.2.2 Animaux nourris au régime des trois macronutriments séparés

Jusqu'à l'âge de 8 semaines, les animaux sont élevés comme les animaux nourris au régime standard (section 3.2.1). A ce moment, ils sont mis individuellement dans les cages métalliques (22 x 28 x 19 cm) et les croquettes sont remplacées par des mangeoires contenant un régime dissocié de trois macronutriments sous forme de poudre (section 4.2).

La mesure de la prise de trois macronutriments dissociés commence à l'âge de dix semaines (16 NSEP, 14 SEP5, 10 SEP14) et se fait selon le même protocole que dans le cas de la prise de nourriture standard.

A l'âge de quatre mois, les animaux sont sacrifiés entre 15 h et 16 h. Leur sang est prélevé afin de permettre un dosage d'ACTH et de CORT (10 NSEP, 10 SEP5, 8 SEP14 ; section 12). Leur cerveau est prélevé pour l'évaluation de l'expression de l'ARNm de la VP et de la CRH par hybridation *in situ* (9 NSEP, 5 SEP5, 4 SEP14 ; section 8). Finalement, les surrénales sont prélevées et pesées immédiatement (16 NSEP, 9 SEP5, 6 SEP14).

3.2.3 Animaux nourris au régime "cafétéria"

Contrairement aux autres expériences, les rats nourris au régime "cafétéria" (13 NSEP, 9 SEP5, 9 SEP14) sont installés dans les cages en plastique par deux ou par trois dès le sevrage (22 jours) et jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont accès *ad libitum* aux régimes dissociés (section 4.2) et à l'eau de ville jusqu'à l'âge de huit semaines. A ce moment, ce régime est complété par des aliments très palatables (section 4.3). Le poids corporel est mesuré deux fois par semaine.

A la fin de la période d'expérimentation (55 jours), les rats sont sacrifiés entre 15 et 16 h, soit 20 min après un stress d'éther de 3 min, soit à l'état basal. Le sang est prélevé pour les dosages d'ACTH et de CORT (pour les deux hormones, état basal : 6 NSEP, 4 SEP5, 4 SEP14 ; stress éther : 7 NSEP, 5 SEP5, 5 SEP14 ; section 12). Leur cerveau est prélevé pour l'évaluation par hybridation *in situ* de l'expression de l'ARNm de la VP et de la CRH (pour les deux peptides, état basal : 2 NSEP, 2 SEP5, 2 SEP14 ; stress éther : 4 NSEP, 3 SEP5, 3 SEP14 ; section 8). Leur graisse sous-cutanée, épидидymale et péri-rénale et les surrénales sont également prélevées et pesées.

4 Régimes

4.1 Régime standard

Le régime standard utilisé dans les expériences consiste en des croquettes standard de reproduction (A03, UAR, France) jusqu'à l'âge de huit semaines. A l'âge de huit semaines, les croquettes sont remplacées par un régime standard sous forme de poudre (A04, UAR, France).

4.2 Régime de trois macronutriments dissociés

La composition du régime de trois macronutriments, supplémenté en vitamines et en sels minéraux est présenté dans le Tableau 6. Les trois régimes sont présentés avec la même texture, c'est-à-dire sous forme de poudre. Comme dans le cas du régime standard, ceci facilite la pesée et, de plus, évite l'influence de la texture des aliments sur la prise alimentaire (problème de palatabilité).

Tableau 6. Composition des trois régimes composés de macronutriments purs. Données en g/100g. Les régimes glucidiques et protéiques ont une valeur calorique de 15,9 kJ/g, le régime lipidique a une valeur calorique de 18,8 kJ/g.

	Régime glucidique	Régime protéique	Régime lipidique
Amidon de maïs	95	0	0
Caséine	0	95	0
Huile de maïs	0	0	50
Cellulose	0	0	45
Mélange salin	4	4	4
Vitamines	1	1	1

4.3 Régime cafétéria

Le régime cafétéria ajoute aux trois macronutriments dissociés quatre aliments très palatables qui sont quotidiennement alternés deux par deux. Les rats ont ainsi accès *ad libitum* soit à des morceaux de bananes et de pâté de foie, soit à des lardons et des biscuits sucrés.

5 Injection intracérébroventriculaire de la leptine

Après anesthésie par une injection ip de Kétalar® (chlorhydrate de kétamine, Parke-Davis, 50 mg/ml), à raison de 15 mg/100g de poids corporel, les animaux sont mis en place sur l'appareil à stéréotaxie (Narishige, Tokyo, Japon). La peau du crâne est sectionnée et la surface de la calotte crânienne est asséchée afin de visualiser les différents repères osseux. La boîte crânienne est ouverte à l'aide d'une fraise de dentiste.

Le positionnement des canules intracérébroventriculaires est réalisé à l'aide d'un appareil à stéréotaxie et d'un micromanipulateur. Les canules sont fabriquées à partir d'aiguilles hypodermiques (TERUMO® G27) qui ont pour diamètre externe 400 µm et pour longueur 11 mm. Les coordonnées des sites d'implantation sont estimées à partir de l'atlas stéréotaxique [277]. Le plan horizontal est défini par la ligne interaurale et un point situé à 0,5 mm en dessous de la base des incisives du maxillaire supérieur. Les coordonnées stéréotaxiques sont définies à partir du point bregma. Pour l'implantation dans les ventricules latéraux, nous avons utilisé les coordonnées suivantes (mm) : latéralité : ± 1,5, antériorité : -1, profondeur : 3,5.

La fixation permanente des canules sur le crâne se fait au moyen de ciment dentaire. Deux vis prises dans le ciment et insérées dans le crâne maintiennent l'ensemble. En dehors des périodes d'injections, des stylets sont introduits et laissés en place dans les canules pour éviter une perte possible de LCR.

Des aiguilles d'injection sont fabriquées à partir d'aiguilles Hamilton G33. Le diamètre externe est de 100 µm, la longueur de l'aiguille est de 11,5 mm pour les ventricules latéraux. Les injections se font à l'aide d'un pousse-seringue et durent 2 minutes pour les injections en intracérébroventriculaire, les aiguilles restant en place 2 minutes supplémentaires pour permettre l'équilibration des pressions intra-ventriculaires.

6 Stress de contention

6.1 Méthode de contention

Chaque rat est introduit dans un tube en plastique transparent (diamètre : 6,5 cm, longueur : 21 cm), qui n'offre qu'une possibilité très restreinte de bouger. Le tube est ouvert à l'avant pour permettre la respiration au rat, et bouché à l'arrière pour restreindre le mouvement le plus possible.

Le stress de contention est appliqué dans deux expérimentations différentes. Dans la première, dont le but est de connaître l'effet d'un stress très fort sur le comportement alimentaire des rats, la contention dure 3 heures. Dans la deuxième, où il dure 30 minutes, des prélèvements sériés de sang sont effectués à l'aide de canules jugulaires afin de connaître la réponse neuroendocrinienne des rats à ce stimulus stressant.

6.2 Canulation jugulaire et prélèvements

6.2.1 Méthode opératoire

Des canules jugulaires sont implantées selon la méthode de Remie et ses collaborateurs [278]. Le cathéter en silastic, qui possède une bonne tolérance vasculaire, est introduit dans la veine jugulaire (diamètre interne : 0,51 mm, diamètre externe : 0,94 mm, longueur totale : 8 cm ; Down Corning, Sigma Médical, France). Il est porteur d'une olive distale (boule de silicone ; Rhodorsil silicone, CAF4, Rhône Poulenc, France) placée à 2,7 cm de l'extrémité qui pénètre dans la veine. Le cathéter ainsi préparé est placé dans une solution héparine/NaCl (25000 UI héparine/150 ml NaCl 0,9%) jusqu'à son utilisation.

La mise en place du cathéter est réalisée sous anesthésie au Kétalar (Panpharma, France, ip, 150 mg/kg de poids corporel). Le rat est placé en décubitus dorsal sur une table de dissection et la jugulaire droite externe est dégagée ; un orifice réalisé avec une aiguille G20 (diamètre externe 900 μ m) permet d'introduire le cathéter jusqu'à l'entrée de l'oreillette. A ce niveau, l'olive distale touche l'orifice et une ligature est pratiquée permettant de maintenir le cathéter en place. En surface, le silastic est connecté à une canule externe avec un bouchon en polyéthylène.

Les rats récupèrent 4 jours avant le stress de contention. Pendant ce temps, le cathéter n'est ni manipulé, ni rincé.

6.2.2 Prélèvements sanguins et méthode de contention

Pendant la période de récupération, les animaux sont accoutumés aux contraintes expérimentales, afin de minimiser le stress de manipulation. Avant et pendant les prélèvements sanguins, les bruits inhabituels sont évités.

Les prélèvements débutent quatre jours après l'implantation du tube en silastic. Cette période postopératoire est restreinte afin de garantir la vacuité du cathéter. Les prélèvements sanguins sont réalisés à distance sur des animaux vigiles, sans qu'une manipulation de l'animal en dehors de sa cage soit nécessaire.

La canule externe est connectée à un cathéter de prélèvement (tube en polyéthylène, diamètre externe : 1 mm, diamètre interne : 0,8 mm ; longueur : 30 cm, Fandre n°1), lui-même relié à un système de crochet rotatif. Ce système est placé juste au-dessus de la cage, permettant de maintenir le cathéter verticalement au-dessus de la tête du rat. Ceci autorise les animaux à dormir ou à se mouvoir sans aucune restriction, même pendant les prélèvements sanguins.

La connexion au cathéter de prélèvement se fait à 12 h (2 heures après l'extinction des lumières), et le premier prélèvement, à l'état " non-stressé " de l'animal, se fait 1 h après celle-ci. Le prélèvement est réalisé en connectant le cathéter à une seringue de 5 ml et en aspirant jusqu'à ce que le sang pénètre dans le corps de la seringue. Une seconde seringue de 1 ml est utilisée pour prélever 150 µl de sang. Le volume sanguin est compensé par l'injection d'un même volume de soluté physiologique, puis le cathéter est de nouveau rebouché. La durée du prélèvement ne dépasse pas 30 secondes. D'autres échantillons de sang sont prélevés de la même façon pendant et après la contention. Au dernier prélèvement, le volume sanguin est complété par un même volume de soluté physiologique hépariné (25000 UI héparine/ 150 ml soluté physiologique).

7 “Open field”

Ce test est réalisé dans une pièce voisine de la pièce d'élevage, entre 24 h et 2 h, c'est-à-dire, à partir de deux heures après l'allumage des lumières. Les rats sont introduits dans une arène cylindrique appelée “open field” de 80 cm de diamètre et de 35 cm de haut, peinte en blanc et illuminée avec une ampoule de 60 W placée 1 m au-dessus de l'arène. Les rats sont placés au milieu de l'arène, et leur comportement est filmé et observé par deux observateurs présents dans la pièce pendant les 3 minutes du test. Les paramètres mesurés sont : latence avant la sortie du cercle central, nombre des lignes croisées, temps passé dans l'aire périphérique (thigmotactisme [279]), nombre et durée des toilettages, nombre des flaques d'urine et nombre des fèces.

Immédiatement après le premier test, chaque rat est remis dans sa cage d'origine et la mangeoire est sortie, de sorte que les animaux sont soumis à un jeûne de 48 heures avant un deuxième test *open field*. Ce deuxième test est différent de l'*open field* “classique”, parce que trois croquettes sont placées dans l'arène. Ce test est conduit comme le premier, avec les mêmes paramètres, auxquelles sont ajoutés : latence avant le début de la prise alimentaire, nombre et durée des repas [280]. Cependant, il faut noter que la séparation maternelle en soi affecte la prise alimentaire, ce qui peut interférer avec les résultats du test. Pendant le deuxième test, les fèces ne sont pas comptées, puisque le jeûne a éliminé la plupart de la nourriture contenue dans les intestins des animaux.

8 Etude des ARN messagers par hybridation in situ

Pour préparer les tissus, les animaux sont sacrifiés à la guillotine, entre 15 et 16 h. Le cerveau des animaux est prélevé immédiatement après le sacrifice, et stocké directement à -80°C . La fixation est réalisée *a posteriori* lorsque les cerveaux ont été débités en coupes frontales de 12 μm au cryostat à -20°C . Nous recueillons sur chaque lame (gélatinée) 2 coupes de cerveau de rat expérimental et 2 coupes de cerveau de rat témoin, placées face à face et situées dans les mêmes zones de l'hypothalamus.

Les coupes sont ensuite fixées dans du paraformaldéhyde à 4% dilué dans du tampon phosphate (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pH 7,4) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite passées dans 3 bains successifs de tampon phosphate de 5 minutes chacun, puis déshydratées dans des bains d'alcools de concentration croissante (70° , 95° , 100°) de 5 minutes chacun.

Choix des sondes

Les sondes utilisées sont des oligonucléotides de synthèse (composés de 20 à 50 désoxynucléotides monocaténares). Elles sont couramment utilisées en raison de leur haute spécificité, leur facilité de synthèse et de marquage, ainsi que leur bonne accessibilité à l'ARNm cellulaire [281].

La sonde vasopressine est complémentaire des bases 964-990 de la pré-provasopressine [282]. La sonde CRH est complémentaire des bases 523-567 de la pré-proCRH [283-285].

Marquage

Il se fait par "tailing", c'est-à-dire par extension en 3' de plusieurs nucléotides marqués avec du ³⁵S-dATP grâce à l'intervention de l'enzyme terminal désoxynucléotidyl transférase (TdT).

50 ng de sonde est dissoute dans 10 µl d'eau bidistillée stérile (EBDS) et dénaturée pendant 3 minutes à 65°C. A cette solution on ajoute 10 µl de tampon cacodylate 5x (Cacodylate de potassium 1 M ; Tris-HCl 125 mM ; Albumine de sérum bovin 1,25 mg/ml, pH 6,6 à 25°C), 50 µCi de solution de ³⁵S-dATP (1250 Ci/mmol dans du tampon de tricine 10 mM et de DTT 1mM ; NEN) , 2 µl à 25 U/µl d'enzyme TdT (Bohringer, Mannheim) et 3 µl de solution 25 mM de CoCl₂ afin d'obtenir une concentration finale de 1,5 mM pour le dATP. Le volume total est ajusté à 50 µl avec de l'EBDS et incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée par refroidissement rapide dans la glace et par addition de 50 µl de tampon Tris-EDTA pH 7,6-8 (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA).

La purification des sondes marquées est réalisée à l'aide de colonnes Sephadex G25 SELECT-D (équilibrées STE). Après équilibration de la colonne par centrifugation, la sonde marquée est déposée à la surface du gel. La sonde marquée est éluée après une centrifugation de 4 min (12000 tours/min) dans un tube collecteur.

La mesure de radioactivité de prélèvements réalisés avant et après purification permet d'évaluer le rendement de marquage de la sonde et de réaliser la dilution d'utilisation finale.

Hybridation

La solution de base utilisée lors de cette manipulation est par convention appelée SSC, sous forme de SSC 1x elle contient 150 mM NaCl et 15 mM C₆H₅Na.

Les coupes sont incubées pendant 1 h dans la solution de Denhart à 1% dans du SSC 4x afin de perméabiliser les coupes et de saturer les sites de liaison non spécifiques. Ceci est suivi par un lavage de 15 min dans du SSC 4x. Les coupes sont ensuite incubées 5 min dans une solution de triéthanolamine (0,1 M dans de la solution 0,9 % de NaCl, pH 8) et pendant 10 min dans la même solution de triéthanolamine complétée de 0,25% d'anhydride acétique. Cette opération diminue les liaisons électrostatiques non spécifiques en acétylant les groupements basiques du tissu. Par la suite, les coupes sont incubées dans les bains de SSC 2x pendant 3 x 5 minutes, déshydratées dans 3 bains d'éthanol successifs (70°, 90° et 100°) 1 minute avant d'être "délipidés" dans du chloroforme (5 min), remis dans l'alcool 100°, 95° puis séchées à l'air libre.

La solution d'hybridation est préparée avec les solutions suivantes : 250 µl de 1,2 M tampon phosphate, 494 µl d'EBDS, 360 µl de 5M NaCl, 30 µl de 1M Tris-HCl, 1500 µl formamide, 30 µl de solution de Denhart 100x, 75 µl de 20 mg/ml ARN, 75 µl de 10 mg/ml ADN, 6 µl 1 M dithiothreitol, 150 µl EDTA, 150 µl de 20%.

La sonde marquée au ³⁵S est reprise dans la solution d'hybridation. Le volume de reprise est calculé en fonction de la radioactivité présente après purification et en sachant que le niveau de radioactivité optimal est de 10 à 12000 cpm par µl de solution d'hybridation. La sonde est déposée à raison de 30 µl par lame. Les lames sont recouvertes de lamelles et déposées en chambre humide pour une incubation (à 37°C pour la VP et à 42°C pour la CRH) pendant la nuit.

La sonde non hybridée ou fixée de manière non spécifique est éliminée par des rinçages successifs de température croissante et de salinité décroissante, à savoir : 2x10 min SSC 4x, 30 min SSC 1x à 4°C, 2x15 min SSC 0,5x à 45°C, 2x15 min SSC 2x à 4°C, 1 min de trois bains successifs d'éthanol (70°, 95°, 100°). Les lames sont ensuite séchées à l'air libre.

Visualisation des hybrides ARN-sonde marquée

La visualisation des hybrides se fait au niveau macroscopique par autoradiographie sur plans films, et également au niveau microscopique sur lames en les plongeant dans une émulsion liquide de grains d'argent.

Les films (Kodak MR1) sont exposés à basse température (-80°C) aux coupes marquées à la CRH pendant 6 jours, et aux coupes marquées à la VP pendant 2 jours. Les films impressionnés sont stabilisés à température ambiante et développés dans les bains : 5 min avec du révélateur (Kodak GRX, dilué 1:5) et 20 min avec du fixateur (Kodak GRX, dilué 1:5). Sur plan film, le signal, déjà observable à l'œil nu, se traduit par un noircissement du film. Cette première détection permet de vérifier le succès de la réaction d'hybridation, de déterminer les territoires tissulaires concernés et d'ajuster le temps d'exposition des lames sachant que celui-ci équivaut à 5 fois celui des plans films.

Les lames sont ensuite recouvertes d'une émulsion nucléaire de grains d'argent (AgBr) NTB2 de Kodak diluée volume à volume avec de l'eau distillée à 40°C. Après séchage, les lames sont exposées à 4°C en présence de P₂O₅ pendant 30 jours (CRH) ou 10 jours (VP).

A la fin de cette période, les lames émulsionnées sont stabilisées à température ambiante, puis révélées à 17°C par immersion dans un révélateur d'autoradiographie D19 (Kodak) pendant 4 minutes. Les lames sont rincées dans l'eau distillée, fixées 10 min dans une solution de sodium-thiosulfate 30%, puis rincées dans 2 bains de 10 min d'eau distillée. Elles sont ensuite déshydratées par des bains successifs d'éthanol (70°, 95°, 100°) de 2 min suivis d'un bain de toluène. Elles sont finalement montées dans du baume Canada.

La détection au niveau microscopique permet de distinguer plus précisément au sein d'un territoire les sub-populations neuronales renfermant les ARNm recherchés. L'observation se fait au microscope optique sur fond noir, les grains d'argent apparaissant brillants.

La spécificité de la réaction d'hybridation est vérifiée par addition de sonde "froide" non marquée en excès dans la solution d'hybridation radiomarquée, à des concentrations croissantes, c'est-à-dire 10 et 100 fois plus concentrée que la sonde marquée. Nous avons ainsi vérifié que la compétition entre la sonde chaude et la sonde froide 10 fois plus concentrée entraîne une diminution du signal d'hybridation ; et il y a une disparition du signal quand la sonde froide est 100 fois plus concentrée que la sonde marquée.

Quantification par analyse d'images

L'étude quantitative est réalisée au niveau microscopique sur lame par mesure de la densité des groupes cellulaires. Elle permet d'étudier les variations d'expression génique au sein de sub-populations cellulaires.

De même que pour la simple étude qualitative, l'étude quantitative est effectuée à partir d'images observées au microscope optique (Leitz Dialux 20), sur fond noir et à grossissement X10. L'image est transmise par une caméra CCD Sony et une carte d'acquisition vidéo à l'écran d'un micro-ordinateur Macintosh II FX. Deux logiciels sont successivement utilisés. Le premier, Image Grabber 1.8 (Neotech) acquiert les images sans les modifier et les mémorise, le second, Optilab TM 2.1 (Graftek) permet leur traitement. Les images apparaissent à l'écran dans une fenêtre de mesure $640 \mu\text{m} \times 410 \mu\text{m}$ qui permet de voir un NPV en entier. L'image est digitalisée en 256 niveaux de gris allant de 0 (noir absolu) à 255 (blanc absolu). Deux opérations sont réalisées de concert, une anamorphose d'égalisation à 150 qui consiste à ramener toutes les surfaces d'un niveau de gris compris entre 150 et 255 au blanc absolu et un seuillage qui permet une détection des particules dès qu'elles ont un niveau de gris de 20.

L'image est morcelée en 950 petits carrés (38×25) représentant une unité de surface de $267 \mu\text{m}^2$. Cette surface unitaire est inférieure à la taille d'un neurone afin d'obtenir une définition optimale de l'image détectée. Pour chacune de ces unités, le logiciel mesure la surface marquée après avoir soustrait la valeur moyenne du bruit de fond calculé d'après une valeur de bruit de fond choisie en fonction de l'image obtenue.

Deux paramètres sont pris en compte :

- la surface totale marquée : elle correspond au nombre d'unités de surface marquées multiplié par $267 \mu\text{m}^2$, elle est représentative du nombre de neurones exprimant l'ARNm ;
- l'intensité du marquage, qui correspond à la surface totale des grains d'argent dans les unités de surface contenant le marquage.

Pour chaque noyau hypothalamique considéré, nous réalisons une quantification sur deux lames prises dans sa région médiane. Chaque lame comprend deux coupes d'un cerveau expérimental et deux coupes d'un cerveau témoin. De plus, les structures sont bilatérales, ce qui fait que nous analysons 8 images par animal.

9 *Etude de neuropeptides par immunocytochimie (ICC)*

Pour ces techniques, les animaux sont sacrifiés à la guillotine, entre 15 et 16 h. Le cerveau des animaux est prélevé immédiatement après le sacrifice, et fixé par immersion dans une solution de paraformaldéhyde 4% (dans tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4) - acide picrique saturé (2 :1) contenant 6,8% de saccharose. L'immersion dure 48 h à + 4°C. Les cerveaux sont ensuite rincés 24 h à l'eau courante, puis quatre fois (en 24 h) avec du tampon saccharosé (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, saccharose 15%, pH 7,4). Ils sont ensuite emballés dans des papillotes d'aluminium et plongés dans de l'azote rendu pâteux par un vide partiel. La conservation se fait à - 80°C jusqu'à utilisation des cerveaux.

Les cerveaux sont débités au cryostat à -15°C en coupes frontales de 20 µm dans le sens antéro-postérieur. Afin de favoriser l'adhésion et d'éviter tout décollement lors de la suite du protocole, les coupes sont récupérées sur des lames gélatinées. Sur chaque lame, 2 coupes de cerveau de rat expérimental et 2 coupes de cerveau de rat témoin, situées dans les mêmes zones de l'hypothalamus, sont placées face à face.

Toutes les étapes du protocole sont réalisées à température ambiante, sauf précision contraire. Une solution appelée "tampon Tris-NaCl" est utilisée pour la plupart des manipulations, elle contient 0,1 M Tris-HCl et 0,9% NaCl et est à pH 7,55.

Les lames sont séchées 1 h et rincées 30 min à l'eau courante. Elles sont ensuite incubées 3 x 10 min dans le tampon Tris-NaCl contenant 1% sodium-disulfite, 1 h à 4°C dans le tampon Tris-NaCl contenant 0,05% V/V Triton, 20 min dans le tampon Tris-NaCl contenant 0,3% H₂O₂, 3 x 10 min à 4°C dans le tampon Tris-NaCl, et 1 h à 4°C dans le tampon Tris-NaCl contenant 0,05 V/V % Triton et 10% de sérum de mouton décomplémenté. Elles sont ensuite rincées rapidement dans le tampon Tris-NaCl.

Les anticorps primaires sont dilués dans le tampon Tris-NaCl contenant 0,05 V/V % Triton. Les lames sont traitées avec des anticorps anti-VP (dilution d=1/1000) et/ou des anticorps anti-CRH (dilution 1/2000) dans un volume total de 100 µl. Les anticorps anti-VP sont dans le cas de la révélation par la rhodamine, des anticorps monoclonaux de souris, ([286]; type CLA 223), et dans le cas de la révélation enzymatique, des anticorps polyclonaux anti-VP produits chez le lapin, tous deux produits et testés dans notre laboratoire. Ces anticorps présentent une réaction croisée inférieure à 0,001% avec l'oxytocine et le CRH. Les anticorps polyclonaux anti-CRH sont produits chez le lapin, et nous ont été fournis par le Dr

G. Barbanel (URA CNRS 1197, Montpellier, France). Cet anticorps se lie spécifiquement à la CRH de rat et de l'homme (100%) et montre moins de 0,001% de réactions croisées avec la CRH alpha-hélical, la VP, l'ACTH, la bêta-endorphine, la VIP, le glucagon et la somatostatine.

Pour la mise en évidence de la VP, les lames sont incubées avec les anticorps anti-VP à 4°C pendant 42 heures, ensuite lavées trois fois pendant 10 min dans le tampon Tris-NaCl. Les anticorps primaires anti-VP liés aux antigènes sont révélés soit par des anticorps secondaires conjugués à la rhodamine, soit par une méthode de "pont", où l'anticorps secondaire se lie à un complexe enzymatique peroxydase anti-peroxydase (PAP).

Les anticorps secondaires conjugués à la rhodamine (Cat. No. 715-025-151, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) sont dilués 1:150 dans le tampon Tris-NaCl, et 100 µl sont déposés sur chaque lame. L'incubation dure une heure, à température ambiante. La réaction est arrêtée par un bain dans le tampon Tris-NaCl, à 4°C.

Pour la révélation par la méthode enzymatique, 100 µl d'anticorps secondaires (Cat. No. 711-005-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA, dilution 1:75) dilués dans le tampon Tris-NaCl sont déposés sur les lames. L'incubation dure une nuit, à 4°C. Après trois lavages de 10 min dans le tampon Tris-NaCl, 100 µl du complexe peroxydase anti-peroxydase (Cat. No. 323-005-024, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA ; dilué 1:800 dans un tampon de 0,1 M Tris-HCl pH 7,55 contenant 0,9% NaCl) sont déposés sur les lames. Après une heure d'incubation à température ambiante, le marquage est révélé pendant 10 à 12 min avec une solution de 0,05% 4-chloro-1-naphtol et de 0,75 V/V % H₂O₂ à l'obscurité. La révélation est arrêtée par un bain de 0,1 M Tris-HCl pH 7,55, à 4°C.

Pour la mise en évidence de la CRH, les lames sont incubées avec les anticorps anti-CRH à 4°C pendant 18h. Les anticorps primaires anti-CRH sont ensuite révélés par la méthode enzymatique de façon identique à la révélation de la VP.

Finalement, après rinçage de 2x10 min, dans le tampon Tris-NaCl, à 4°C, les lames sont rincées 1 h dans un tampon 0,1 M Tris-HCl pH 7,55 à 4°C et montées avec un mélange de 0,1 M PBS (pH 7,4) et de glycérol (1:3). Les lames sont conservées à 4°C jusqu'à l'observation.

La spécificité des réactions immunocytochimiques obtenues avec chacun des anticorps a été vérifiée par des études préalables réalisées au laboratoire. Ces études ont montré la disparition complète des signaux immunocytochimiques en pré-traitant les anticorps

par immunoadsorption (billes de Sépharose liés à l'antigène synthétique) pendant 1 h à 37°C. De même, le remplacement de l'anticorps spécifique par un sérum de souris ou de lapin pré-immun a permis d'estimer les réactions non spécifiques données par les différents anticorps secondaires.

L'étude quantitative est réalisée au niveau microscopique sur lame par évaluation de la densité des structures, permettant d'estimer la présence de neuropeptides.

Le nombre de cellules dans le NPV est évalué en observant directement les lames au microscope optique (Leica DM R) à grossissement x200. A l'aide d'une grille insérée dans l'oculaire, un rectangle d'une taille toujours égale est défini pour chaque noyau (la place du rectangle est définie d'un côté par les parois du troisième ventricule, et de l'autre côté sur la frontière haute du noyau, et correspond à la partie parvocellulaire du NPV), et les neurones contenus dans ce rectangle sont comptés. Pour l'étude de la colocalisation de la VP et de la CRH, deux images (révélation par rhodamine pour la VP et par le 4-chloronaphtol pour la CRH) correspondant à ce rectangle sont pris par une caméra CCD Kappa DX 30 et une carte d'acquisition vidéo à l'écran d'un micro-ordinateur. Pour l'acquisition d'image, le logiciel Kappa ImageBase est utilisé, et les images ainsi acquises sont ouvertes par le logiciel Scion Image Beta 4.02 Win. Dans le cas de la révélation enzymatique, l'image d'une lame vide (" *blank* ") est soustraite de chaque image. Deux images prises exactement au même endroit mais avec les révélations différentes (VP, CRH) sont ouvertes simultanément. Chaque cellule à VP se trouvant dans l'image est identifiée, l'emplacement correspondant sur l'image CRH est entouré et la présence ou l'absence de marquage de CRH à l'endroit correspondant à cette cellule est observée et notée. Pour chaque NPV considéré, nous réalisons la quantification d'au moins quatre images prises dans sa région médiane.

Pour l'analyse quantitative de la présence de neuropeptides dans l'éminence médiane, nous utilisons uniquement des lames révélées par la méthode enzymatique. Les images sont acquises comme décrit plus haut, et contiennent l'éminence médiane dans son entier. L'image est digitalisée en 256 niveaux de gris allant de 0 (noir absolu) à 255 (blanc absolu). Une image prise sur une lame vide (" *blank* ") est soustraite de chaque image. Un seuillage est ensuite réalisé, le niveau du seuil étant constant pour chaque type d'image (en tout, trois niveaux : VP EM interne, VP EM externe, CRH). Deux paramètres sont pris en compte :

- la surface totale marquée : elle correspond au nombre d'unités de surface marquées ;
- l'intensité du marquage, qui correspond à la densité optique moyenne des aires au-dessus du seuil.

Pour chaque éminence médiane considérée, nous réalisons une quantification sur deux lames prises dans sa région médiane définie comme la 5^{ème} et la 6^{ème} coupe (JPN 5) ou la 6^{ème} et la 7^{ème} coupe (JPN 14) après l'apparition de l'éminence médiane depuis le côté antérieur. Chaque lame comprend deux coupes d'un cerveau expérimental et deux coupes d'un cerveau témoin.

10 Analyse biochimique de la liaison des récepteurs aux glucocorticoïdes

Les tissus sont prélevés sur les animaux surrénalectomisés 24 h avant le sacrifice sous anesthésie à l'éther. Le sacrifice est réalisé entre 15 h et 16 h. Pour cela, les animaux sont d'abord anesthésiés avec du Kétalar (Panpharma, France, ip, 15 mg/kg de poids corporel) et une perfusion intracardiaque avec un soluté physiologique contenant 0,1% d'héparine est pratiquée. Un échantillon sanguin est prélevé dans le cœur avant le début de la perfusion, ce qui nous permet de vérifier le succès de la surrénalectomie (par dosage radioimmunologique de la CORT ; section 12). Les hippocampes sont disséqués dès que la perfusion est finie, et stockés à -80°C jusqu'au dosage.

Pour le dosage, les hippocampes sont homogénéisés à 10x volume dans un tampon pH 7,4 contenant 5 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 mM Na-molybdate, 1 mM 2-mercaptoéthanol et 5% glycérol. L'homogénat est centrifugé à 100000 g à 2°C pour obtenir la fraction du cytosol.

Les fractions de 100 µl de cytosol sont incubés :

1. pour déterminer la liaison totale l'échantillon à la CORT : avec 10 nM 3H-corticostérone (D-(1,2,6,7-3H)-corticostérone ; 2,59 TBq/mmol, Amersham, Suède) ;
2. pour déterminer la liaison non-spécifique : avec 10 nM 3H-corticostérone et 5 mM corticostérone (Sigma, excès 500x) ;
3. pour déterminer la liaison des RM : avec 10 nM 3H-corticostérone et 5 mM RU28362 (11b,17b-dihydroxy-6-méthyl-17-alpha-1-propionil-androsta-1,4,6-trione-3-one, Roussel Uclaf Research Centre, France), qui est un agoniste de RG.

La liaison des deux types de récepteurs aux glucocorticoïdes est calculée comme la différence de la liaison totale et de la liaison non-spécifique. La liaison des RG est calculée comme la différence de la liaison des récepteurs aux glucocorticoïdes et de la liaison des RM [287].

L'incubation dure 6 h à 0°C. Cette durée est déterminée d'après une étude pilote que nous avons réalisée et qui a démontré une dégradation du complexe récepteur-protéine pour des durées supérieures à ce temps.

La fraction liée est séparée de la fraction libre par filtration par gel sur des colonnes Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Suède) à 4°C. Cent µl de solution d'incubation sont perfusées, puis des lavages avec 900 µl de tampon de dosage (pH 7,4, contenant 5 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 mM Na-molybdate, 1 mM 2-mercaptoéthanol) sont réalisés. La radioactivité de la solution éluée est comptée après l'addition de 2 ml d'éthanol 100° et de 8 ml de cocktail de scintillation à la dioxine. Un aliquote de la solution éluée est utilisé pour la détermination du contenu en protéines par la méthode de Lowry [288]. Des échantillons de tous les groupes expérimentaux sont utilisés dans chaque dosage. Un aliquote de cytosol du premier dosage est gardé et dosé les fois suivantes, comme standard interne. Chaque dosage est réalisé en double.

11 Quantification des récepteurs aux glucocorticoïdes par Western Blot

Selon la littérature [289] et selon nos études pilotes, qui ont démontré une augmentation forte de l'expression des RG chez les animaux surrénalectomisés, la régulation *in vivo* de l'expression de cette protéine peut être étudiée par Western Blot sur préparation de cellules entières. Cette procédure présente l'avantage important – par rapport aux études de liaison de récepteurs – de pouvoir mesurer l'expression de la protéine RG chez les animaux non-surrénalectomisés.

Préparation des tissus

Les animaux sont sacrifiés entre 15 et 16 h. Ils sont anesthésiés par du Kétalar (Panpharma, France, 15 mg/kg de poids corporel) et une perfusion intracardiaque avec 200 ml

de soluté physiologique est pratiquée. L'adénohypophyse, les hippocampes, et une partie du cortex sont prélevés dès que la perfusion est finie, et stockés à -80°C jusqu'au dosage.

Une partie de cerveau contenant l'hypothalamus est également prélevée et refroidie à -80°C . Ces prélèvements sont ensuite débités au cryostat à -10°C en coupes frontales de 500 μm d'épaisseur qui sont récupérées sur lames. Les coupes sont maintenues au-dessus de vapeurs d'azote liquide dans le champ d'observation d'une loupe binoculaire. L'hypothalamus est alors prélevé sur trois lames à l'aide d'un scalpel. Les échantillons sont récupérés à sec et maintenus à -80°C .

Les tissus de différentes régions cérébrales sont découpés en petits morceaux avec un scalpel et incubés pendant 30 min à 4°C avec 100 μl de tampon d'homogénéisation / 10 mg de tissu. Le tampon d'homogénéisation est un tampon Tris 25 mM (pH 7,6, 4°C), contenant 250 mM de glucose, 150 mM de NaCl, 10 mM d'EGTA, 2 mM d'EDTA, 5 mM de MgCl_2 , 0,5 mM de CaCl_2 , 5 mM de dithiothreitol, 1mM d'orthovanadate, et 2 tablettes d'un cocktail d'inhibiteurs protéolytiques (Complete, Boehringer Mannheim, Almere, Pays-Bas) / 25 ml. Les tissus sont ensuite homogénéisés par ultrasons, et 1% de Tween-20 et 1% de Triton-X100 sont ajoutés à l'homogénat. Après 30 min d'incubation, l'homogénat est centrifugé (20000 g) pendant 20 min à 4°C , et le surnageant (cytosol) est aliquoté puis stocké à -20°C .

La concentration des échantillons est déterminée avec le réactif Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), puis ramenée à une concentration finale de 1,5 mg/ml. Ils sont mélangés avec le tampon "échantillon" (pH 6,8, contenant 50 mM dithiothreitol, 3 mM EDTA, 8% SDS, 20% glycérol, 250 mM Tris, 0,01% bleu de bromophénol), et chauffés à 95°C pendant 4 minutes.

Electrophorèse et Western Blot

Les protéines sont séparées par une électrophorèse de gel SDS-polyacrylamide selon la méthode de Laemmli [290]. Le gel de concentration, pH 6,8 contient 3% d'acrylamide, 0,08% de bis-acrylamide, 0,125 M de Tris, 0,1% de SDS, 0,025% d'ammonium-persulfate et 0,04% V/V TEMED (Bio-Rad). Le gel de séparation, pH 8,8 contient 8% d'acrylamide, 0,2% de bis-acrylamide, 0,375 M de Tris, 0,1% de SDS, 0,025% d'ammonium-persulfate et 0,064% V/V TEMED. Après polymérisation, 10 mg des échantillons sont déposés dans les puits du gel de concentration, ainsi que 10 μl de solution standard de poids moléculaires (Prestained SDS-Page standard, broad range ; Bio-Rad). L'électrophorèse se fait pendant 1,5 h à 20 mA -

250V dans le gel de concentration, et pendant 2 h à 50 mA – 500V dans le gel de séparation. Le tampon d'électrophorèse contient 24 mM Tris, 0,2 M glycine et 0,1 % SDS (pH 8,3).

Les protéines séparées sont transférées par électrophorèse des gels sur des membranes en nitrocellulose (NY 12N, Nytran ; Schleicher & Schuell, Allemagne) dans un tampon Tris pH 8,3 contenant 25 mM Tris, 190 mM glycine et 20 V/V % méthanol selon la méthode de Towbin et ses collaborateurs [291]. Le transfert dure 60 min à 50 V et à 160 mA (pour une surface de 12 cm x 14 cm).

La membrane est saturée 30 min dans un tampon TBS (pH 8,0, 50 mM Tris, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl), contenant 5% de poudre de lait sans graisse. Elle est ensuite incubée une nuit (16 h) à température ambiante avec un antisérum polyclonal de lapin (0,25 µg/ml TBS ; GR M-20, Santa Cruz Biotech., CA, USA). La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin (1 :600, Bio-Rad) pendant 90 minutes. Elle est rincée pendant 10 min successivement dans le tampon TBS, dans le tampon TBS contenant 0,2% Tween-20, dans le tampon TBS puis dans un tampon Tris-HCl pH 7,6, 0,05M. Les bandes immunopositives sont visualisées avec la réaction de diamine-benzidine (0,19 mM) et de H₂O₂ (0,02 V/V %) dans du tampon Tris-HCl durant 25 min, qui est suivi de trois lavages dans le tampon Tris-HCl.

La surface et la densité optique (intensité) de bandes réactives aux RG est mesurée avec un système d'analyse d'images (NIH Image software), et l'intensité relative est calculée en divisant l'intensité par la surface. Les densités optiques d'arrière-plan sont mesurées pour chaque image d'un blot et soustraites de la densité optique obtenue pour chaque bande immunoréactive.

Pour chaque expérience, les échantillons sont mesurés en double. Les différents traitements sont contrebalancés.

12 Dosages radioimmunologiques

Les échantillons sanguins dosés proviennent soit de l'expérience de la contention, soit des animaux sacrifiés par décapitation à la guillotine. La décapitation à la guillotine se fait sur des rats non anesthésiés, dans la minute qui suit le début de leur manipulation. Dans les deux cas, les échantillons de sang sont prélevés dans les tubes contenant un anticoagulant

(400 µl par tube d'une solution d'EDTA de 2% pour le sang des rats adultes ; des tubes rincés avec cette solution et séchés pour le sang des petits) et gardés sur la glace jusqu'à la centrifugation (20 minutes à 2000 g à 4°C). Les aliquotes de plasma sont stockés à -20°C jusqu'au dosage.

Le dosage radioimmunologique de l'ACTH est réalisé à l'aide des Kits Allegro (Mallinkrodt, France). La sensibilité du dosage est de 1 pg/tube de plasma et les coefficients de variation intra- et inter-essai sont respectivement de 4% et 6%.

Le dosage radioimmunologique de la CORT utilise un anticorps préparé et testé par Conte-Devolx et al. [292], et est fait après une extraction par l'éthanol. La sensibilité du dosage est de 7,5 ng/ml de plasma et les coefficients de variation intra- et inter-essai sont respectivement 6% et 8%.

13 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne encadrée de l'erreur standard de la moyenne (SEM). La comparaison des valeurs des différents groupes de traitements néonataux et la signification des différences se fait à l'aide de divers tests.

Notamment, les données des analyses d'images sont analysées par un test de Kruskal-Wallis (ou de médian), suivi, si ce test est significatif, de tests U de Mann-Whitney. Les autres données non-évolutives sont soumises à un test t de Student dans le cas de deux groupes (changement du poids des portées induit par la séparation maternelle), ou dans le cas de plusieurs groupes, à une analyse de variance simple ou multiple suivie, si elle est significative, par un test de LSD (simple : taux basaux d'ACTH et de CORT, poids des surrénales, capacité de liaison des RG et les RM, prise alimentaire basale, poids des tissus adipeux des rats cafétéria, comportement dans l'*open field* ; multiple : taux d'ACTH et de CORT avec ou sans stress d'éther, taux d'ACTH et de CORT des rats à jeun ou non, poids des surrénales avec ou sans stress d'éther, poids des surrénales des rats à jeun ou non).

Les données suivant une évolution dans le temps sont analysées par soumises à une analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées suivie, si elle est significative, par un test

de LSD (poids corporels, prise alimentaire mesurée plusieurs fois suivant une manipulation, effet de la contention sur les taux d'ACTH et de CORT).

Les données nominales sont soumises à un test de Chi² suivi d'une correction de Yates (présence de la bande plus haute, plus basse ou les deux immunoréactives de RG dans le Western Blot).

Quelques données ne sont pas soumises à des analyses statistiques, principalement à cause de la faiblesse des effectifs (surface et intensité des bandes de RG dans le Western Blot, ARNm de peptides dans le NPV des rats cafétéria).

Dans tous les tests, une différence est jugée significative pour une probabilité inférieure à 5%.

RÉSULTATS

1 Effets immédiats

1.1 Poids corporel

Le poids corporel des portées entières est mesuré avant et après 24 h de séparation maternelle, ou pendant la période correspondante pour les témoins (*Matériels et méthodes 2, 3.1*).

La séparation maternelle aux deux âges néonataux induit une diminution significative du poids corporel (JPN 5 : -6,6%, JPN 14 : -9,4% comparé au poids initial), tandis qu'une augmentation du poids corporel apparaît chez les portées témoins (+13,5% et +5,3%, pour les âges respectifs). Les poids des portées expérimentales et témoins, qui sont similaires avant la séparation, deviennent ainsi statistiquement différents (JPN 5 : $t_{21}=5,6$, $p=0,00001$, JPN 14 : $t_{22}=4,9$, $p=0,00007$; Figure 3).

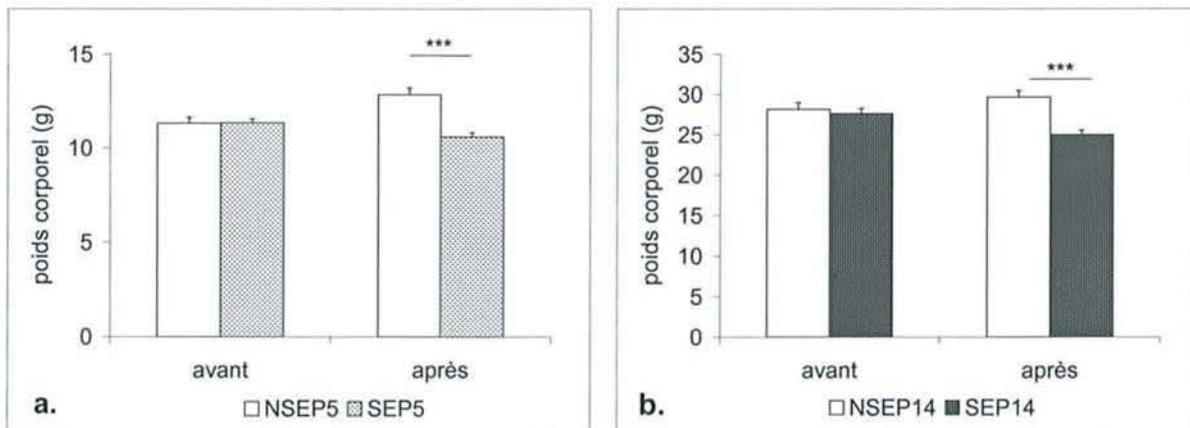


Figure 3. Poids des animaux avant et après la séparation maternelle. **a.** le sixième jour postnatal, **b.** le quinzième jour postnatal. *** $p < 0,001$

1.2 Observations neuroendocriniennes

1.2.1 ARN messagers des neuropeptides CRH et VP dans le NPV

L'expression des ARNm de la CRH et de la VP est évaluée par hybridation *in situ* dans le NPV des rats sacrifiés immédiatement après 24 h de séparation maternelle, ou pendant la période correspondante pour les témoins (*Matériels et méthodes 3.1, 12*). Pour chaque traitement néonatal, âge et expérience, les paramètres des cerveaux des mâles et des femelles sont similaires, ce qui nous a permis de les regrouper pour l'analyse statistique suivante.

Pour tous les paramètres étudiés - nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP et de la CRH, et leurs intensités -, les quatre groupes (NSEP5, SEP5, NSEP14, SEP14) sont différents (nombre VP : $H(3,N=36)=16,7$, $p=0,0008$; intensité VP : $H(3,N=36)=17,4$, $p=0,0006$; nombre CRH : $H(3,N=36)=16,0$, $p=0,001$; intensité CRH : $H(3,N=36)=15,7$, $p=0,001$).

Comparaison NSEP5-SEP5

Le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP ainsi que l'intensité de son expression sont similaires chez les rats SEP5 et NSEP (Figures 4, 5). Dans le cas de l'ARNm de la CRH, il n'existe pas non plus de différence entre les différents traitements néonataux (Figures 5, 6).

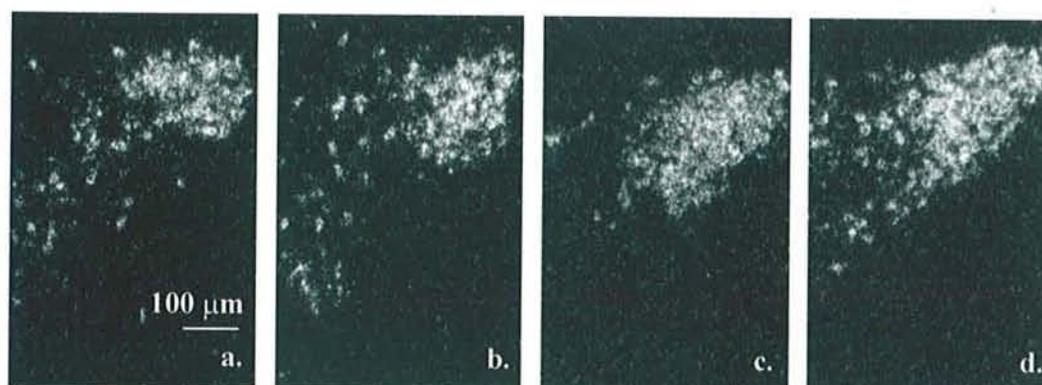


Figure 4. Images représentatives de l'expression de l'ARNm de la VP dans le NPV des rats. **a.** NSEP5, **b.** SEP5, **c.** NSEP14, **d.** SEP14.

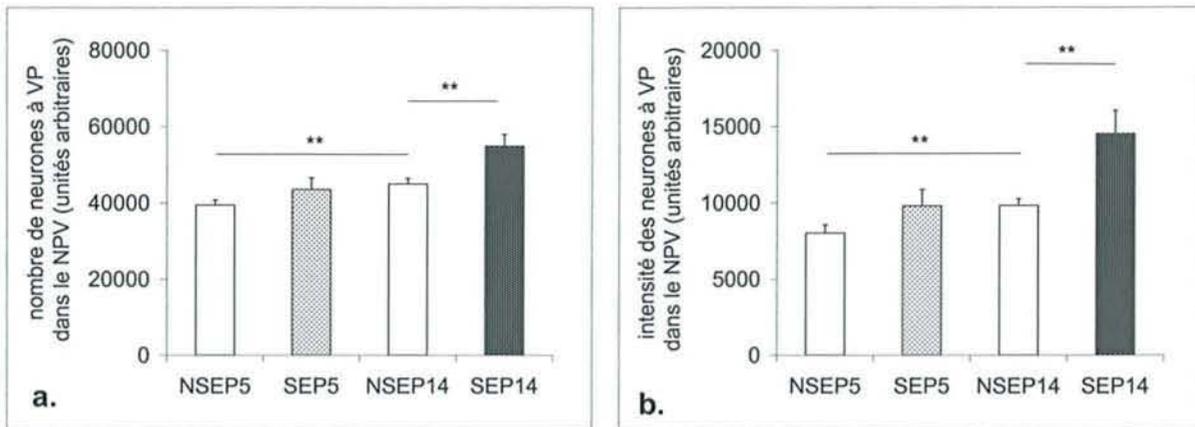


Figure 5. Nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP (a) et intensité de l'expression (b) dans le NPV des cerveaux recueillis après 24 heures de séparation maternelle ou à la période correspondante (pour les témoins). ** $p < 0,01$

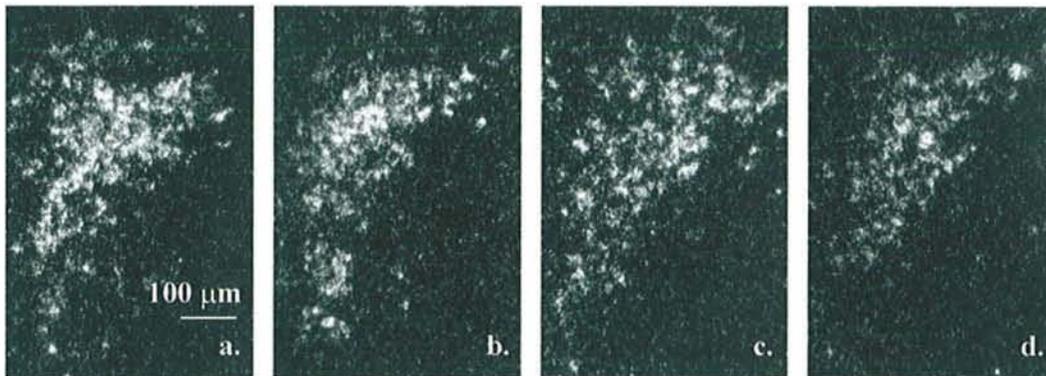


Figure 6. Images représentatives de l'expression de l'ARNm de la CRH dans le NPV des rats. a. NSEP5, b. SEP5, c. NSEP14, d. SEP14.

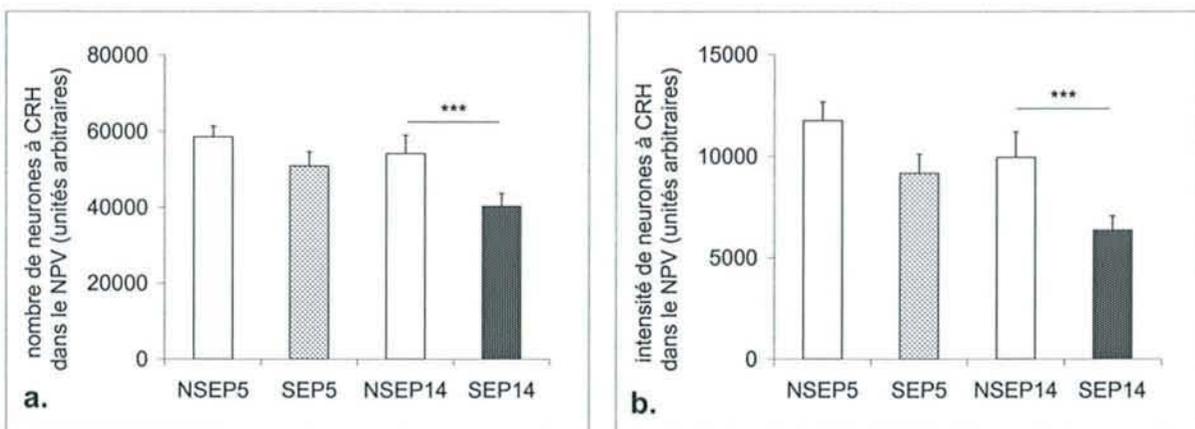


Figure 7. Nombre de neurones exprimant l'ARNm de la CRH (a) et intensité de l'expression (b) dans le NPV des cerveaux recueillis après 24 heures de séparation maternelle ou à la période correspondante (pour les témoins). *** $p < 0,001$

Comparaison NSEP14-SEP14

Le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP ainsi que l'intensité de son expression sont élevés chez les rats SEP14 comparé aux NSEP (nombre : $Z=2,49$, $p=0,01$; intensité : $Z=3,19$, $p=0,01$; Figures 4, 5). Au contraire, le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la CRH ainsi que l'intensité de son expression sont diminués chez les rats SEP14 comparé aux NSEP (nombre : $Z=3,41$, $p=0,0006$; intensité : $Z=3,41$, $p=0,0006$; Figures 6, 7).

Comparaison NSEP5-NSEP14

Le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP ainsi que l'intensité de son expression sont plus importants chez les rats témoins âgés de 14 jours que chez les rats témoins âgés de 5 jours (nombre : $Z=3,02$, $p=0,002$; intensité : $Z=2,72$, $p=0,006$; Figures 4, 5). Au contraire, le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la CRH ainsi que l'intensité de son expression sont similaires chez les rats de deux âges (Figures 6, 7).

1.2.2 Immunoréactivité des protéines CRH et VP

L'immunoréactivité de la CRH et de la VP est évaluée par immunocytochimie dans le NPV et l'EM des rats sacrifiés immédiatement après 24 h de séparation maternelle, ou pendant la période correspondante pour les témoins (*Matériels et méthodes 3.1, 9*). Pour chaque traitement néonatal, âge et expérience, les paramètres des cerveaux des mâles et des femelles sont similaires, ainsi leurs données ont été regroupées pour l'analyse statistique suivante.

1.2.2.1 Dans le NPV

Le nombre de cellules à VP dans le NPVp des quatre groupes (NSEP5, SEP5, NSEP14, SEP14) ne sont pas différents. Cependant, le nombre de cellules à CRH dans le NPV des quatre groupes sont différents ($H(3,N=31)=19,9$, $p=0,0002$), ainsi que le nombre de cellules où la VP et la CRH sont colocalisées ($H(3,N=27)=13,5$, $p=0,004$).

Comparaison NSEP5-SEP5

Le nombre de neurones de la partie parvocellulaire du NPV contenant la VP est similaire chez les SEP5 et les NSEP5 (Figures 8, 9a). Il n'y a également pas de différence concernant le nombre des neurones contenant la CRH (Figures 9b, 10), ou le nombre de cellules où la VP et la CRH sont colocalisées (Figure 9c).

Comparaison NSEP14-SEP14

Le nombre de neurones de la partie parvocellulaire du NPV contenant la VP est similaire chez les SEP14 et les NSEP14 (Figures 8, 9a). Le nombre de neurones contenant la CRH est diminué chez les SEP14 par rapport aux NSEP14 ($Z=2,14$, $p=0,03$; Figures 9b, 10). Le nombre de cellules où la VP et la CRH sont colocalisées ne diffère pas entre les SEP14 et les NSEP14 (Figure 9c).

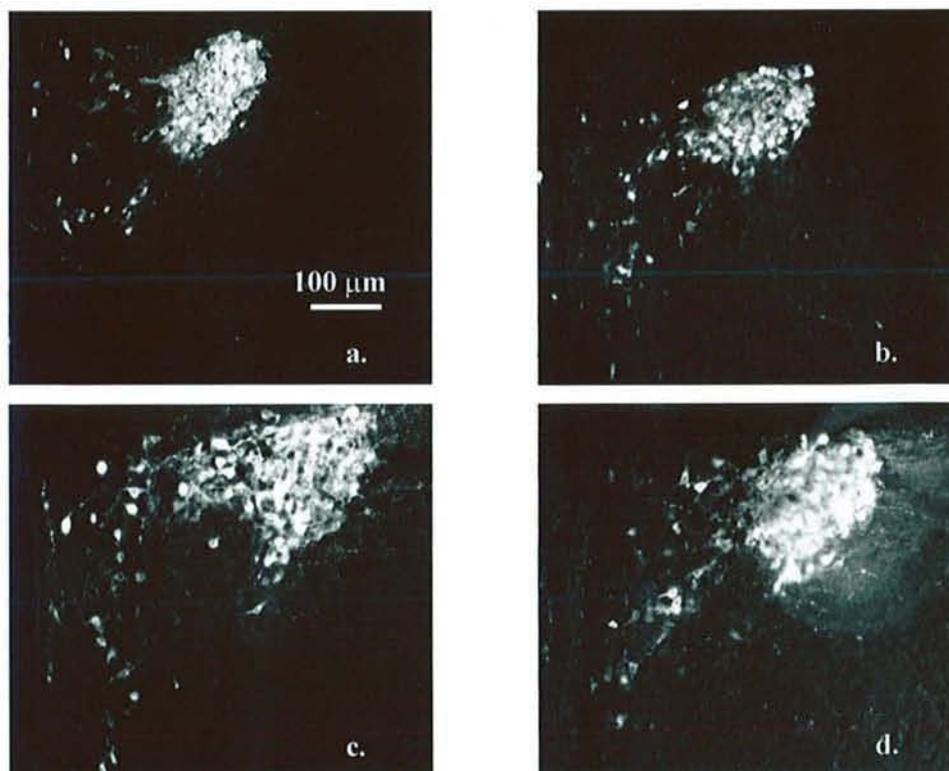


Figure 8. Images représentatives de l'immunoréactivité de VP dans le NPV des rats. **a.** NSEP5, **b.** SEP5, **c.** NSEP14, **d.** SEP14.

Comparaison NSEP5-NSEP14

Le nombre de neurones de la partie parvocellulaire du NPV contenant la VP est similaire chez les NSEP5 et les NSEP14 (Figures 8, 9a). Le nombre de neurones contenant la CRH est augmenté chez les NSEP14 par rapport aux NSEP5 ($Z=2.71$, $p=0,007$; Figures 9b, 10). Le nombre de cellules où la VP et la CRH sont colocalisées est également plus important chez les NSEP14 ($Z=2,31$, $p=0,02$; Figure 9c).

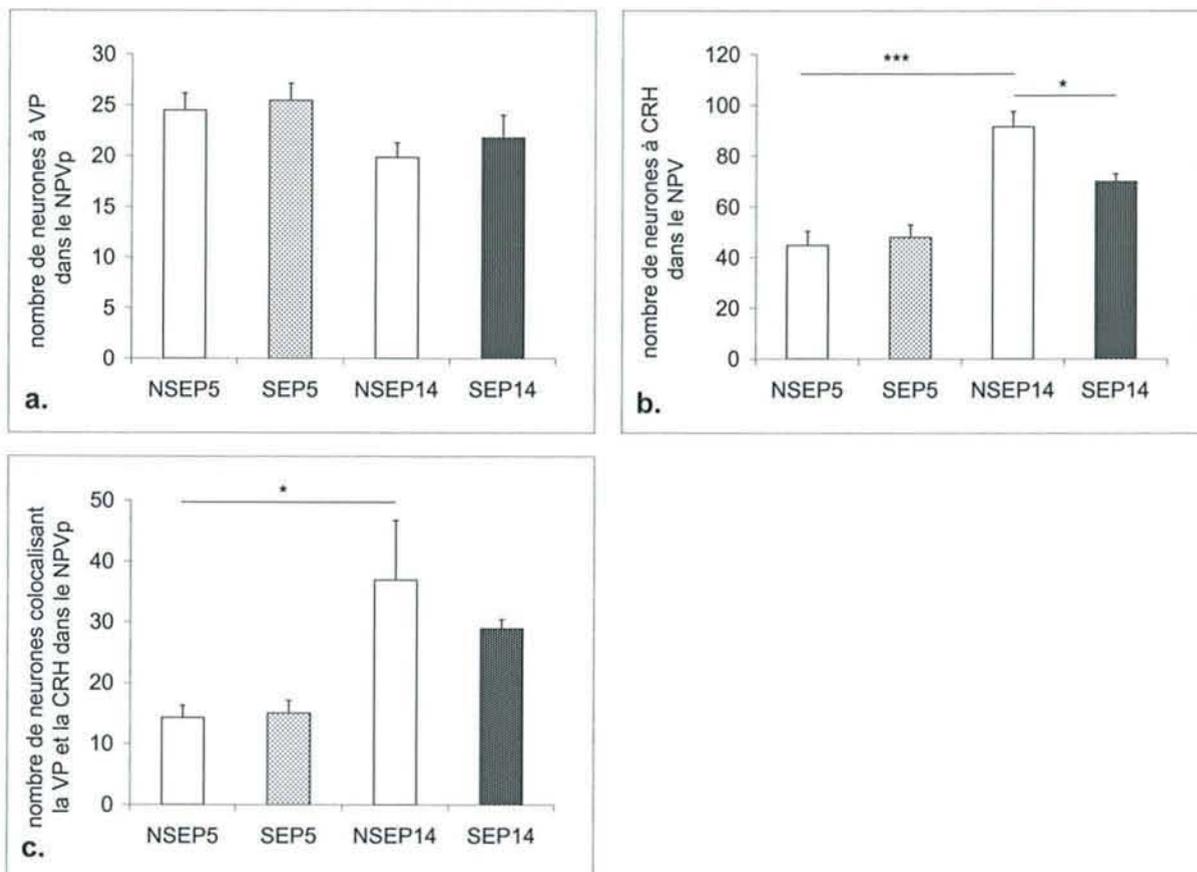


Figure 9. Nombre de neurones exprimant la VP (a), la CRH (b) ou les deux (c) dans le noyau paraventriculaire. * $p<0,05$, *** $p<0,001$

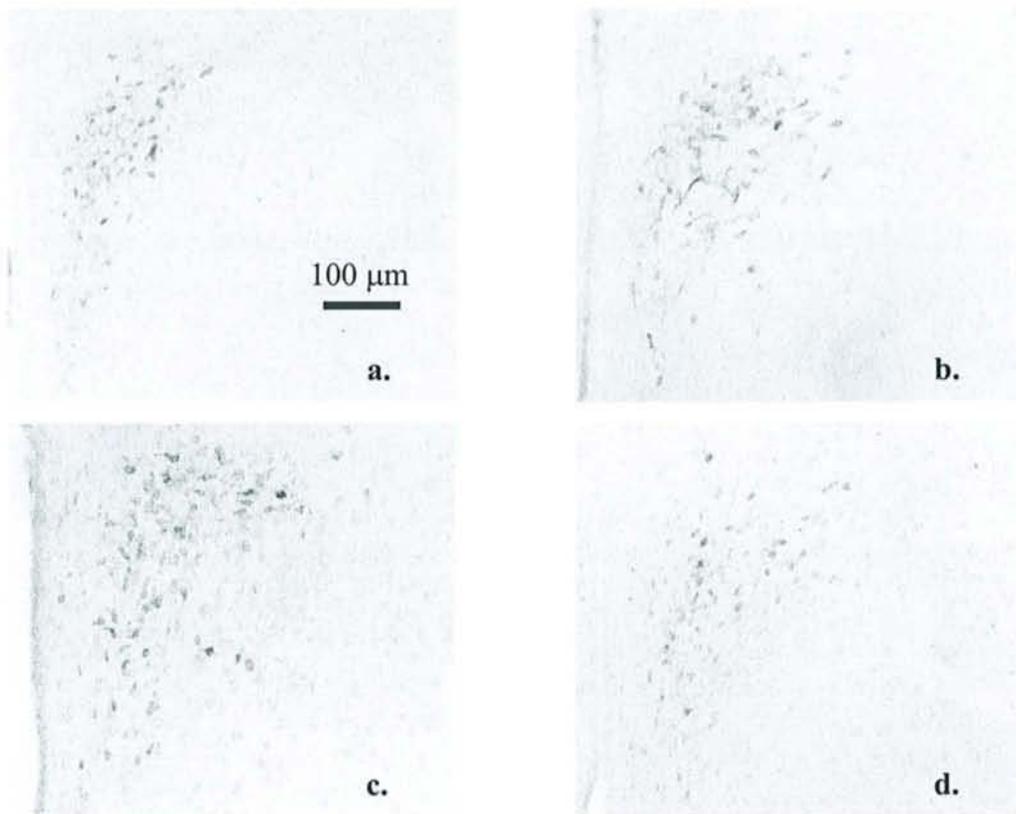


Figure 10. Images représentatives de l'immunoréactivité de CRH dans le NPV des rats. **a.** NSEP5, **b.** SEP5, **c.** NSEP14, **d.** SEP14.

1.2.2.2 Dans l'éminence médiane

La surface et la densité optique de l'éminence médiane interne (EMI) immunoréactive à la VP des quatre groupes sont similaires selon le test de Kruskal-Wallis, mais différentes selon le test de médiane ($\text{Chi}^2=8,2$, $\text{ddl}=3$, $p=0,04$). La surface de l'éminence médiane externe (EME) immunoréactive à la VP des quatre groupes ne diffère pas. Les densités optiques de l'EME immunoréactive à la VP des quatre groupes sont différentes ($H(3, N=19)=8,0$, $p=0,04$). La surface et la densité optique de l'EM immunoréactive à la CRH des quatre groupes sont différentes (surface : $H(3, N=27)=14,5$, $p=0,002$; densité optique : $H(3, N=27)=8,5$, $p=0,03$).

Comparaison NSEP5-SEP5

La surface et la densité optique de l'EMI contenant la VP est similaire chez les SEP5 et les NSEP5 (Figures 11a-b, 12 a-b). Il n'y a pas de différence non plus entre les traitements en ce qui concerne la surface de l'EME contenant la VP et l'intensité du marquage (Figures

11a-b, 12c-d). La surface de l'EM contenant la CRH et l'intensité du marquage ne sont pas différents entre les deux traitements (Figures 13a-b, 14).

Comparaison NSEP14-SEP14

La surface de l'EMI contenant la VP ainsi que l'intensité du marquage sont plus importantes chez les SEP14 (surface : $Z5=2,02$, $p=0,04$; intensité : $Z5=2,02$, $p=0,04$; Figures 11c-d, 12a-b). La surface de l'EME contenant la VP ne diffère pas chez les deux traitements, mais une augmentation de la densité optique de l'EME apparaît chez les SEP14 ($Z5=2,02$, $p=0,04$; Figures 11c-d, 12c-d). La surface de l'EM contenant la CRH des deux traitements ne diffère pas, cependant, l'intensité du marquage est élevée chez les SEP14 ($Z6=2,20$, $p=0,03$; Figures 13c-d, 14a-b).

Comparaison NSEP5-NSEP14

La surface de l'EMI contenant la VP et l'intensité du marquage sont similaires chez les NSEP5 et les NSEP14 (Figures 11a, 11c, 12a-b). La surface de l'EME contenant la VP est également similaire, cependant, l'intensité du marquage est plus importante chez les NSEP5 ($Z6,5=2,56$, $p=0,01$; Figure 11a, 11c, 12c-d). La surface de l'EM contenant la CRH est plus importante chez les NSEP14 que chez les NSEP5 ($Z7,7=2,36$, $p=0,02$), cependant, l'intensité du marquage ne diffère pas entre les âges (Figures 13a, 13c, 14a-b).

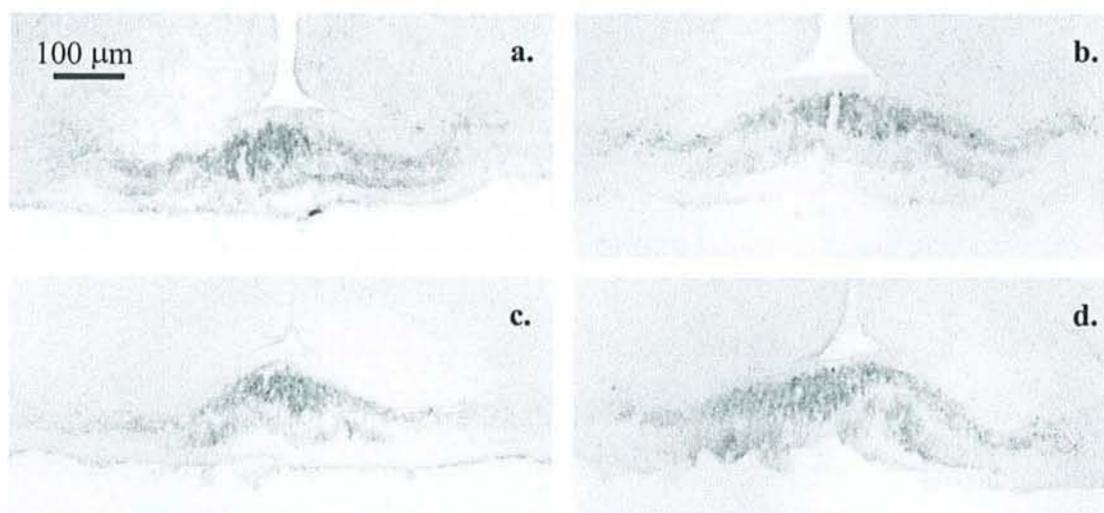


Figure 11. Images représentatives de l'immunoréactivité de VP dans l'EM des rats. **a.** NSEP5, **b.** SEP5, **c.** NSEP14, **d.** SEP14.

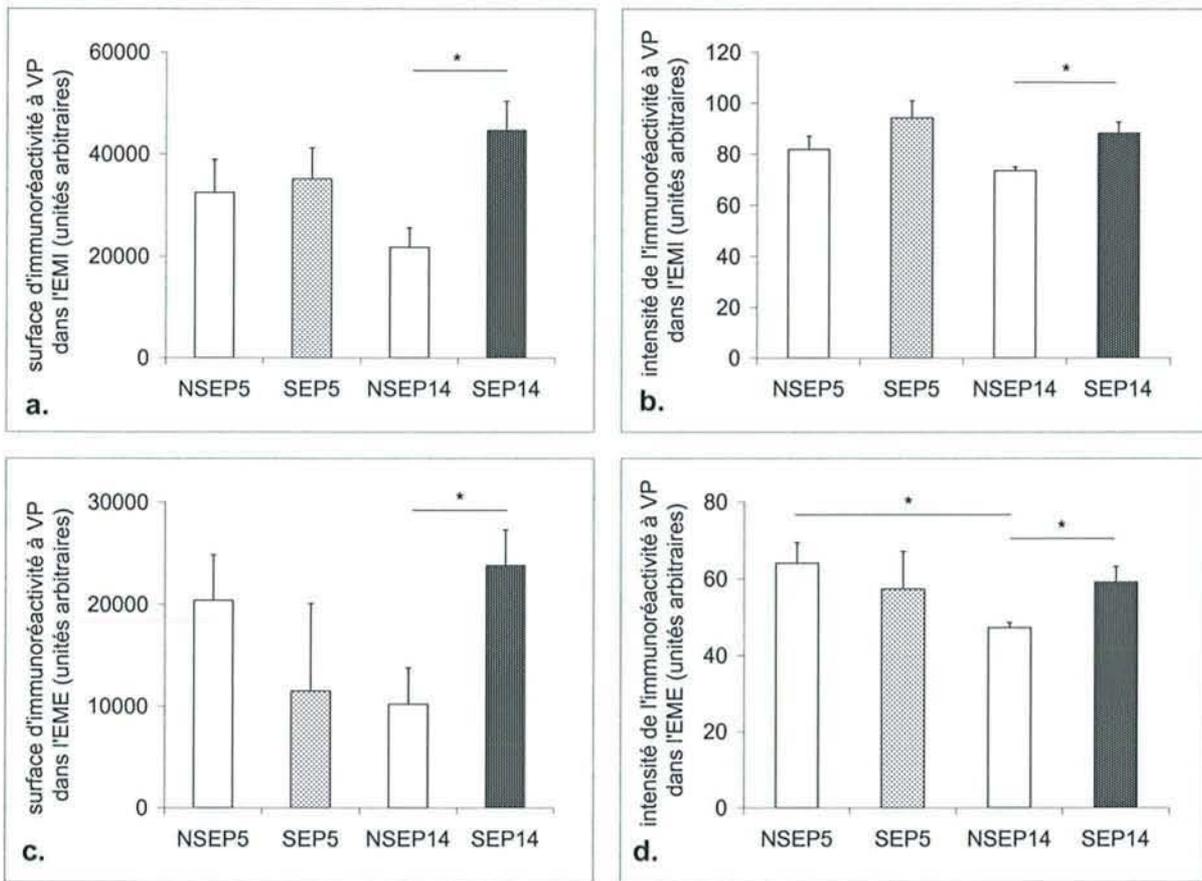


Figure 12. Quantification de la vasopressine dans l'éminence médiane : **a.** surface et **b.** intensité du marquage dans la partie interne ; **c.** surface et **d.** intensité dans la partie externe. * $p < 0,05$

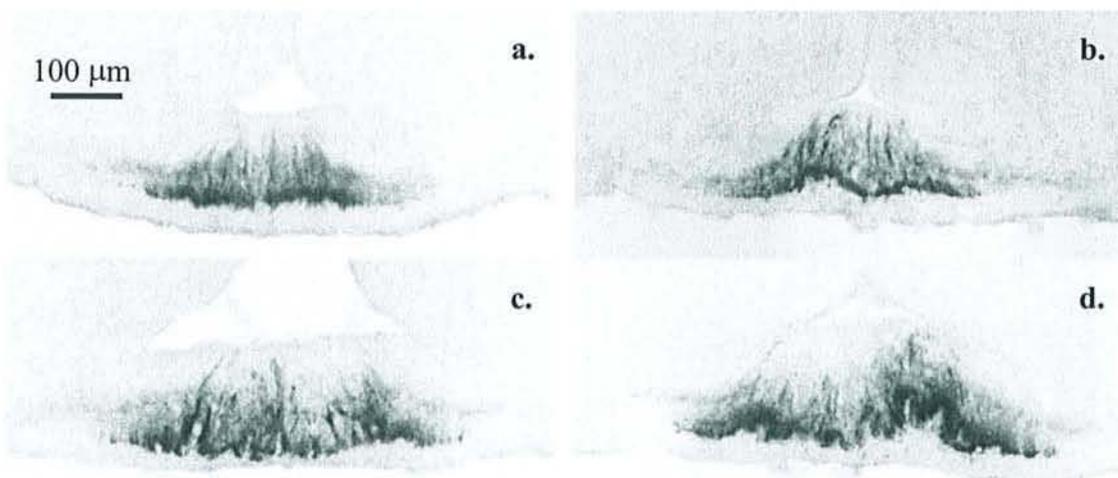


Figure 13. Images représentatives de l'immunoréactivité de CRH dans l'EM des rats. **a.** NSEP5, **b.** SEP5, **c.** NSEP14, **d.** SEP14.

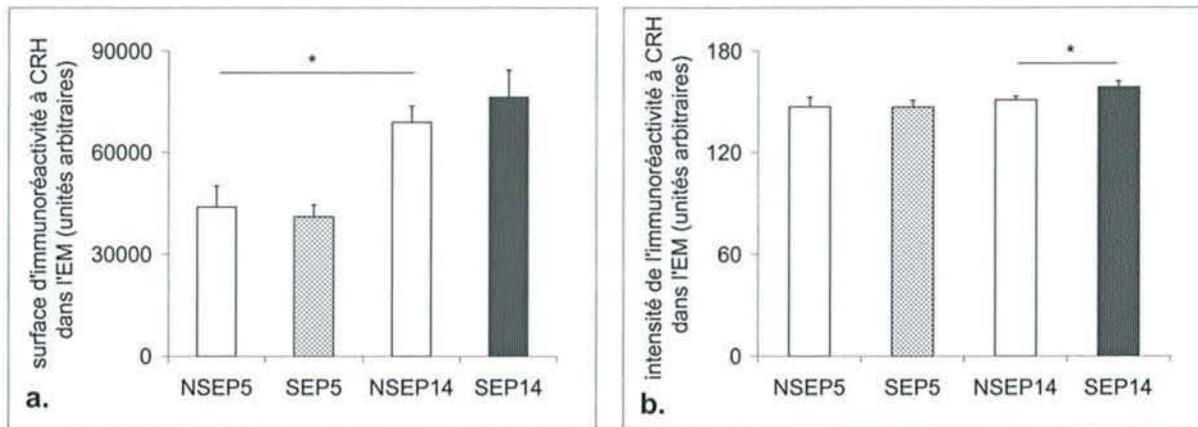


Figure 14. Quantification de la CRH dans l'éminence médiane : **a.** surface, **b.** intensité du marquage. * $p < 0,05$

1.2.3 Taux d'ACTH et de CORT

Les taux plasmatiques d'ACTH et de CORT sont évalués par dosage radioimmunologique dans les échantillons prélevés immédiatement après 24 h de séparation maternelle, ou pendant la période correspondante pour les témoins (*Matériels et méthodes 3.1, 12*). Le sexe des animaux ne jouant pas sur les taux d'ACTH et de CORT, leurs données sont rassemblées pour l'analyse statistique.

ACTH

Les taux d'ACTH des quatre groupes expérimentaux (NDEP5, DEP5, NDEP14, DEP14) sont différents ($F_{3,46}=28,3$, $p < 0,00001$). Le cinquième jour postnatal la séparation maternelle n'a pas d'effet sur les niveaux d'ACTH. Cependant, une séparation maternelle réalisée le quatorzième jour induit une augmentation de 165% ($p=0,03$). Les niveaux basaux des témoins âgés de 14 jours sont plus importants que ceux des témoins âgés de 5 jours ($p < 0,00001$; Figure 15a).

CORT

Les taux de CORT des quatre groupes expérimentaux sont différents ($F_{3,21}=41,8$, $p < 0,00001$). Le JPN5, la séparation maternelle augmente les taux de CORT de 90%, mais cette augmentation n'est pas significative. Une augmentation significative de 349% est induite par la séparation maternelle le JPN14 ($p < 0,0001$). La différence entre les niveaux

basaux des témoins âgés de 14 jours et ceux des témoins âgés de 5 jours n'est pas significative, mais une tendance d'augmentation avec l'âge est apparente ($p=0,1$; Figure 15b).

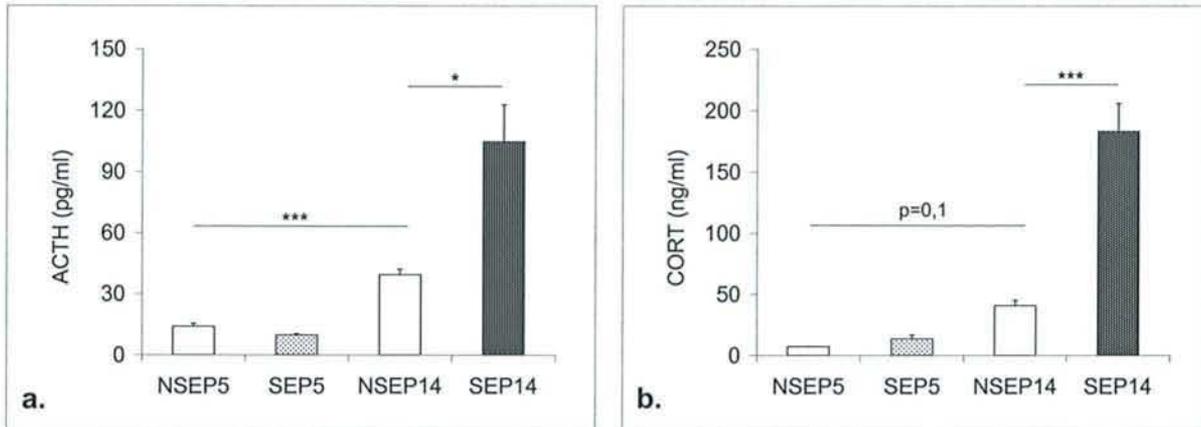


Figure 15. Taux plasmatiques d'ACTH (a.) et de CORT (b.) des rats âgés de 6 ou de 15 jours mesurés à l'issue des 24 heures de séparation maternelle ou dans la période correspondante chez les témoins. * $p<0,05$, *** $p<0,001$

1.2.4 Poids des surrénales

Le poids des surrénales des rats sacrifiés immédiatement après 24 h de séparation maternelle, ou pendant la période correspondante pour les témoins est mesuré (*Matériels et méthodes 3.1, 9*). Le sexe des animaux ne jouant pas sur le poids des surrénales (% poids corporel), leurs données sont rassemblées pour l'analyse statistique.

Le poids des surrénales des quatre groupes expérimentaux sont différents ($F_{3,100}=11,3$, $p<0,00001$). Le poids des surrénales des rats non-séparés est plus important le JPN 14 que le JPN 5 ($p=0,04$). La séparation n'augmente pas le poids des surrénales le JPN 5, par contre, elle induit une augmentation le JPN14 ($p=0,002$; Figure 16).

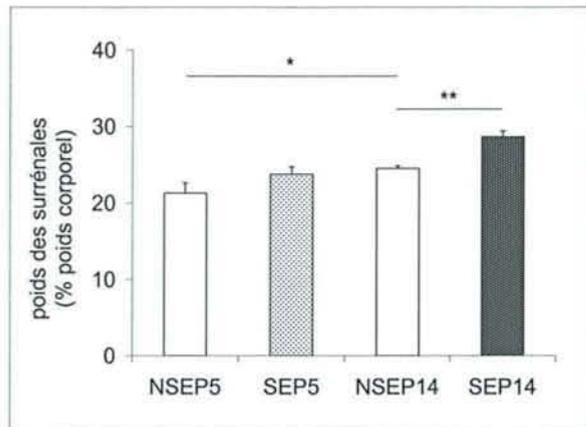


Figure 16. Poids des surrénales des rats âgés de 6 ou de 15 jours prélevées immédiatement après 24 heures de séparation maternelle ou à la période correspondante chez les témoins. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

1.2.5 Récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'adénohypophyse

La quantification des RG est réalisée par une méthode de Western Blot sur des protéines extraites de l'adénohypophyse des rats sacrifiés immédiatement après 24 h de séparation maternelle, ou pendant la période correspondante pour les témoins (*Matériels et méthodes 3.1, 11*).

Le Western Blot met en évidence la protéine RG à un poids moléculaire d'environ 97 kDa (Figure 17). Celle-ci apparaît sous forme de deux bandes très rapprochées pour certains échantillons, ou d'une seule de ces deux bandes pour d'autres (bande haute ou bande basse ; Figure 17). L'analyse de la fréquence d'apparition de ces différents profils est présentée dans la partie "Effets persistants" des résultats. Celle-ci n'est liée ni à l'âge des petits, ni à la séparation maternelle.

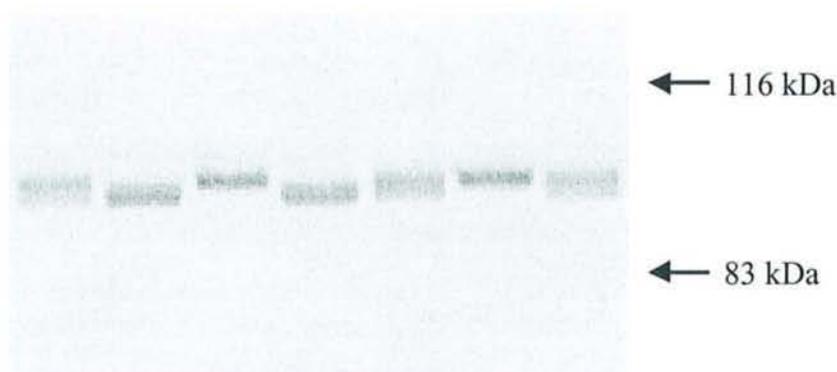


Figure 17. Western Blot représentative des RG de l'adénohypophyse des rats de 5 jours.

L'apparition de deux bandes sur la membrane entraîne une augmentation de surface ce qui doit influencer l'intensité du marquage. C'est pourquoi les échantillons issus du même traitement néonatal mais migrant en tant qu'une ou plusieurs bandes ne peuvent être regroupés pour une analyse statistique. Cependant, si on sépare les échantillons selon le type de migration, le nombre des échantillons pour chaque condition devient faible (Tableau 7.). De plus, nous n'avons pas identifié la cause biologique de la variabilité des échantillons. C'est pourquoi nous ne pouvons pas réaliser d'analyses statistiques sur la surface, l'intensité et l'intensité relative des échantillons, qui sont toutefois présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7. Caractéristiques des bandes immunoréactives aux RG dans l'adénohypophyse des petits rats.

	Surface		Intensité		Intensité relative		N échantillon	
	2 bandes	1 bande	2 bandes	1 bande	2 bandes	1 bande	2 bandes	1 bande
NSEP5	9,2 ± 3,3	9,3 ± 0	178 ± 68	244 ± 0	18,5 ± 1,4	26,3 ± 0,0	4	1
SEP5	11,0 ± 2,4	4,1 ± 1,6	196 ± 65	80 ± 33	16,8 ± 2,2	18,1 ± 1,6	4	4
NSEP14	16,0 ± 1,2	14,7 ± 1,4	629 ± 98	642 ± 99	38,8 ± 6,3	43,1 ± 4,8	3	3
SEP14	13,5 ± 2,5	11,4 ± 1,3	486 ± 105	479 ± 100	35,6 ± 2,6	40,7 ± 7,3	3	4

2 Effets persistants

Tous ces effets ont été mesurés chez des rats mâles âgés de 2 à 4 mois, ayant subi ou non une séparation maternelle de 24 heures, élevés suivant les règles classiques de notre animalerie (*Matériels et méthodes 1, 2, 4*).

2.1 Observations neuroendocriniennes

2.1.1 ARN messagers des neuropeptides CRH et VP dans le NPV

L'expression des ARNm de la CRH et de la VP a été évaluée par hybridation *in situ* dans le NPV des rats adultes (*Matériels et méthodes 3.2.1.8, 3.2.2, 3.2.3, 8*).

Régime standard

Aucune différence entre les trois groupes n'apparaît en ce qui concerne le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP ou de la CRH ainsi que l'intensité de leur expression (Figures 18, 19).

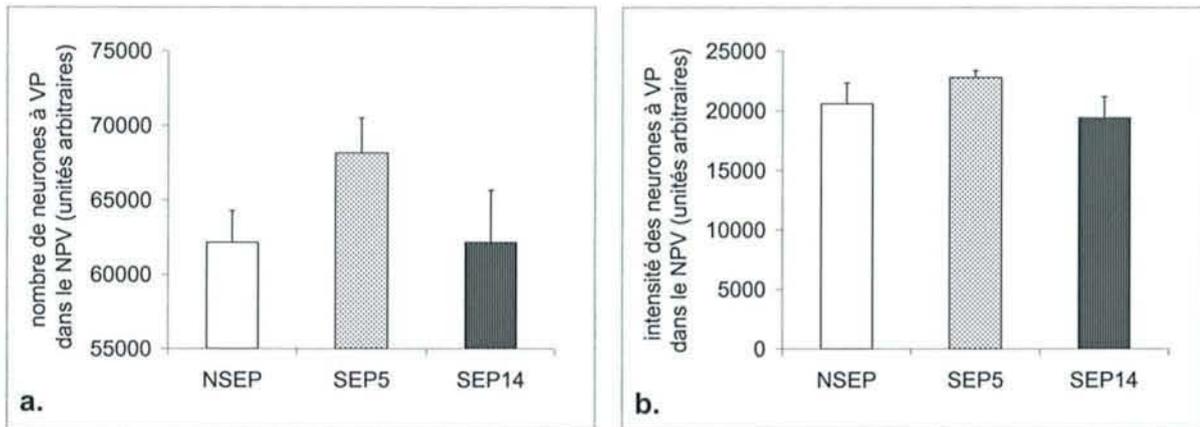


Figure 18. Nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP (a) et intensité de l'expression (b) dans le NPV des trois groupes expérimentaux nourris au régime standard.

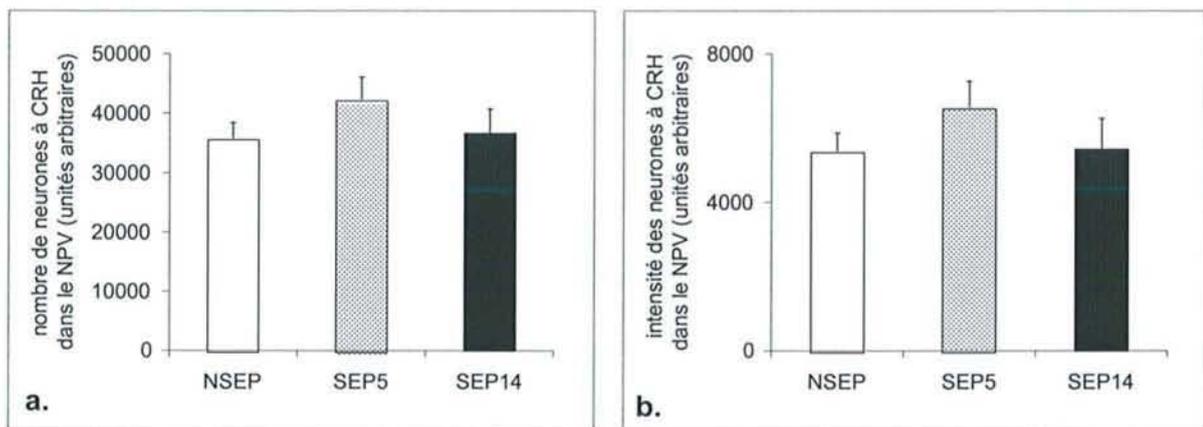


Figure 19. Nombre de neurones exprimant l'ARNm de la CRH (a) et intensité de l'expression (b) dans le NPV des trois groupes expérimentaux nourris au régime standard.

Régime de macronutriments dissociés

Le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP ainsi que l'intensité de son expression sont similaires chez les rats SEP5, SEP14 et NSEP nourris au régime dissocié (Figure 20). Par contre, le nombre de neurones contenant l'ARNm de la CRH est différent ($H(2, N=18)=6,7, p=0,03$) et l'intensité de l'expression tend à être différent ($H(2, N=18)=5,6,$

$p=0,06$) chez les trois groupes. En particulier, ces valeurs sont élevées chez les rats SEP14 par rapport aux NSEP (nombre : $Z_{9,4}=2,2$, $p=0,01$), alors qu'il n'y a pas de différence entre le groupe SEP5 et NSEP (Figure 21).

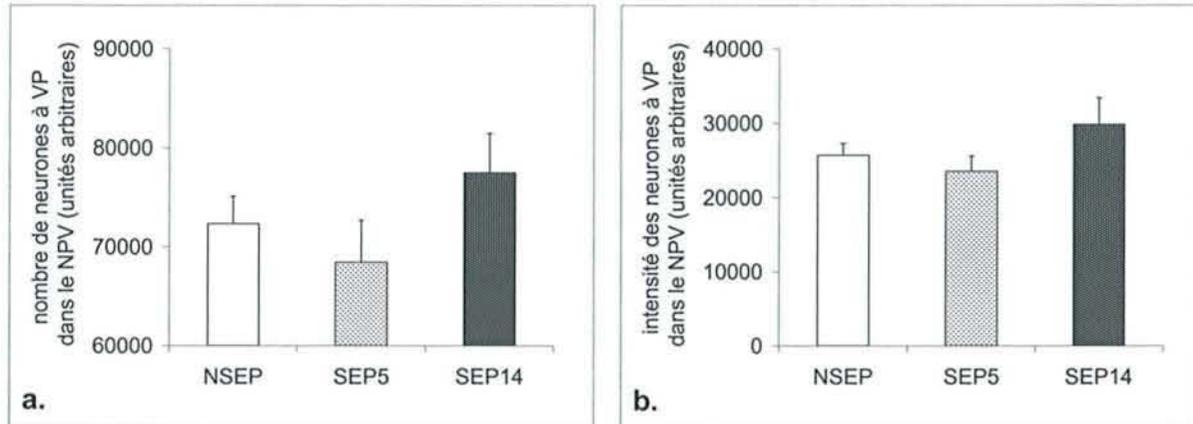


Figure 20. Nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP (a) et intensité de l'expression (b) dans le NPV des trois groupes expérimentaux nourris des trois macronutriments dissociés.

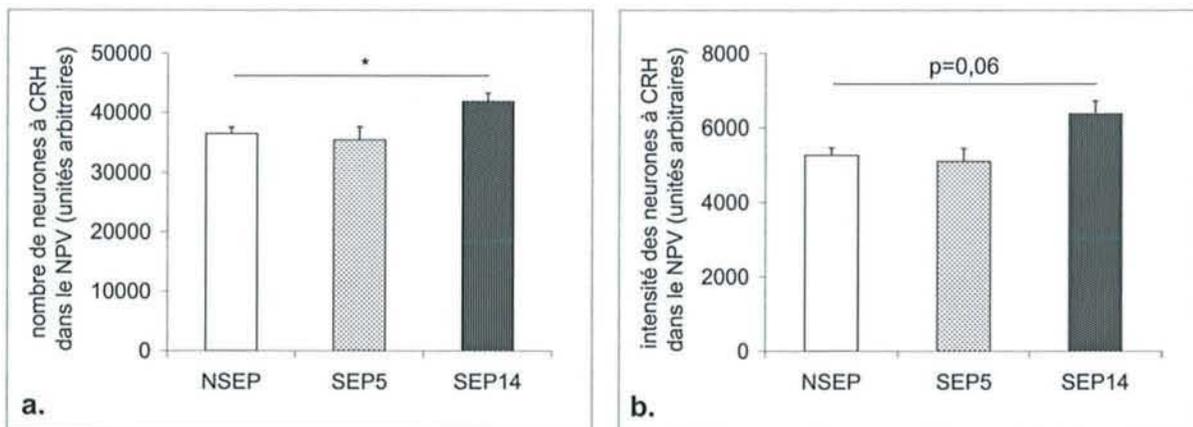


Figure 21. Nombre de neurones exprimant l'ARNm de la CRH (a) et intensité de l'expression (b) dans le NPV des trois groupes expérimentaux nourris des trois macronutriments dissociés. * $p<0,05$

Régime "cafétéria"

En raison du faible effectif dans chaque groupe de traitement, les résultats n'ont pas pu être analysés par des méthodes statistiques. Cependant, il semble que le nombre et l'intensité des neurones exprimant l'ARNm de la VP ne soit affecté ni par un stress d'éther, ni par le traitement néonatal (Figure 22). Par contre, il semble que l'éther diminue le nombre et l'intensité des neurones exprimant l'ARNm de la CRH, qui ne sont pas influencés par le traitement néonatal (Figure 23).

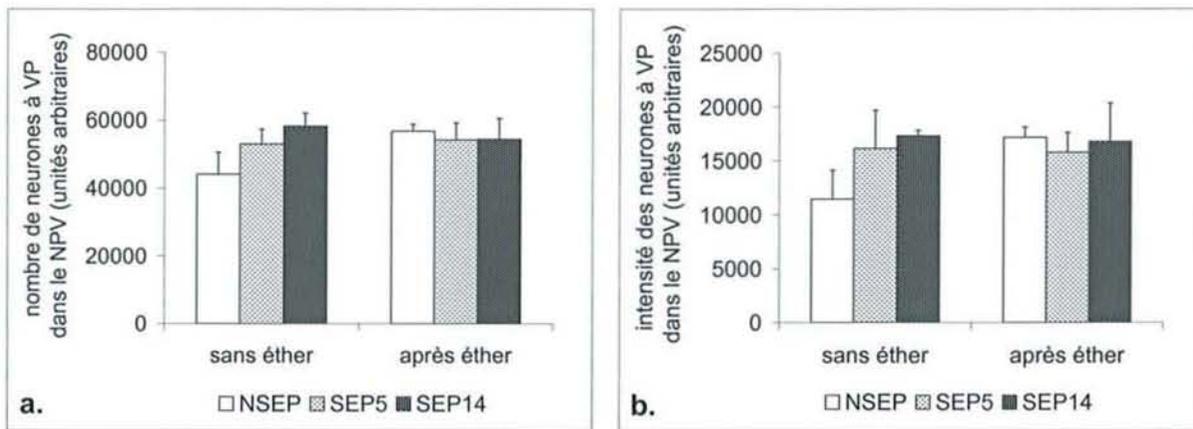


Figure 22. Nombre de neurones exprimant l'ARNm de la VP (a) et intensité de l'expression (b) dans le NPV des trois groupes expérimentaux nourris du régime "cafétéria".

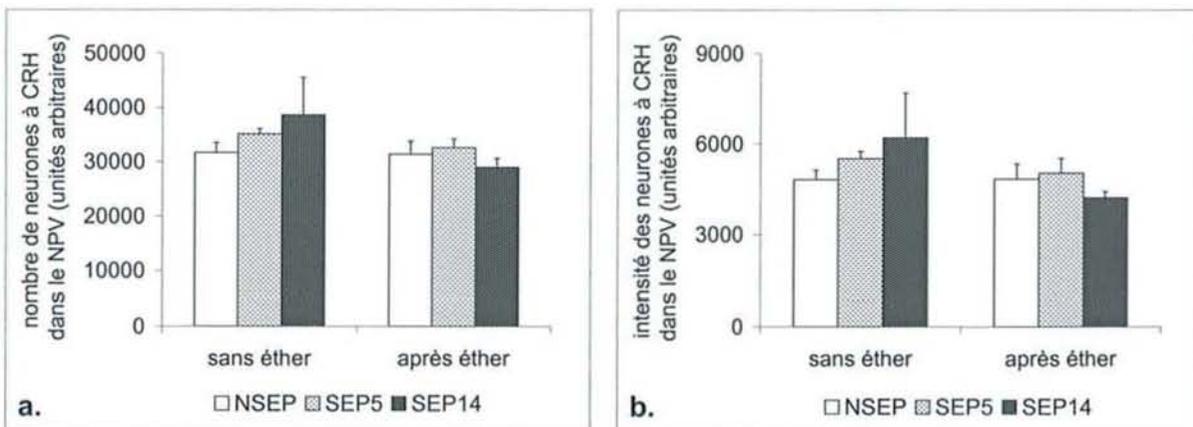


Figure 23. Nombre de neurones exprimant l'ARNm de la CRH (a) et intensité de l'expression (b) dans le NPV des trois groupes expérimentaux nourris du régime "cafétéria".

2.1.2 Taux plasmatiques d'ACTH et de CORT

2.1.2.1 Taux basaux

Les taux basaux d'ACTH et de CORT sont mesurés par dosage radioimmunologique chez les rats adultes nourris au régime standard ou au régime dissocié (*Matériels et méthodes 3.2.1.8, 3.2.2, 12*).

ACTH

Les taux basaux d'ACTH des trois groupes ne sont pas différents, qu'ils soient nourris du régime standard (Figure 24a) ou de macronutriments séparés (Figure 24b).

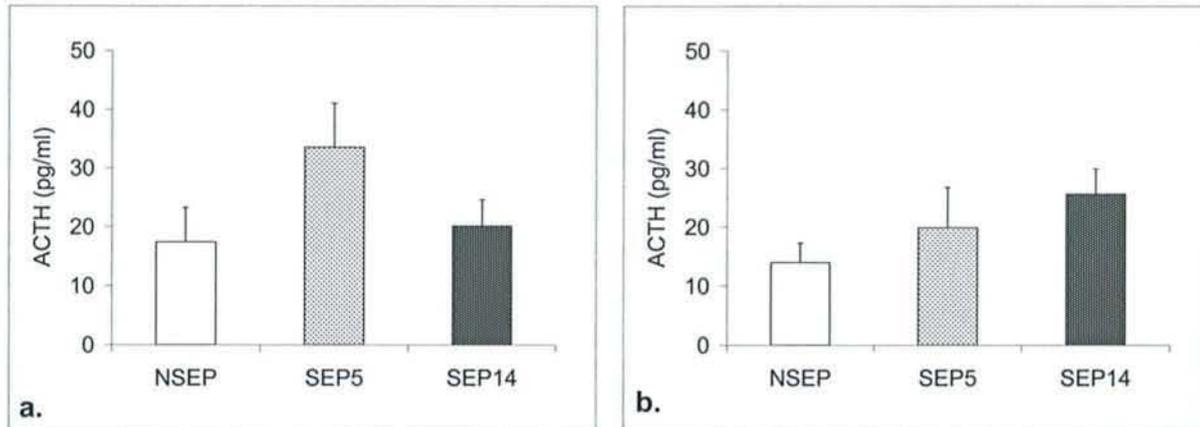


Figure 24. Taux plasmatiques basaux d'ACTH des trois groupes d'adultes, nourris (a) au régime standard, (b) au régime dissocié.

CORT

Les taux basaux de CORT des trois groupes ne sont pas différents, qu'ils soient nourris au régime standard (Figure 25a) ou au régime dissocié (Figure 25b).

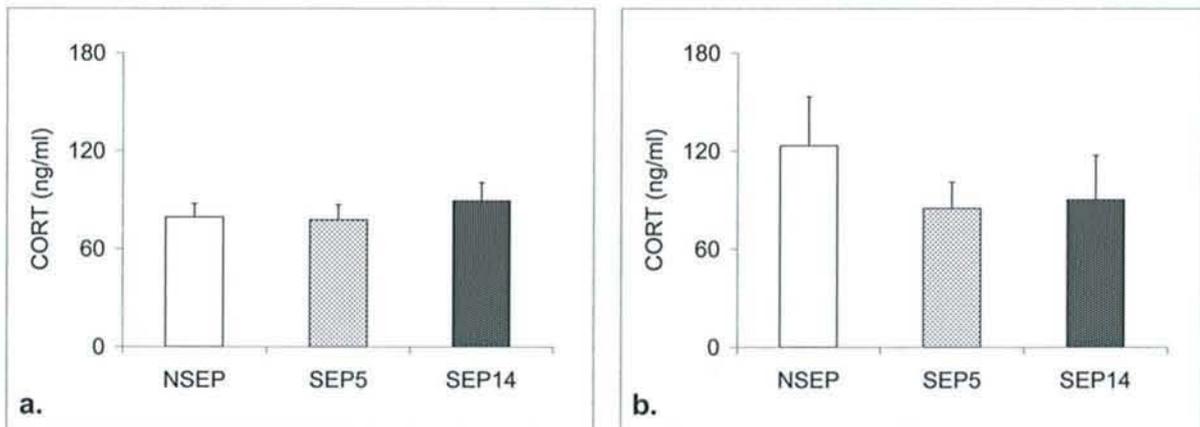


Figure 25. Taux plasmatiques basaux de CORT des trois groupes d'adultes, nourris de (a.) régime standard, (b.) trois macronutriments séparés.

2.1.2.2 Après une contention de 30 minutes

La réponse ACTH et CORT à la contention est évaluée par dosage radioimmunologique dans les échantillons plasmatiques obtenus par canulation jugulaire chez les rats nourris au régime standard (*Matériels et méthodes 3.2.1.6, 6, 12*).

La réponse ACTH à une contention de 30 min est présentée sur la Figure 26a. L'analyse de variance à mesures répétées montre un effet significatif de temps ($F 5, 130=35,5, p<0,0001$), et une interaction significative temps x traitement néonatal ($F 10, 130=3,0 p<0,01$). Les niveaux basaux d'ACTH sont similaires chez les adultes des différents groupes. Après 15 min de contention, les taux plasmatiques d'ACTH augmentent chez chaque groupe expérimental, mais le niveau atteint est plus élevé chez le groupe SEP14 que chez le groupe NSEP ($p=0,02$), alors qu'il n'y a pas de différence entre les groupes SEP5 et NSEP. Après 30 min de contention, les niveaux d'ACTH respectifs des groupes SEP5 et NSEP ne diffèrent pas des niveaux atteints après 15 min, mais une diminution significative est observée chez le groupe SEP14 ($p<0,05$), dont les niveaux d'ACTH ne sont plus différents de ceux du groupe NSEP. A la fin de la contention, les taux plasmatiques des rats SEP14 continuent à diminuer, et ceux des rats NSEP commencent également à diminuer ($p<0,05$ à toutes les mesures post-contention pour les deux traitements). Cependant, les taux plasmatiques des rats SEP5 commencent à diminuer de façon significative seulement 60 min après la fin de la contention ($p<0,01$), et sont donc plus élevés que les niveaux des rats NSEP à 15 et 30 minutes après la fin de la contention.

Les taux plasmatiques de CORT de chaque groupe de traitement changent de façon significative avec le temps ($F 5, 130=40,2, p<0,0001$), et il existe une interaction significative temps x traitement néonatal ($F 10, 130=2,3, p<0,01$; Figure 26b). Contrairement au cas de l'ACTH, il existe une différence de taux basaux de CORT entre les trois groupes, puisque les niveaux de CORT du groupe SEP14 sont diminués par rapport à ceux du groupe NSEP ($p<0,05$; il n'y a pas de différence entre le groupe SEP5 et NSEP). Le pic des niveaux de CORT (après 15 et 30 min de contention) sont similaires chez chaque groupe. Les taux plasmatiques de CORT commencent à diminuer par rapport aux niveaux maximaux 60 min après la fin de la contention chez les groupes NSEP et SEP14 ($p<0,001$). Cependant, les niveaux de CORT des rats SEP5 ne diminuent pas de façon significative durant toute l'expérience. Les taux plasmatiques de CORT du groupe SEP5 sont plus élevés que ceux du groupe NSEP 15 et 60 min après la fin de la contention, alors que les niveaux de CORT du

groupe SEP14 sont plus hauts que les niveaux du groupe NSEP à un seul moment : 15 min après la fin de la contention.

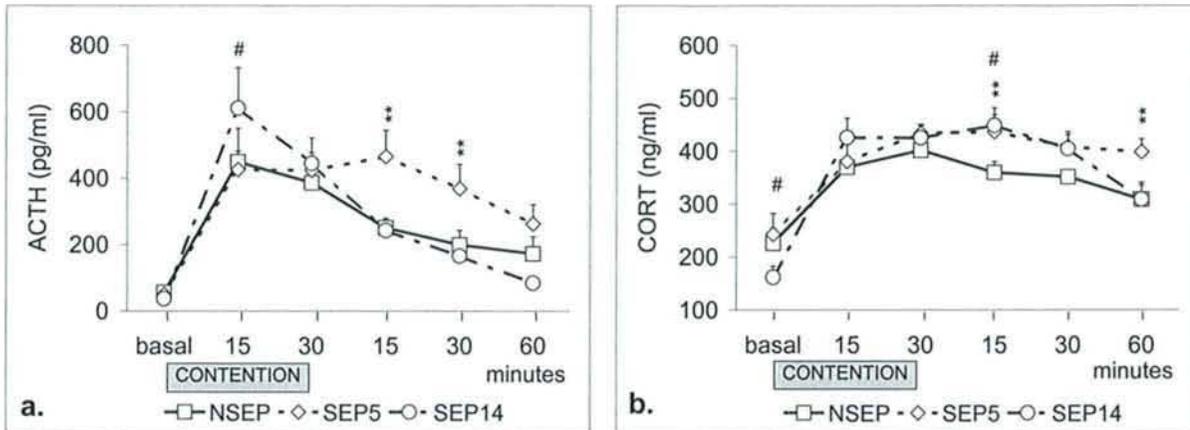


Figure 26. Taux plasmatiques d'ACTH (a.) et de CORT (b.) des rats avant, pendant et après un stress de contention de 30 minutes. ** $p < 0,01$ entre SEP5 et NSEP, # $p < 0,05$ entre SEP14 et NSEP.

2.1.2.3 Après un stress d'éther

La réponse ACTH et CORT à un stress d'éther est évaluée par dosage radioimmunologique dans les échantillons du sang du tronc des rats nourris au régime cafétéria (*Matériels et méthodes 3.2.3, 12*).

Le traitement néonatal ne modifie pas les niveaux basaux d'ACTH ou de CORT, et il n'y a pas d'effet du traitement néonatal sur la réaction au stress d'éther (pas d'effet traitement néonatal x sacrifice). Une augmentation des taux plasmatiques d'ACTH et de CORT apparaît 20 min après un stress d'éther de la même façon chez les trois groupes (Figure 27 ; effet sacrifice, ACTH : $F_{1,25}=52,5$, $p=0,0000001$; CORT : $F_{1,25}=16,1$, $p=0,0004$).

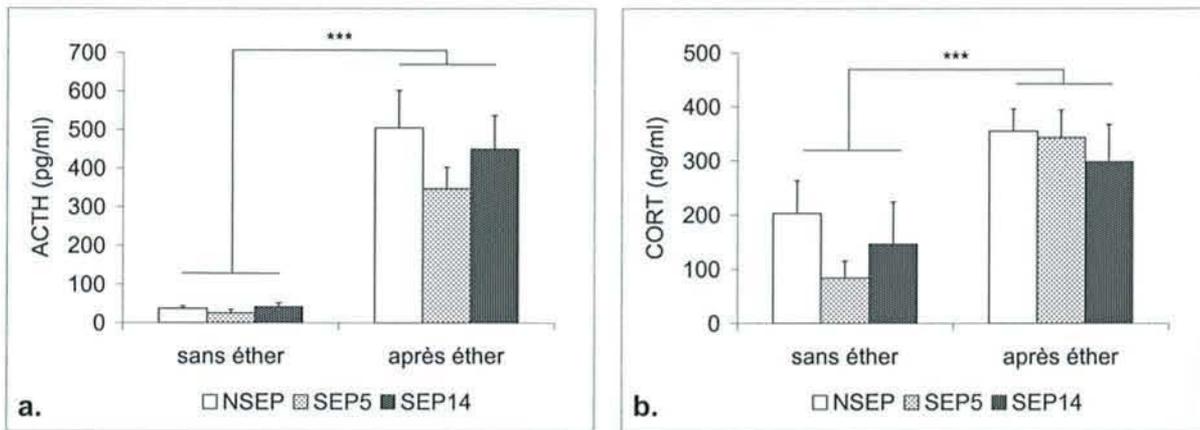


Figure 27. Taux plasmatiques d'ACTH (a.) et de CORT (b.) des rats nourris au régime cafétéria ayant été soumis ou non à un stress d'éther de 3 minutes.

2.1.2.4 Après 48 heures de jeûne

La réponse CORT au jeûne est évaluée par dosage radioimmunologique dans les échantillons du sang du tronc des rats nourris *ad libitum* au régime standard ou soumis à 48 heures de jeûne (*Matériels et méthodes 3.2.1.7, 12*).

Il a été montré avec un plus large effectif que les niveaux basaux de CORT des trois groupes nourris de régime standard ne sont pas différents. Il n'y a pas non plus de différence dans les niveaux de CORT des trois groupes ayant subi un jeûne (effet du traitement néonatal non significatif). Cependant, d'une façon générale, le jeûne augmente les taux plasmatiques du CORT, et cette augmentation est près d'être significative (Figure 28 ; effet jeûne : $F_{1,31}=4,13, p=0,059$).

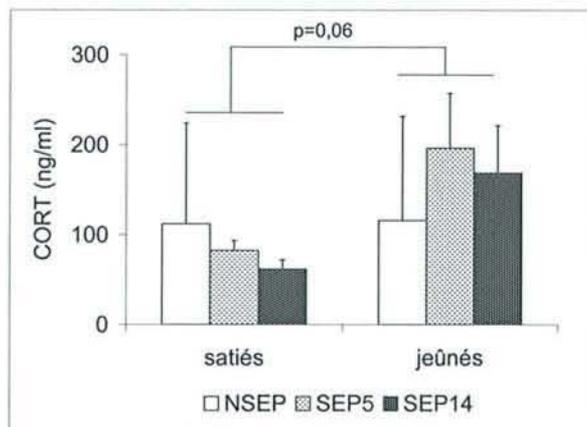


Figure 28. Taux plasmatiques de CORT de rats ayant été soumis ou non à 48 heures de jeûne.

2.1.3 Poids des surrénales

Etats basaux

Le poids des surrénales des rats adultes non stressés, nourris au régime standard ou dissocié, est mesuré après le sacrifice (*Matériels et méthodes 3.2.1.8, 3.2.2*).

Aucune différence n'apparaît concernant le poids de surrénales (% poids corporel) entre les trois traitements néonataux, et ceci quel que soit le régime alimentaire (Figure 29). Les rats témoins nourris au régime dissocié semblent avoir des surrénales d'un poids plus élevé que ceux nourris au régime standard. Cependant, ces rats n'ayant pas été soumis aux mêmes expériences, on ne peut comparer directement les données.

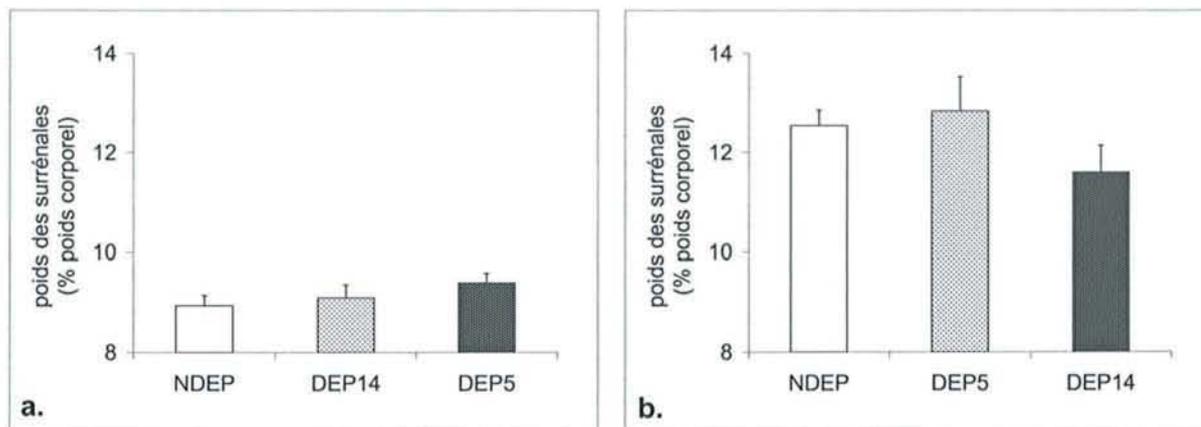


Figure 29. Poids des surrénales (% poids corporel) des rats adultes nourris avec **a.** le régime standard, **b.** les trois macronutriments dissociés.

Après un stress d'éther

Le poids des surrénales des rats nourris au régime cafétéria, ayant subi ou non un stress d'éther juste avant le sacrifice, est mesuré (*Matériels et méthodes 3.2.3*).

Dans aucun des trois groupes, l'éther n'induit une diminution significative du poids de surrénales (% poids corporel) 20 minutes après l'exposition (Figure 30). Les poids des surrénales des trois groupes sont similaires aussi bien à l'état basal qu'après le stress d'éther.

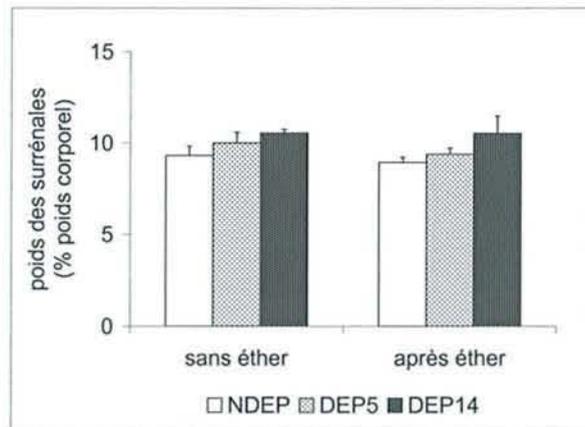


Figure 30. Poids des surrénales (% poids corporel) des rats adultes nourris au régime “cafétéria”, ayant été soumis ou non à un stress d'éther.

Après 48 heures de jeûne

Le poids des surrénales des rats adultes nourris au régime standard, ayant subi ou non 48 heures de jeûne, est mesuré après le sacrifice (*Matériels et méthodes 3.2.1.7*).

Il n'y a pas de différence entre les trois groupes ni à l'état de satiété, ni après un jeûne de 48 heures (Figure 31). Cependant, le jeûne augmente le poids des surrénales (% poids corporel ; effet de jeûne : $F_{1,26}=19,5$, $p=0,0001$).

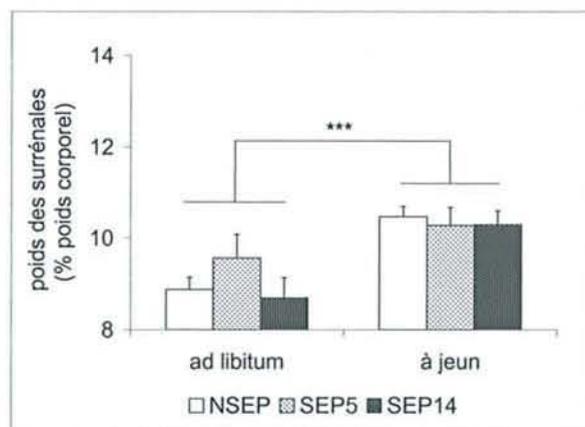


Figure 31. Poids des surrénales (% poids corporel) des rats adultes nourris au régime standard, ayant été soumis ou non à un jeûne de 48 heures. * $p<0,001$

2.1.4 Récepteurs aux glucocorticoïdes

2.1.4.1 Liaison biochimique dans l'hippocampe

La capacité de liaison des RG et des RM hippocampiques est évaluée par une méthode d'analyse biochimique chez les rats nourris au régime standard (*Matériels et méthodes 3.2.1.8, 10*).

Les capacités de la liaison des RM et des RG de trois groupes ne sont pas différentes (Figure 32).

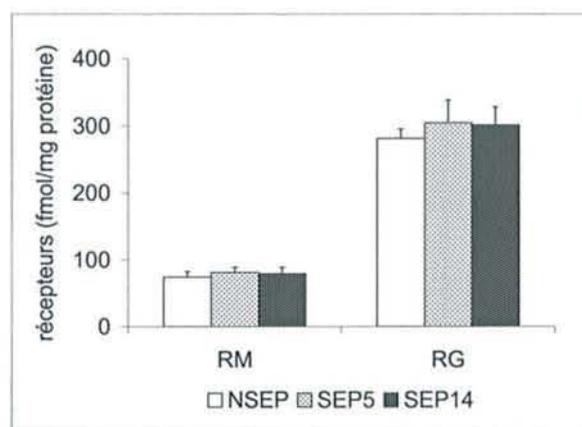


Figure 32. Capacité de liaison des récepteurs aux corticostéroïdes dans l'hippocampe des rats adultes.

2.1.4.2 Western Blot

La quantification des RG dans l'hippocampe, l'hypothalamus, l'adénohypophyse et une partie du cortex des rats est réalisée chez les rats adultes nourris au régime standard par une méthode de Western Blot (*Matériels et méthodes 3.2.1.8, 11*).

Comme chez les rats jeunes, le Western Blot met en évidence la protéine RG à un poids moléculaire d'environ 97 kDa. Ainsi que nous l'avons observé sur les échantillons des jeunes rats, la migration de certains échantillons donne deux bandes très rapprochées, tandis que d'autres échantillons produisent une seule de ces deux bandes (la plus haute ou la plus basse). Toutefois, chez les animaux dont plusieurs régions cérébrales sont analysées, le

nombre et la position des bandes sont toujours les mêmes dans les différentes régions cérébrales.

La présence de la bande haute et/ou basse n'est pas liée à

- (1) le sexe (mâle, femelle)
- (2) l'âge (5 jours, 14 jours, adulte)
- (3) le traitement néonatal (NSEP, SEP5, SEP14)
- (4) l'état de satiété (*ad libitum*, à jeun)

des animaux (Tableau 8.). Cependant, le profil des bandes n'est pas indépendant de l'appartenance des animaux à la même portée (Chi²=51,6, ddl=26, p<0,01 ; Tableau 8.).

Tableau 8. Présence des bandes immunoréactives aux RG chez divers catégories de rats.

			Haut	Bas	Les deux
% théorique			12,6	27,4	60,0
% observé	sexe	mâles	13,8	25,0	61,3
		femelles	6,7	40,0	53,3
	âge	5 jours	7,7	30,8	61,5
		14 jours	23,1	30,8	46,2
		adulte	11,6	26,1	62,3
	traitement néonatal	NSEP	13,2	21,1	65,8
		SEP5	10,3	34,5	55,2
		SEP14	14,3	28,6	57,1
	état de satiété	<i>ad libitum</i>	12,9	22,6	64,5
		à jeun	12,1	36,4	51,5
	portée	55	0,0	50,0	50,0
		56	0,0	37,5	62,5
		57	25,0	75,0	0,0
		58	0,0	40,0	60,0
		59	50,0	0,0	50,0
		60	37,5	25,0	37,5
		61	0,0	0,0	100,0
		62	0,0	100,0	0,0
		63	0,0	0,0	100,0
		64	28,6	0,0	71,4
65		0,0	100,0	0,0	
66		0,0	0,0	100,0	
67		0,0	42,9	57,1	
68	0,0	0,0	100,0		
69	60,0	0,0	40,0		

En raison des arguments présentés dans la partie “ effets immédiats ” (apparition de deux bandes sur la membrane entraînant l’augmentation de surface et la diminution de l’intensité du marquage), nous ne faisons pas d’analyses statistiques sur la surface, l’intensité et l’intensité relative des échantillons, qui sont toutefois présentées dans les Tableaux 9 et 10.

Tableau 9. Caractéristiques des bandes immunoréactives aux RG dans différentes régions du cerveau des rats adultes nourris *ad libitum* avec le régime standard (deux bandes : 9 NSEP, 6 SEP5, 7 SEP14 ; une bande : 7 NSEP, 4 SEP5, 3 SEP14).

		Surface		Intensité		Intensité relative	
		2 bandes	1 bande	2 bandes	1 bande	2 bandes	1 bande
hippo- campe	NSEP	11,6 ± 0,7	8,4 ± 0,9	266 ± 27	247 ± 39	22,5 ± 1,1	27,9 ± 2,1
	SEP5	11,3 ± 0,9	8,8 ± 1,2	276 ± 23	260 ± 48	24,3 ± 1,4	29,0 ± 1,8
	SEP14	12,2 ± 0,7	9,4 ± 0,3	284 ± 29	273 ± 49	22,9 ± 1,1	28,3 ± 4,2
hypo- thalamus	NSEP	24,3 ± 2,4	16,1 ± 2,7	458 ± 61	320 ± 62	22,1 ± 1,6	22,3 ± 1,4
	SEP5	20,3 ± 2,3	16,9 ± 1,7	388 ± 52	289 ± 36	21,0 ± 1,4	25,0 ± 2,5
	SEP14	22,2 ± 2,2	16,7 ± 2,3	416 ± 57	479 ± 73	25,0 ± 1,3	28,4 ± 0,5
cortex	NSEP	9,3 ± 1,9	9,6 ± 3,1	171 ± 36	214 ± 76	18,5 ± 0,8	23,0 ± 2,4
	SEP5	14,9 ± 5,5	15,4 ± 1,2	330 ± 131	366 ± 47	20,6 ± 1,7	23,6 ± 1,6
	SEP14	17,3 ± 1,6	8,3 ± 1,8	411 ± 54	152 ± 44	23,3 ± 1,2	17,8 ± 2,0

Tableau 10. Caractéristiques des bandes immunoréactives aux RG l’adénohypophyse des rats adultes nourris *ad libitum* avec le régime standard ou ayant été soumis à un jeûne de 48 heures.

	Surface		Intensité		Intensité relative		N échantillon	
	2 bandes	1 bande	2 bandes	1 bande	2 bandes	1 bande	2 bandes	1 bande
NSEP <i>ad libitum</i>	14,9 ± 0,2	14,2 ± 0	984 ± 135	738 ± 0	66,0 ± 9,2	52,0 ± 0,0	4	1
NSEP à jeun	13,9 ± 0,5	13,1 ± 0	927 ± 155	864 ± 0	65,7 ± 9,5	65,5 ± 0,0	5	1
SEP5 <i>ad libitum</i>	14,5 ± 0,5	16,5 ± 0	945 ± 104	949 ± 0	64,8 ± 5,9	57,3 ± 0,0	4	1
SEP5 à jeun	14,3 ± 1,3	11,2 ± 0,5	1043 ± 383	743 ± 131	70,8 ± 20,0	65,2 ± 9,8	2	4
SEP14 <i>ad libitum</i>	17,0 ± 1,8	10,7 ± 0,1	868 ± 55	608 ± 31	51,5 ± 2,8	56,8 ± 2,2	3	2
SEP14 à jeun	17,3 ± 0,6	7,9 ± 3,9	1138 ± 104	611 ± 345	65,3 ± 3,9	64,4 ± 19,8	3	3

2.2 Observations comportementales

2.2.1 Comportement alimentaire

2.2.1.1 Comportement alimentaire basal sur un régime de nourriture standard

La prise alimentaire et l'évolution du poids corporel de rats nourris au régime standard sont évalués (*Matériels et méthodes 3.2.1, 3.2.1.1*).

L'évolution du poids corporel des rats nourris d'un régime standard est présentée dans le Tableau 11. Les poids des rats provenant des trois groupes sont différents ($F_{2,49}=10,9, p=0,0001$). Le poids des rats SEP est diminué de façon significative par rapport au groupe NSEP, indépendamment de l'âge au moment de la séparation, et cette différence se maintient pendant toute la durée de la période d'observation. Le poids corporel des groupes SEP5 et SEP14 ne diffère à aucun moment.

Tableau 11. Poids corporel des rats nourris de régime standard (g). *** $p<0,001$ comparé au groupe NSEP.

	Jour postnatal								
	29	36	43	50	56	63	70	77	82
NSEP	83,1 ±2,0	126,0 ±2,1	166,3 ±2,3	206,9 ±3,1	243,3 ±3,1	263,4 ±4,2	287,3 ±5,2	308,2 ±5,0	327,4 ±4,2
SEP5	72,2*** ±1,8	108,4*** ±2,6	143,6*** ±3,4	183,4*** ±3,6	211,8*** ±5,2	234,8*** ±5,3	260,8*** ±5,0	280,8*** ±4,4	296,3*** ±4,4
SEP14	70,1*** ±1,5	111,6*** ±2,1	148,6*** ±3,0	188,3*** ±3,8	217,8*** ±3,6	241,1*** ±3,6	265,4*** ±4,3	293,6*** ±4,9	305,1*** ±4,8

La prise alimentaire des rats durant la phase diurne est moins importante que pendant la phase nocturne, indépendamment de la condition néonatale, ce qui démontre que nos manipulations ne perturbent pas fortement les habitudes naturelles de prise alimentaire des rats (Figure 33, comparaison des phases diurne et nocturne NSEP : $t=28,8, p<0,0001$; SEP5 : $t=32,9, p<0,0001$; SEP14 : $t=29,4, p<0,0001$). La prise journalière des trois groupes est différente ($F_{2,66}=7,8, p<0,001$), en particulier, elle est moins importante chez les rats SEP que chez les rats NSEP, indépendamment de l'âge de la séparation (Figure 33). Dans le cas

des rats SEP5 et SEP14, la prise alimentaire est diminuée pendant les premières 10 heures de la période diurne (Tableau 12, 22 h-8 h, $F_{2,66}=14,1$, $p<0,0001$), alors que la consommation durant les autres périodes de la journée ne diffère pas entre les animaux SEP et NSEP. Aucune différence de prise alimentaire n'est observée entre les rats SEP5 et SEP14, quelle que soit la période de la journée considérée.

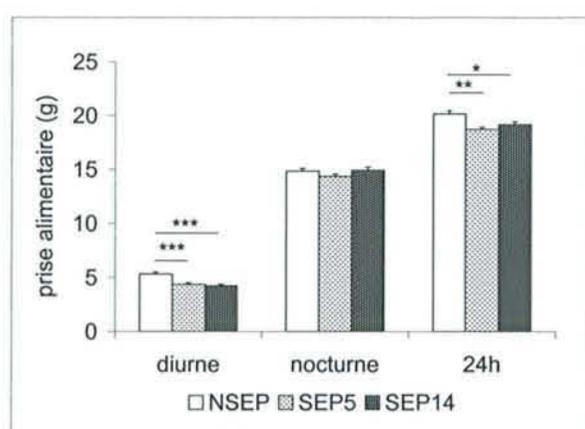


Figure 33. Prise alimentaire des rats pendant la phase diurne, nocturne et pendant la totalité des 24 heures de la journée. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

Tableau 12. Prise alimentaire des rats pendant les cinq périodes de la journée (g de nourriture standard). *** $p<0,001$ comparé au groupe NSEP.

	Phase nocturne			Phase diurne	
	10 h-12 h	12 h-16 h	16 h-22 h	22 h-8 h	8 h-10 h
NSEP	2,5±0,2	5,8±0,1	6,5±0,1	4,0±0,1	1,3±0,1
SEP5	2,2±0,2	5,8±0,2	6,3±0,2	3,2±0,1***	1,2±0,1
SEP14	2,6±0,1	5,7±0,2	6,7±0,2	3,1±0,1***	1,1±0,1

2.2.1.2 Comportement alimentaire basal sur un régime de trois macronutriments dissociés

Le comportement alimentaire des rats nourris au régime dissocié est évalué de façon similaire à celui des rats nourris au régime standard (*Matériels et méthodes 3.2.2*).

Le poids corporel des animaux nourris des trois macronutriments dissociés évolue différemment (interaction traitement néonatal x âge : $F_{30,540}=1,57$, $p=0,03$). Notamment, le poids des groupes SEP5 et SEP14 sont diminués par rapport au groupe NSEP jusqu'au début de ce régime, puis cette différence disparaît par la suite (voir détails dans le Tableau 13).

Tableau 13. Poids corporel des rats nourris de régime dissocié. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparé au groupe NSEP.

	Jour postnatal								
	29	36	43	50	56	63	70	77	82
NSEP	82,2 ±1,8	121,9 ±2,1	161,1 ±2,1	196,0 ±2,9	232,2 ±4,1	226,7 ±5,1	250,7 ±6,7	283,0 ±6,0	296,3 ±6,1
SEP5	77,0 ±1,1	114,8 ±1,3	151,2* ±2,8	190,5 ±3,1	220,2** ±2,9	226,1 ±5,6	254,2 ±4,9	281,8 ±5,8	291,8 ±5,8
SEP14	74,2* ±1,7	113,4* ±3,9	149,8** ±5,3	191,4 ±5,7	225,7* ±7,5	229,4 ±9,6	255,0 ±9,4	285,6 ±9,1	295,9 ±8,3

La prise énergétique journalière des trois groupes de rats est différente ($F_{2,37}=4,4$, $p < 0,05$). En particulier, elle est moins importante chez les rats SEP5 que chez les rats NSEP, tandis que la prise énergétique des rats SEP14 ne diffère d'aucun des deux autres groupes (Figure 34a). La diminution de la prise énergétique du groupe SEP5 n'est caractéristique d'aucune période spécifique de la journée, mais résulte plutôt d'une diminution observable pendant toute la durée de la journée (Tableau 14).

Afin de corriger le biais émanant de la diminution de la prise énergétique totale des rats SEP5, les données de la consommation de macronutriments sont exprimées et analysées en tant que pourcentage de prise énergétique totale (glucides, protéines et lipides ajoutés) pour chaque période mesurée, et calculées séparément pour chacun des rats.

Prise de glucides

La consommation journalière de glucides des trois groupes est différente (Figure 34b, $F_{2,39}=8,2$, $p < 0,01$). Notamment, les rats SEP5 mangent moins de glucides que les rats NSEP, tandis que la prise de glucides des animaux SEP14 ne diffère pas de celle des animaux NSEP. La différence entre les rats SEP5 et NSEP apparaît pendant toutes les périodes de la journée (Tableau 14).

Prise de protéines

La consommation journalière de protéines des trois groupes n'est pas différente (Figure 34b). Il n'y a pas non plus de différences entre les groupes pendant les périodes de la journée considérées (Tableau 14).

Prise de lipides

La consommation journalière de lipides des trois groupes n'est pas différente (Figure 34b). Cependant, il existe une différence pendant la période diurne ($F_{2,39}=6,5$, $p < 0,05$) : les

rats SEP5 mangent plus de lipides que les rats NSEP. La prise de lipides des rats SEP14 n'est différente des valeurs NSEP pendant aucune période de la journée (Tableau 14).

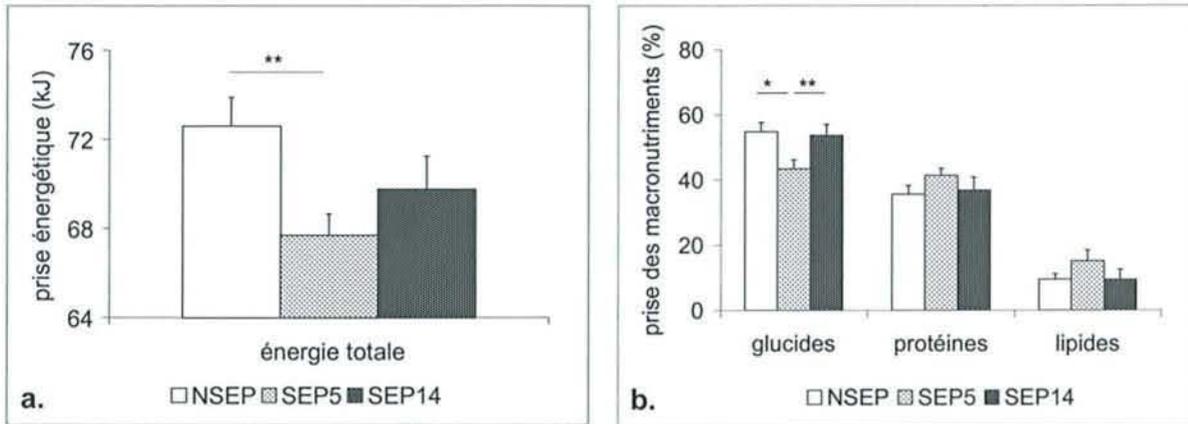


Figure 34. Prise alimentaire des rats nourris de trois macronutriments séparés. **a.** prise énergétique totale, **b.** prise des macronutriments séparés (% prise énergétique totale). *p<0,05, **p<0,01

Tableau 14. Prise énergétique totale et consommation des macronutriments individuels des rats pendant les cinq périodes de la journée. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 comparé au groupe NSEP. # p<0,05 comparé au groupe SEP5.

		Phase nocturne			Phase diurne	
		10 h-12 h	12 h-16 h	16 h-22 h	22 h-8 h	8 h-10 h
Energie totale (kJ)	NSEP	19,6±2,5	44,4±2,8	89,9±3,8	111,0±4,9	38,7±2,8
	SEP5	12,2±1,7	37,0±2,3	95,8±3,3	104,0±3,7	34,4±3,9
	SEP14	17,1±4,5	36,0±3,7	90,6±7,4	114,2±6,1	34,5±3,5
Glucides (%)	NSEP	57,7±4,6	61,9±2,7	48,7±3,2	44,1±3,4	48,7±5,2
	SEP5	43,8±4,0*	54,4±2,7	36,3±3,4*	29,0±3,0**	28,4±3,2**
	SEP14	51,8±6,4	59,0±2,8	49,5±3,0#	45,9±5,3#	37,4±5,3
Protéines (%)	NSEP	33,7±3,9	32,0±2,4	39,7±2,6	40,6±3,7	36,7±4,8
	SEP5	41,5±3,6	36,4±1,8	46,0±2,6	42,2±3,5	41,3±4,8
	SEP14	37,7±7,1	35,0±3,3	40,3±3,7	34,6±6,5	43,3±6,2
Lipides (%)	NSEP	8,5±1,8	6,1±1,4	11,6±2,2	15,3±2,4	14,6±1,8
	SEP5	14,6±3,8	9,2±2,4	17,7±3,7*	28,8±4,2**	30,3±5
	SEP14	10,5±3,5	6,0±2,5	10,2±3,5	19,5±4,8	19,3±4,2

2.2.1.3 Comportement alimentaire basal à partir d'un régime "cafétéria"

Le poids corporel des rats nourris au régime cafétéria est mesuré pendant deux mois (*Matériels et méthodes 3.2.3*).

Les rats du groupe SEP5 gagnent du poids plus vite que les rats NSEP pendant toute la durée de l'expérience. La prise du poids des rats SEP14 ne diffère pas de celle des NSEP pendant les 18 premiers jours de l'expérience, puis accélère passagèrement pour devenir similaire à celle des rats SEP5 (effet de l'interaction traitement néonatal x temps : $F_{30,2,15}=1,53$; $p=0,04$; Tableau 15). A la fin de l'expérience, les rats SEP5 pèsent plus que les rats des deux autres groupes ($F_{2,28} = 3,51$; $p=0,04$). La quantité de leur graisse corporelle est également différente : les rats SEP5 ont plus de graisse sous-cutanée que les NSEP, mais autant de graisse épидидymale et péri-rénale ($F_{2,28} = 6,53$; $p=0,005$; Figure 35). Les poids des tissus adipeux des rats SEP14 ne diffèrent pas de ceux des animaux NSEP.

Tableau 15. Gain de poids corporel de rats nourris de régime cafétéria (différence exprimée en grammes comparée au poids initial). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ comparé au groupe NSEP.

	jour 5	jour 11	jour 18	jour 29	jour 43	jour 53
NSEP	29,3 ± 1,9	56,1 ± 3,1	74,3 ± 3,6	105,7 ± 4,6	139,6 ± 5,7	164,3 ± 5,6
SEP5	35,6 ± 1,4*	65,2 ± 1,8**	87,6 ± 2,8**	118,9 ± 3,8***	154,1 ± 4,5**	175,1 ± 5,3**
SEP14	31,3 ± 2,2	54,7 ± 2,6	83,2 ± 4,5**	116,3 ± 4,7**	150,4 ± 5,1**	169,6 ± 5,0

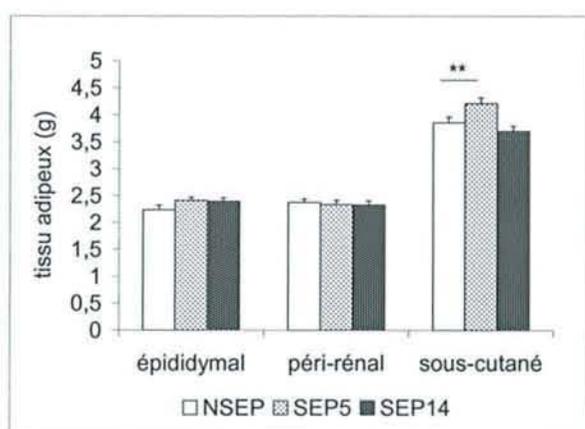


Figure 35. Poids des issus adipeux épидидymaires, péri-rénaux et sous-cutanés des trois groupes. ** $p<0,01$

2.2.1.4 Comportement alimentaire après un stress de contention de 3 heures

L'effet d'une contention de 3 heures sur le comportement alimentaire des rats nourris au régime standard est évalué (*Matériels et méthodes 3.2.1.2, 6.1*).

L'effet de la contention change de façon significative selon le temps (effet du jour de la mesure : $F_{1,26}=19,82$; $p<0,001$), et il existe une interaction significative temps x traitement néonatal ($F_{2,26}=3,33$; $p=0,05$). La contention diminue la prise alimentaire chez les rats SEP14 pendant les 24 heures suivant le stress, alors que la consommation des autres groupes ne change pas de façon significative, bien que la consommation moyenne des animaux SEP5 soit similaire à celle des rats SEP14 (Figure 36a). Le deuxième jour après la contention, les rats SEP14 ont une prise alimentaire augmentée, alors que la consommation des rats NSEP et SEP5 reste inchangée. La contention n'affecte pas la prise de poids (Figure 36b).

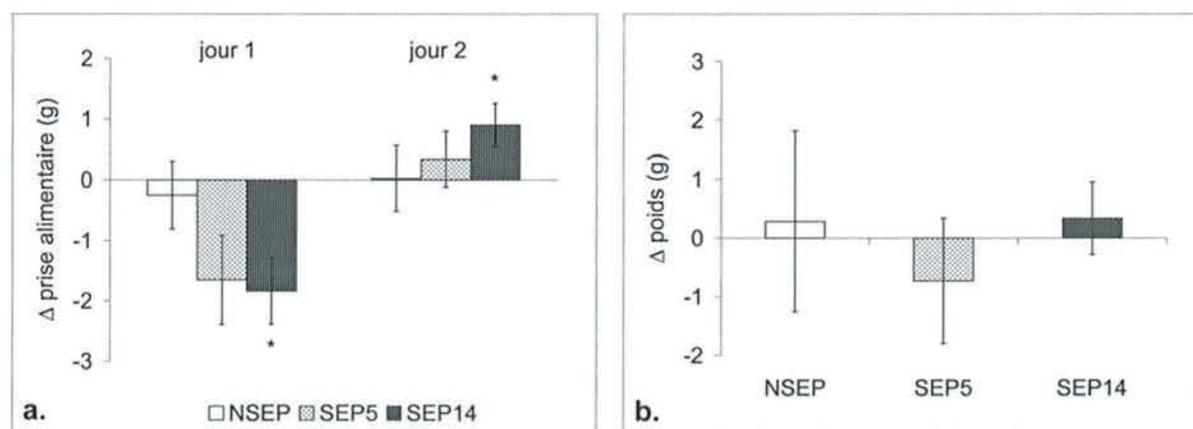


Figure 36. Changements du comportement alimentaire induits par une contention de trois heures. **a.** prise alimentaire, **b.** poids corporel. * $p<0,05$ comparé à la prise alimentaire après un jeûne de trois heures.

2.2.1.5 Comportement alimentaire après une injection intracérébroventriculaire de leptine

L'effet d'une injection intracérébroventriculaire de leptine (10 $\mu\text{g}/\text{rat}$) sur le comportement alimentaire des rats nourris au régime standard est évalué (*Matériels et méthodes 3.2.1.3*).

L'analyse de variance à mesures répétées révèle un effet de temps significatif ($F_{4,16,64} = 5,63$; $p=0,006$), mais pas d'effet du traitement néonatal ou d'interaction. Les trois groupes répondent à la leptine par une diminution de prise alimentaire similaire le jour suivant l'injection (Figure 37a). La prise alimentaire retourne aux niveaux normaux le troisième jour après l'injection. Les changements du poids corporel des trois groupes sont également similaires (Figure 37b).

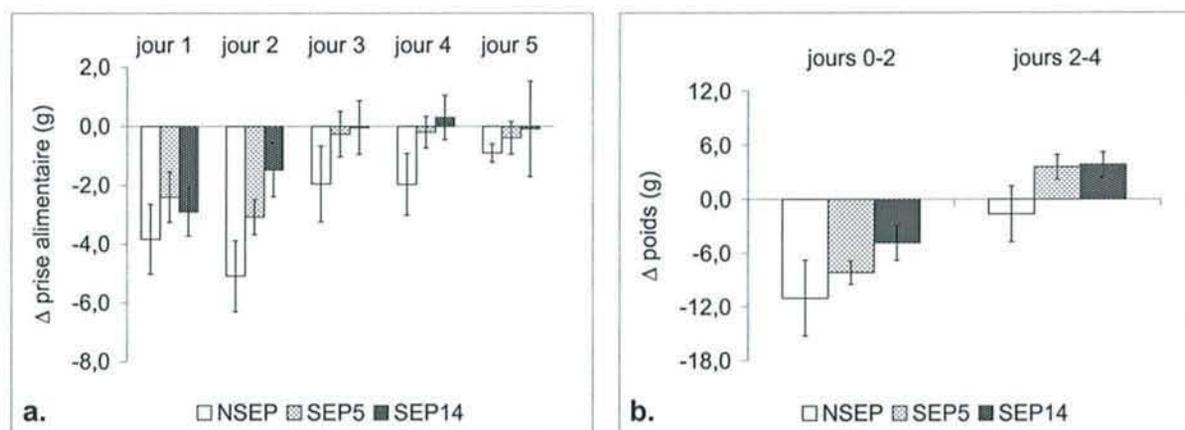


Figure 37. Changements du comportement alimentaire induits par une injection de leptine. **a.** prise alimentaire, **b.** poids corporel.

2.2.1.6 Comportement alimentaire après une injection i. p. de dexfenfluramine (dF)

L'effet d'une injection ip de dF (1 mg/kg body weight) sur le comportement alimentaire des rats nourris au régime standard est évalué (*Matériels et méthodes 3.2.1.4*).

L'injection de la dF diminue la prise alimentaire dans chaque groupe pendant la période de 2 heures suivant l'injection. La diminution mesurée pendant ces 2 heures est moins importante chez les animaux SEP5 que chez les NSEP, alors que la réponse des SEP14 rats n'est pas différente de celle des témoins (effet de l'interaction traitement néonatal x temps : $F_{2,30}=3,40$; $p=0,04$; Figure 38a). La prise alimentaire des animaux témoins retourne aux niveaux normaux suivant ce temps, mais celle des rats SEP5 et des SEP14 reste élevée pendant 4 heures de plus (Figure 38a). L'effet de la dF ne persiste pas au-delà de 6 heures. L'injection de la dF n'affecte pas le poids corporel (Figure 38b).

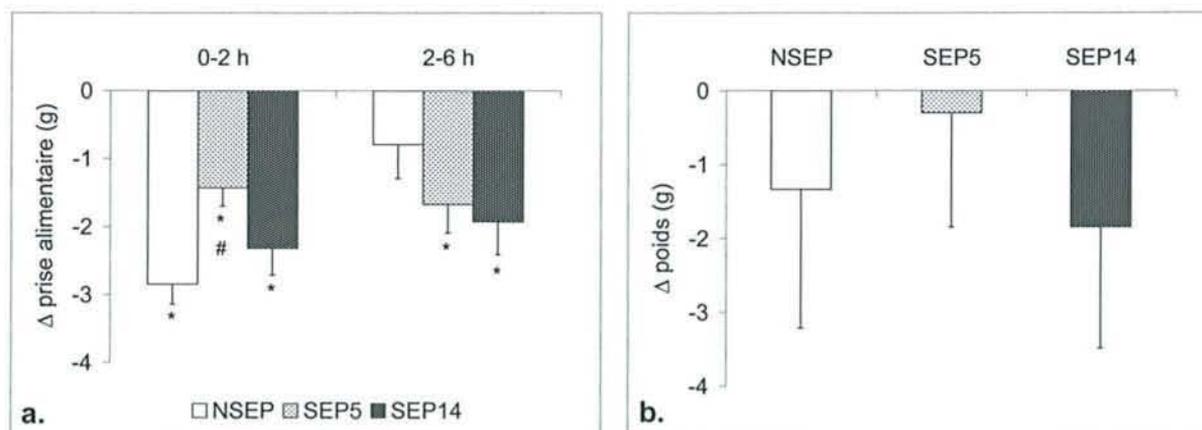


Figure 38. Changements du comportement alimentaire induits par une injection de dF. **a.** prise alimentaire, * $p < 0,05$ comparé aux valeurs témoins, # $p < 0,05$ comparé à NSEP ; **b.** poids corporel.

2.2.2 Comportement d'anxiété

L'anxiété des rats est évalué en les observant dans un nouvel environnement (*open field*, Matériels et méthodes 3.2.1.5, 7).

Dans l'*open field* sans nourriture, le comportement locomoteur ainsi que le nombre des fèces sont différents pour les trois groupes expérimentaux (Figure 39a-b). Il n'y a cependant pas de différence concernant la latence avant la sortie du cercle central, le nombre des lignes croisées, le temps passé dans l'aire périphérique (thigmotactisme), le nombre et la durée des toilettes et le nombre des flaques d'urine. La locomotion des rats SEP5 et SEP14 est diminuée par rapport aux rats NSEP ($F_{2,33}=4,1$, $p < 0,05$). Le nombre de fèces des rats SEP14 est plus important que celui des rats NSEP, alors que les valeurs SEP5 sont similaires aux NSEP ($F_{2,33}=3,60$, $p < 0,05$).

Le test *open field* en présence de nourriture est réalisé avec les mêmes rats que le test précédent, après un jeûne de 48 heures, en plaçant des croquettes dans l'appareil. Le comportement locomoteur est similaire à celui du test précédent, mais la diminution observée chez les rats SEP5 et SEP14 n'est pas statistiquement significative (Figure 39c). Chez les rats SEP14, la latence avant le début de la prise alimentaire est augmentée (Figure 39d ; $F_{2,33}=4,09$, $p < 0,05$), et la durée des repas est diminuée (Figure 39e ; $F_{2,33}=4,45$, $p < 0,05$), alors qu'il n'y a pas de différence entre les rats SEP5 et NSEP. Les autres mesures comportementales des trois groupes ne sont pas différentes.

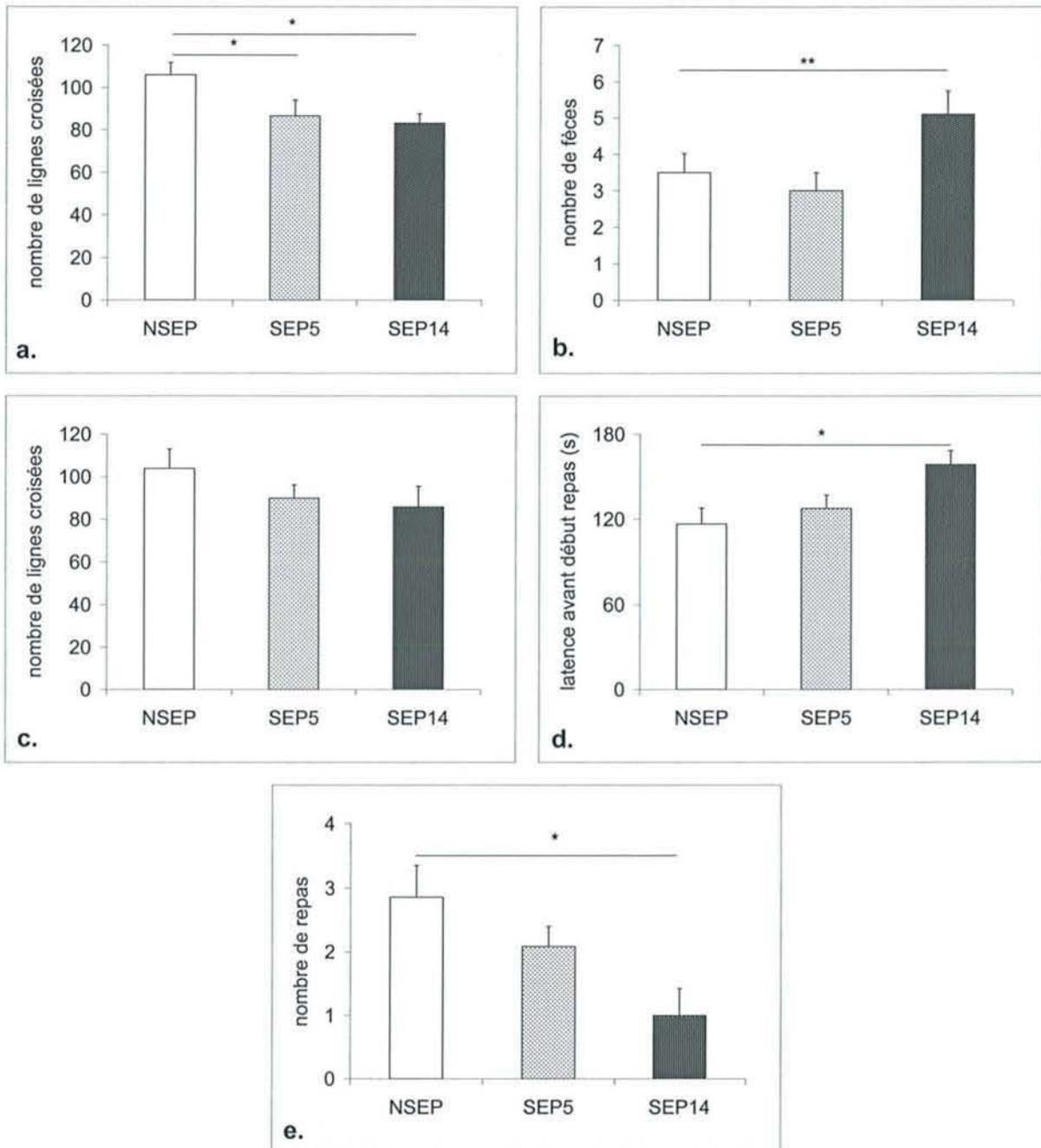


Figure 39. Comportement des rats dans un test *open field* sans nourriture (a-b), et avec nourriture (c-e). **a.** comportement ambulateur, **b.** nombre de fèces, **c.** comportement ambulateur, **d.** latence avant de commencer à manger, **e.** durée de repas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

DISCUSSION

Nous avons vu que la séparation maternelle de 24 heures – une manipulation environnementale composée de plusieurs stimuli stressants – a de nombreux effets immédiats et persistants. Dans la discussion, nous présentons dans un premier temps les conclusions tirées de nos résultats concernant la maturation normale de l'axe corticotrope entre le JPN 5 et le JPN 14. Dans un deuxième temps, nous discutons des changements observés immédiatement après une séparation maternelle. Dans un troisième temps, nous présentons les conclusions tirées de nos résultats concernant les modifications endocriniennes et comportementales persistantes à l'âge adulte induites par la séparation maternelle.

1 Maturation normale de l'axe corticotrope

L'étude des rats qui n'ont pas subi une séparation maternelle nous a fourni des données sur l'ontogenèse normale de différents éléments de l'axe corticotrope. Les taux plasmatiques des hormones peuvent être directement comparés entre les deux âges. Cependant, l'intérêt de la comparaison du nombre de neurones du NPV contenant un peptide ou son ARNm est limité, puisque le NPV augmente de taille entre les deux âges étudiés. Ainsi, deux paramètres peuvent être étudiés, sans que l'on sache quel est le plus important : le nombre absolu des neurones marqués, ou la proportion des neurones marqués dans toute la population du NPV, que nous n'avons pas évaluée en raison d'évidentes difficultés méthodologiques. L'intensité de l'expression de l'ARNm des peptides est un paramètre plus valide. En ce qui concerne les données de l'immunoréactivité de peptides dans l'EM, le problème est le même que dans le cas de l'immunoréactivité dans le NPV : la surface marquée absolue et la proportion marquée de l'EM peuvent être considérées. La comparaison de l'intensité du marquage reste toutefois possible.

Nos observations indiquent qu'entre le JPN 5 et le JPN 14, il y a un changement de la maturation des ARNm de la CRH, de la synthèse, du stockage et/ou de la libération de la CRH dans le NPV. En effet, nous avons montré que le nombre et l'intensité des cellules du NPV exprimant l'ARNm de la CRH ne change pas entre le JPN 5 et le JPN 14, mais le nombre de cellules immunoréactives à la CRH augmente dans la région parvocellulaire du

NPV dans cet intervalle de temps. Ces deux données peuvent être directement comparées, étant donné que pendant l'ontogenèse normale, la CRH s'exprime principalement dans la partie parvocellulaire du NPV. Nos résultats confirment ceux obtenus avec d'autres méthodes dans l'hypothalamus entier mettant en évidence une dissociation entre l'expression de l'ARNm de la CRH et de la quantité de peptide dans le NPV pendant l'ontogenèse [47].

L'augmentation du nombre de cellules synthétisant la CRH entre le JPN 5 et 14 entraîne une augmentation de la quantité de ce peptide dans l'EM, où projettent les axones de ces cellules. Le fait que l'augmentation de la surface immunoréactive à la CRH dans l'EM ne s'accompagne pas d'accroissement de l'intensité de marquage indique que l'évolution de la quantité de la CRH suit de près l'évolution de la taille de l'EM entre le JPN 5 et le JPN 14.

L'augmentation du nombre des cellules exprimant l'ARNm de la VP dans le NPV entre le JPN 5 et le JPN 14 indique seulement la croissance du NPV, mais l'augmentation de l'intensité du marquage suggère que la synthèse de ce peptide augmente entre ces deux âges.

Malgré l'augmentation de la synthèse de la VP dans le NPV, on observe entre le JPN 5 et le JPN 14 une diminution de l'intensité de son immunoréactivité de VP dans l'EMI et une absence de changement dans l'EME (les deux structures où projettent les neurones à VP du NPV). Ceci suggère qu'entre ces deux âges, la vitesse de libération de la VP augmente parallèlement à l'accroissement de sa synthèse. Ceci est d'autant plus vraisemblable qu'on sait que la maturité fonctionnelle du rein pour la réabsorption de l'eau n'est acquise, chez le rat, qu'au-delà de la deuxième semaine postnatale [293].

Nous avons observé une augmentation de la proportion de cellules à VP colocalisant la CRH entre le JPN 5 et le JPN 14 dans la partie parvocellulaire du NPV. Cette augmentation survient alors que le nombre de cellules à VP ne change pas entre les deux âges, mais le nombre de cellules à CRH augmente. Ce fait indique qu'une partie des cellules à VP présente le JPN 5 a commencé à synthétiser de la CRH par la suite.

Différentes études ont établi que pendant la période HRS, la proportion des neurones à VP du NPV co-exprimant la CRH est plus élevée qu'après. Ceci est illustré par le fait que le JPN 9, l'immunolésion des neurones à VP dans le NPV diminue la production de CRH aussi bien que celle de la VP, alors que le JPN 19, une telle lésion diminue seulement l'expression de la VP, et non celle de la CRH [294]. La divergence de nos résultats avec ces données peut

être due au fait que l'âge des rats n'était pas le même, et à la possibilité que l'évolution de la colocalisation n'est pas linéaire.

L'augmentation des taux plasmatiques d'ACTH et de CORT (tendance) entre le JPN 5 et le JPN 14 est probablement due à l'apparition d'un rythme circadien des niveaux de ces hormones. En effet, la littérature scientifique ne décrit généralement pas d'augmentation entre ces deux âges [60, 200, 202, 203, 220, 294, 295]. Contrairement à ces études, où les échantillons ont été pris pendant la période diurne, le plasma des nos rats a été récolté au début la période nocturne, à peu près au moment où les taux d'ACTH et de CORT atteignent un pic chez les rats adultes. Le rythme circadien de la CORT se mettant en place à la fin de la deuxième semaine postnatale, l'élévation des taux hormonaux correspondrait à l'apparition ontogénétique de ce pic [296].

En conclusion, nos résultats ont apporté des informations nouvelles à la notion générale que l'axe corticotrope est très différent lors des deux moments étudiés de l'ontogenèse normale : le JPN 5 et le JPN 14. Nous avons mis en évidence des données supportant l'existence des changements entre ces deux âges concernant les processus de maturation des neuropeptides du NPV et leur libération de l'EM, ainsi que l'apparition d'un cycle circadien de l'ACTH et de la CORT.

2 *Effets immédiats de la séparation maternelle*

La séparation maternelle est une manipulation qui place des rats dans un environnement hostile, ce qui impose progressivement plusieurs contraintes à l'organisme des petits : 1. un manque de soins maternels, qui est un stimulus stressant majoritairement neurogénique (psychologique), 2. une déshydratation, 3. un jeûne. Les trois types de contrainte sont des stimuli stressants chroniques, qui sont tous les trois capables d'induire chez le rat adulte une réponse adaptative, le stress, permettant à l'organisme de limiter les dégâts pendant un certain temps. L'axe corticotrope joue un rôle important dans cette adaptation.

Chez les rats très jeunes, la maturation de l'axe corticotrope n'est pas terminée. La période néonatale des rats comprend la période d'hypo-réponse aux stimuli stressants (HRS, JPN 4-12), et l'axe corticotrope n'est pas pleinement mature même à la fin de cette période. Nous avons étudié si l'axe corticotrope des jeunes rats est capable de réagir aux stimuli stressants composant la séparation maternelle (pendant ou après la période HRS), et si cette réaction est similaire à celle des adultes.

La diminution du poids observée chez nos rats suggère que la séparation maternelle a imposé une contrainte forte à l'organisme des petits. Notamment, elle indique une perte d'eau et d'autres composés survenue lors du jeûne de 24 heures dans la couveuse.

La séparation maternelle augmente la sécrétion de la VP du NPV chez les rats de 14 jours. Il est probable que l'augmentation de la synthèse apparaît aussi bien dans la partie magnocellulaire que dans la partie parvocellulaire du NPV.

Notamment, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la VP chez les rats SEP14 indique l'augmentation de la synthèse de ce neuropeptide dans le NPV. Dans notre étude, seule la totalité du NPV a été évaluée, puisqu'il n'était pas possible de cibler la partie magno- ou parvocellulaire en raison des caractéristiques du logiciel utilisé. Bien que l'ARNm de la VP soit exprimé de façon constante dans les deux parties – parvo- et magnocellulaire – du NPV, le nombre de neurones à VP magnocellulaires est supérieur au nombre de neurones à VP parvocellulaires. Il est par conséquent plus probable que l'augmentation observée de l'expression de l'ARNm de la VP est d'origine magnocellulaire. Cependant, ces données n'excluent pas un changement de l'expression de VP dans la partie parvocellulaire du NPV.

L'augmentation de la quantité de VP dans l'EMI chez les rats SEP14 indique une augmentation de la synthèse de la VP dans la partie magnocellulaire du NPV. L'EMI contient des axones des neurones magnocellulaires du NSO et NPV en passage au neurohypophyse (qui sont donc sectionnés de façon transversale) [297]. La VP magnocellulaire est stockée dans le neurohypophyse dans les vésicules neurosécrétrices et libérée dans la circulation sanguine, et contribue à l'inhibition de la perte d'eau, par l'augmentation de sa réabsorption dans les reins [298]. Puisque l'état de déshydratation chez les rats adultes est caractérisé par l'augmentation de la synthèse et de la libération de la VP parallèlement à partir des neurones magnocellulaires du NPV et du NSO [298-301], il est probable qu'une telle augmentation de synthèse apparaît également dans ces deux noyaux des rats SEP14. L'augmentation de

l'intensité du marquage de la VP dans l'EMI des SEP14 indiquerait donc l'augmentation de la sécrétion de VP dans leur NPV et leur NSO. Il est intéressant de noter que les rats adultes déshydratés, de façon similaire à nos rats SEP14, ont une synthèse augmentée de VP dans le NPV, par contre, on observe une diminution de la quantité de VP dans l'EM, ce qui est dû à l'augmentation de la libération de ce peptide [297]. Chez les rats SEP14, on observe une augmentation parallèle de la synthèse de la VP dans le NPV et de sa quantité dans l'EMI, indiquant qu'à cet âge, le mécanisme coordonnant la vitesse de la synthèse et de la libération de ce peptide n'est pas encore mis en place.

L'augmentation de la quantité de VP dans l'EME chez les rats SEP14 indique que la synthèse de ce peptide est augmentée dans la partie parvocellulaire du NPV. En effet, l'EME contient des arborisations terminales des axones provenant des neurones parvocellulaires du NPV, contenant la VP et sectionnés de façon longitudinale [302]. Ces derniers libèrent les neuropeptides dans la circulation portale, qui stimulent la sécrétion de l'ACTH dans l'adénohypophyse [24]. Une augmentation similaire apparaît dans l'EME des rats adultes soumis à une déshydratation [297].

L'absence de changement du nombre de cellules contenant la VP dans la partie parvocellulaire du NPV malgré l'augmentation de la quantité de VP dans l'EME indique que la séparation maternelle augmente la synthèse de VP dans les neurones qui en synthétisent déjà. Le nombre de cellules contenant la VP ne serait donc pas un paramètre très significatif.

La diminution de l'expression de l'ARNm de la CRH et la diminution du nombre de cellules contenant la CRH dans la partie parvocellulaire du NPV des rats SEP14 indique que la séparation maternelle diminue la synthèse de ce neuropeptide. A l'état basal, l'expression de l'ARNm de la CRH est localisée presque exclusivement dans la partie parvocellulaire du NPV. Une déshydratation induit l'expression de l'ARNm de la CRH également dans la partie magnocellulaire du NPV chez les rats adultes [303]. La diminution de l'expression de l'ARNm de la CRH dans le NPV des rats SEP14 indique que si une telle induction de l'ARNm de la CRH survient dans la partie magnocellulaire de leur NPV, cette augmentation est inférieure à la diminution de l'expression de l'ARNm dans la partie parvocellulaire du NPV. La diminution de l'expression de l'ARNm de la CRH dans le NPV des rats SEP14 ressemble étroitement à la réaction des rats adultes soumis à la déshydratation et au jeûne [304-307].

L'augmentation de la quantité de CRH dans l'EM des rats SEP14 malgré la diminution de sa synthèse dans le NPV indique une absence de synchronisation entre la

synthèse et la libération de ce neuropeptide. En effet, la CRH de l'EM est originaire du NPV, où sa synthèse est diminuée chez les rats SEP14. Une diminution de la synthèse de la CRH apparaît dans le NPV des rats adultes déshydratés, mais chez ces rats, la quantité de ce peptide dans l'EM reste inchangé [298], ce qui indique que la vitesse de la libération est ralentie par rapport à celle de la synthèse. Chez les rats SEP14, la diminution de la libération de la CRH est encore plus prononcée. Dans l'absence de données concernant le développement du transport axonal et de la libération de ces neuropeptides, cette hypothèse reste à confirmer.

L'augmentation des taux plasmatiques d'ACTH observée chez les rats SEP14 est probablement due à l'augmentation de la quantité de VP atteignant l'adénohypophyse, originaire de l'EME. En effet, il a été montré chez les rats adultes, qu'à l'augmentation de la présence de VP dans l'EME correspondait une augmentation de la présence de VP dans l'adénohypophyse [308]. Notre hypothèse est appuyée par le fait que chez les rats adultes, l'augmentation persistante des niveaux d'ACTH pendant une déshydratation semble être due à l'augmentation de la libération de la VP et non pas de la CRH [298]. De plus, l'augmentation de la quantité de VP dans l'EME chez les rats adultes déshydratés correspond à une augmentation des taux plasmatiques de l'ACTH [297]. Bien que les mécanismes de la libération de VP ne sont peut-être pas identiques le JPN 14 et à l'âge adulte, il reste probable que la quantité de VP libérée soit augmentée chez les rats SEP14 par rapport aux rats NSEP14.

Bien que la VP induisant l'augmentation des taux plasmatique d'ACTH est probablement d'origine parvocellulaire, certaines données suggèrent que la VP d'origine magnocellulaire peut également contribuer à la stimulation de la libération de l'ACTH. Premièrement, la VP peut atteindre l'adénohypophyse via des vaisseaux portaux courts après sa libération dans le neurohypophyse [309]. Deuxièmement, des études morphométriques et neurochimiques ont mis en évidence l'existence de la libération paracrine de la VP de l'EMI [310].

D'autres causes de l'élévation des niveaux d'ACTH peuvent être envisagées, comme la sensibilisation des récepteurs à VP de l'adénohypophyse ou l'augmentation de la demi-vie de l'ACTH. Les observations chez les adultes soumis à un stress chronique indiquent souvent une sensibilisation des récepteurs à VP de l'adénohypophyse [24]. Une augmentation de la demi-vie de l'ACTH est observée chez les rats âgés de 14 jours par rapport aux adultes [60].

Cependant, aucune étude ne porte sur l'effet de la séparation maternelle sur la sensibilité des récepteurs à VP ou sur la demi-vie de l'ACTH.

La cause principale de l'augmentation des taux plasmatiques de CORT chez les rats SEP14 est l'élévation des taux d'ACTH. Cette interprétation est supportée par l'augmentation du poids des surrénales de ces rats, qui indique un hyperfonctionnement des surrénales dû au stress chronique [311, 312]. D'autre part, une augmentation de la sensibilité des surrénales peut contribuer à l'augmentation de la sécrétion de la CORT chez les rats SEP14. Cette hypothèse est supportée par les données de la littérature démontrant qu'une injection d'ACTH induit une réponse plus importante chez les rats séparés de la mère [215, 217]. Finalement, l'augmentation de la demi-vie de la CORT peut également contribuer à l'augmentation de ses taux plasmatiques. La demi-vie de la CORT est augmentée chez les rats séparés de la mère, puisque après l'administration d'une même quantité de CORT, on observe des niveaux élevés chez les rats SEP [222]. L'augmentation de la demi-vie de la CORT apparaît également chez les rats adultes ayant subi un jeûne [306].

Contrairement aux rats âgés de 14 jours, dont la réponse corticotrope à la séparation maternelle est proche de la réponse adulte à la déshydratation, les rats âgés de 5 jours ne répondent pas à la séparation. Le manque apparent de changements de la synthèse ou de la libération de la VP et de la CRH chez les rats SEP5 est à l'origine de l'absence de la réponse hormonale à la séparation maternelle.

Le manque de changement de l'expression de l'ARNm de VP chez les rats SEP5 indique qu'à l'âge de cinq jours, l'organisme des jeunes rats est incapable d'initier une réponse adaptative à la déshydratation similaire à celle des adultes. Il est par conséquent probable que ces rats souffrent plus des effets d'une déshydratation de la même durée que les rats SEP14.

L'étude des données bibliographiques supporte en grande partie nos observations. Les taux d'ACTH sont généralement élevés après une séparation maternelle à partir du JPN 14, mais pas avant [200-212, 214, 215, 217-219, 221, 222, 313]. Cependant, les taux de CORT sont généralement élevés à partir du JPN 8 [200, 202-204, 207-209, 211, 219-222, 313]. Cette disparité montre que l'importance des facteurs évoqués déterminant les taux

plasmatiques de CORT (niveaux d'ACTH, sensibilité des surrénales, demi-vie de CORT) peut changer avec l'âge.

L'origine de la réponse hormonale de l'axe corticotrope est moins claire dans la littérature scientifique que dans notre étude, puisqu'elle ne met en évidence l'augmentation ni de la synthèse de CRH, ni de la synthèse de VP. La synthèse de la CRH est inchangée ou diminuée dans le NPV des rats séparés [200-204]. Contrairement à nos résultats, la seule étude qui a évalué l'effet de la séparation maternelle de 24 heures sur l'expression de l'ARNm de la VP dans le NPV n'a pas montré d'augmentation à aucun âge étudié (JPN 6, 12, 18 ; [200]).

Les disparités entre les différentes études peuvent être dues à plusieurs facteurs. D'une part, ces travaux ont été réalisés sur des souches de rats différentes (Long-Evans : notre étude; Sprague-Dawley [201]; hybrides Sprague-Dawley x Long-Evans [200, 202-204, 221, 222]). L'axe corticotrope des rats Sprague-Dawley est très différent de celui des rats Long-Evans, notamment l'immunoréactivité de CRH observée dans le NPV est beaucoup plus important chez les Sprague-Dawley (A. Burlet, communication personnelle). D'autre part, l'expression de l'ARNm de CRH exhibe des fluctuations circadiennes [314], ce qui rend difficile la comparaison des études qui utilisent des tissus récoltés à différentes périodes de la journée. La variabilité de la température et de l'humidité pendant la séparation, ainsi que le fait qu'il ne s'agit pas exactement des mêmes âges ajoutent une variabilité supplémentaire.

En comparant la réponse de l'axe corticotrope à des stimuli stressants entre les jeunes rats et les adultes, nous nous sommes principalement appuyés sur les données concernant la déshydratation, en ce qui concerne les adultes. Pourtant, la séparation maternelle comporte aussi une composante "jeûne" et une autre "stress neurogénique", et la réponse de l'axe corticotrope adulte à ces trois types de stimuli est différente. Pour pouvoir mieux comparer les modifications de l'axe corticotrope aux différents âges, les résultats observés chez nos animaux sont représentés et comparés avec les modifications induites par divers stimuli stressants chez l'adulte (Tableau 16).

C'est vraisemblablement la composante "déshydratation" de la séparation maternelle qui a le plus grand effet sur l'axe corticotrope des rats SEP14. En effet, les changements de l'axe corticotrope induits par la séparation ressemblent aux changements induits par la déshydratation chez les adultes, et moins à ceux induits par le jeûne ou par un

stress neurogénique chronique. Le manque de changement des paramètres de l'axe corticotrope des rats SEP5 induit par la séparation maternelle ne correspond au *pattern* d'aucun stimulus stressant, et indique l'immaturation ou le blocage de l'axe corticotrope.

Tableau 16. Modifications de l'axe corticotrope induites par une séparation maternelle de 24 heures (JPN 5, 14) ou par différents stimuli stressants (adultes). Sources : JPN 5, 14 : nos résultats ; stress chronique [315-317]; déshydratation [298-301, 306, 318]; jeûne [300, 304-307, 319, 320].

	JPN 5 : SEP	JPN 14 : SEP	adulte : dés- hydratation	adulte : jeûne	adulte : stress chronique
VP ARNm NPV	=	↑	↑	= ou ↓	↑
VP EMI	=	↑	=		
VP EME	=	↑	=		↑
CRH ARNm NPV	=	↓	↓	↓	= ou ↑
CRH ME	=	↑	=		=
ACTH plasm.	=	↑	= ou ↑	=, ↑ ou ↓	=
CORT plasm.	=	↑	↑	↑	=

On peut donc conclure que la séparation maternelle, qui est pourtant un stimulus stressant très fort et complexe, n'est pas capable d'induire une réponse chez les rats âgés de 5 jours, traversant la période HRS. La séparation maternelle à cet âge ne stimule également pas la sécrétion de la VP magnocellulaire, qui est pourtant déclenchée chez les rats plus âgés par la déshydratation sans l'intermédiaire de l'axe corticotrope. La séparation induit cependant une réponse robuste de l'axe corticotrope chez les rats âgés de 14 jours, émergés de la période HRS. Cette réponse est en bien des points similaire à celle des adultes, mais on observe aussi des différences.

La question est maintenant de savoir si la réponse de l'axe corticotrope et de la VP magnocellulaire était bénéfique aux rats âgés de 14 jours. En effet, la réponse "stress" a un but adaptatif : changer le métabolisme de sorte que l'organisme puisse mieux traverser la période hostile. Dans le cas de la séparation maternelle, on peut supposer que l'augmentation des taux de CORT a permis aux cellules de ne pas manquer d'énergie, l'augmentation des taux de VP a permis à l'organisme de perdre moins d'eau, etc. Nous allons donc étudier si la séparation maternelle a laissé des séquelles chez les adultes qui l'ont subie, et si ces effets sont plus forts chez les rats SEP5, qui n'ont pas bénéficié d'une réponse de l'axe corticotrope.

3 *Effets persistants de la séparation maternelle*

La déshydratation prolongée et les autres atteintes à l'intégrité de l'organisme subies pendant la séparation maternelle peuvent perturber l'évolution de nombreux systèmes neuronaux, dont l'axe corticotrope (voir Introduction). Les éléments de l'axe corticotrope sont déjà mis en place à l'âge de 5 jours, mais comme nous l'avons vu, l'identification de ce système ne signifie pas une maturité fonctionnelle. La séparation maternelle survient à un âge où la plasticité de l'axe corticotrope est encore importante, et peut ainsi induire de nombreuses modifications persistantes. C'est pourquoi nous avons dans un premier temps évalué les changements persistants de l'axe corticotrope des rats adultes ayant subi une séparation maternelle. Les éléments de l'axe corticotrope jouent un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire (voir Introduction), ainsi nous avons étudié dans un deuxième temps l'effet des modifications de l'axe corticotrope sur le comportement alimentaire.

Nos résultats indiquent que la séparation maternelle a des effets faibles sur l'activité basale de l'axe corticotrope, quel que soit l'âge où elle est subie. L'expression de l'ARNm de la CRH est augmentée chez les rats SEP14 nourris au régime dissocié, mais il n'y a aucun changement quant à l'expression basale de l'ARNm de la CRH et de la VP dans le NPV des rats SEP nourris au régime standard ou au régime cafétéria. Le taux plasmatique basal de CORT est diminué dans les échantillons des rats SEP14 prélevés juste avant le début de la contention, mais les taux d'ACTH et de CORT mesurés dans les échantillons obtenus au sacrifice des rats SEP ne diffèrent pas de ceux des rats NSEP, qu'ils soient nourris au régime standard, aux macronutriments dissociés ou au régime cafétéria.

L'augmentation de l'expression de l'ARNm de la CRH des animaux SEP14 indique qu'ils s'adaptent au stress chronique d'une façon différente des rats NSEP. En effet, l'augmentation des poids des surrénales des rats nourris au régime dissocié par rapport aux rats nourris au régime standard indique que ces premiers sont soumis à un stress chronique [311, 312]. Ce stress, probablement faible, est dû au régime dissocié, et peut refléter le fait que les rats ont une aversion envers ce régime de faible palatabilité qui leur est imposé. On peut par conséquent considérer que l'expression de l'ARNm de la CRH est normale chez les rats SEP14 à l'état basal (régime standard), mais est accrue en situation de stress chronique. Cependant, chez les rats SEP14 nourris au régime dissocié, on observe des taux plasmatiques

normaux d'ACTH et de CORT par rapport aux NSEP, ce qui implique que l'axe corticotrope de ces rats (p.ex. la sensibilité de l'hypophyse) a subi une adaptation fonctionnelle permettant d'éviter les effets néfastes induits par une élévation prolongée des taux plasmatiques de CORT (immunosuppression, diminution de la fonction reproductive [8]).

La diminution des taux de CORT juste avant le début de la contention chez les rats SEP14 indique une diminution ou un décalage du pic circadien de cette hormone. En effet, le prélèvement des échantillons basaux de contention a été réalisé deux heures plus tôt dans le cycle circadien que le sacrifice, ainsi les taux plus hauts obtenus dans les premiers reflètent encore le pic circadien du CORT. La diminution des taux de CORT des rats SEP14 dans les échantillons basaux de contention indique par conséquent que ce pic est plus bas, ou qu'il survient plus tôt que chez les rats NSEP. Un tel décalage du pic circadien a été observé chez les rats adultes ayant été soumis à un stress prénatal [321]. L'effet de la séparation maternelle sur le rythme circadien de la CORT n'a pas été étudié, et les seules données dont on dispose indiquent que les taux diurnes de CORT ne sont pas affectés par ce stress néonatal [5, 216, 221, 224, 228, 229], néanmoins, certaines études ont montré une augmentation [231, 233].

Contrairement à son effet faible sur l'état basal, la séparation maternelle entraîne des modifications importantes de la réponse hormonale de l'axe corticotrope à un stimulus stressant. Ces modifications sont différentes selon l'âge de la séparation, ce qui indique que leur causes diffèrent.

Chez les rats SEP5, la prolongation de la terminaison de la réponse ACTH et CORT à la contention suggère une diminution de l'efficacité du rétrocontrôle négatif par des RG dans le NPV et/ou dans l'adénohypophyse [322, 323]. En effet, les sites principales du rétrocontrôle négatif pour des niveaux élevés de CORT induits par le stress se situent dans les cellules corticotropes de l'hypophyse et dans les neurones du NPV, et fonctionnent par l'intermédiaire des RG [9]. L'étude des travaux confirme l'hypothèse concernant une perturbation fonctionnelle des RG par la séparation maternelle : il a été démontré que ce stress subi à l'âge de 3 jours entraîne à l'âge adulte une diminution de l'expression de l'ARNm des RG dans le NPV et dans l'adénohypophyse [5, 229, 231] et une diminution de la liaison aux RG dans le NPV [233]. De plus, le blocage des RG par une injection intracérébroventriculaire d'antagoniste induit une prolongation de la réponse CORT similaire à celle observée chez nos rats SEP5 [322].

Notre méthode de mesure de liaison biochimique n'a pas permis d'évaluer les RG dans les structures plus petites que l'hippocampe. C'est pourquoi nous avons utilisé une autre méthode, le Western Blot, pour quantifier les récepteurs présents dans l'hypophyse et dans l'hypothalamus. En effet, cette méthode présente plusieurs avantages : elle permet de travailler sur des échantillons plus petits (hypophyse, hypothalamus) et sur des animaux intacts, tandis que la méthode de liaison requiert généralement des animaux surrénalectomisés [289], bien que la surrénalectomie ne soit pas indispensable si l'échantillon plasmatique est prélevé tôt le matin (S. Maccari, communication personnelle). Malheureusement, en raison de la variabilité du nombre de bandes migrantes révélées par le Western Blot, nous n'avons pas pu réaliser une analyse statistique avec l'effectif prévu pour un échantillon plus homogène.

La variabilité de la migration des RG mise en évidence par le WB semble être liée à l'appartenance familiale plutôt qu'au traitement néonatal, au sexe de l'animal, à la dégradation de la protéine ou aux conditions expérimentales. Le profil de migration est déterminé par l'individu, il est constant quel que soit le tissu examiné et la date de la mesure (ces expériences ont été confirmées à deux mois d'intervalle), ce qui exclut les hypothèses de dégradation et de variation des conditions expérimentales. Le fait que le profil de migration soit lié à l'appartenance familiale et non pas au traitement néonatal suggère que sa variabilité est génétique. Une variabilité déterminée génétiquement peut être due à une différence de la structure primaire de la protéine RG, ou à une différence de la quantité d'enzymes qui sont capables de modifier le poids moléculaire des protéines, comme les kinases, les phosphorylases ou les glycosylases. Il est intéressant de savoir qu'une variabilité de migration n'a pas été montrée chez la souche Wistar dans le laboratoire où nous avons réalisé ces expériences, ce qui suggère que cette hétérogénéité génétique est propre à la souche Long-Evans (souche non consanguine).

Il est probable que la variabilité génétique des RG a augmenté la variabilité de nos résultats concernant l'axe corticotrope et a ainsi masqué les différences de liaison de récepteurs. En effet, les différences génétiques entre les récepteurs aux corticostéroïdes peuvent fortement influencer leur sensibilité. Pour citer un cas extrême, contrairement aux rats de la souche consanguine Fischer 344, les RM de la souche consanguine Brown Norway n'ont pas besoin de la stimulation par la CORT pour être activés [324, 325]. Les RM des rats Brown Norway sont donc actives de façon constitutive, ce qui semble être dû à la mutation d'un seul acide aminé [326].

Chez les rats SEP14, l'augmentation du pic d'ACTH après une contention indique une désinhibition de la réponse corticotrope du NPV, qui peut être due à la diminution de l'inhibition tonique d'origine hippocampique [327]. En effet, l'hippocampe joue un rôle inhibiteur constitutif de l'activité corticotrope du NPV, qui passe principalement par l'intermédiaire des RM [9]. D'autre part, la diminution de l'inhibition hippocampique du NPV entraîne généralement une augmentation des taux basaux d'ACTH, ce qui n'est pas le cas chez nos rats SEP14. Afin de vérifier directement cette hypothèse, nous avons mesuré la capacité du binding des RM dans l'hippocampe, qui n'était pas différent chez les rats SEP14. Malgré ce résultat, il reste possible que l'efficacité de transduction des RM soit diminuée, à cause des modifications de la disponibilité intracellulaire de la CORT, de la dissociation du complexe RG-CORT de protéines *heat shock*, de la phosphorylation du récepteur, de sa translocation nucléaire ou de sa liaison à l'ADN [328].

L'élévation de l'amplitude maximale de la réponse ACTH observée chez les rats SEP14 est vraisemblablement due à l'augmentation de la sécrétion de CRH, et/ou à l'augmentation de la sensibilité de l'hypophyse à la CRH (revue [329]). La première hypothèse est appuyée par le fait que le régime de macronutriments séparés (présumé être un stress chronique) augmente l'expression de l'ARNm de la CRH chez les rats SEP14. Malheureusement, il n'existe pas de données concernant la sécrétion de CRH induit par un stimulus stressant aigu chez les rats ayant subi une séparation maternelle de 24 heures. Toutefois, il a été démontré que des rats adultes issus d'un protocole différent de séparation maternelle ont des niveaux élevés de CRH dans l'EM à l'état basal et suivant un stress, après blocage par la colchicine [264]. Ceci suggère que dans notre protocole, l'augmentation de la libération de CRH est à l'origine de l'augmentation du pic d'ACTH induit par la contention des animaux SEP14.

Chez les rats SEP5, la prolongation de la réponse ACTH entraîne la prolongation de la réponse CORT, ce qui suggère que la sensibilité des surrénales à l'ACTH n'est pas modifiée par notre protocole de séparation maternelle. Les résultats d'autres auteurs suggèrent cependant une modification de la sensibilité des surrénales ou une relation non-linéaire entre les taux d'ACTH et les taux de CORT [5, 215, 230]. Notamment, chez les rats prépubères, les changements de la réponse ACTH n'entraînent pas de différence de la réponse CORT [5, 234]. Dans une autre étude, une réponse ACTH inchangée entraîne une diminution de la réponse CORT chez les jeunes rats et une augmentation de la réponse CORT chez les rats

adultes ayant subi une séparation [233]. Ces divergences appellent une exploration approfondie ; en particulier, la sensibilité des surrénales à l'ACTH pourrait être mesurée directement par injection de différentes quantités d'ACTH.

L'absence de modification de la réponse ACTH de nos rats SEP à un stress d'éther indique que l'effet de la séparation maternelle sur la réponse corticotrope peut changer avec le type du stimulus stressant. Cependant, le manque de données cinétiques de la réponse ACTH à l'éther ne nous permet pas d'affirmer que la réponse des rats SEP et NSEP est identique face à ce stimulus stressant systémique. Toutefois, les résultats d'autres études supportent l'importance du stimulus stressant : la réponse ACTH à un stress de nouveauté est normale par rapport aux témoins, mais la réponse ACTH à une contention est diminuée chez les rats adultes ayant été séparés le JPN 3 [233]. Ces résultats mettent en garde contre les généralisations concernant les propriétés de l'axe corticotrope.

La modification du fonctionnement de l'axe corticotrope par la séparation maternelle peut entraîner des modifications du comportement alimentaire, puisque certains de ses éléments, notamment la CRH et la CORT, jouent un rôle important dans sa régulation. D'autre part, les modifications du comportement alimentaire peuvent être également induites par des effets délétères de la séparation maternelle (déshydratation, manque d'énergie). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la façon dont la séparation maternelle modifie le comportement alimentaire adulte. Dans ce contexte, nous nous sommes attendus à ce que le comportement des adultes SEP14 et SEP5 soit modifié, mais pas de la même façon. Le fait que le stress néonatal et une fonction corticotrope anormale jouent un rôle important dans la pathogenèse de plusieurs maladies psychiatriques liées à la prise alimentaire donne une importance pratique à cette question [163, 168, 330, 331].

La diminution de la prise énergétique totale des rats SEP5 nourris au régime dissocié et la diminution de leur consommation de glucides sont vraisemblablement dues à la diminution de la sensibilité des RG dans le NPV, qui est également à l'origine de la prolongation de la réponse ACTH à la contention. La CORT joue un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire, notamment à des conditions normales, elle stimule l'ingestion au moment de son pic circadien [10]. L'implantation d'un antagoniste RG dans le NPV diminue spécifiquement la prise des glucides et la prise alimentaire en général, ce qui

démontre que l'action de la CORT sur les RG du NPV est nécessaire à une prise de glucides et à une prise alimentaire totale normales [117]. La diminution de la sensibilité des RG dans le NPV des rats SEP5 crée une situation similaire à l'implantation d'un antagoniste RG, ce qui mène à la diminution observée de la prise glucidique et de la prise alimentaire totale.

Il semble que malgré les différences de prise énergétique totale et la prise relative des trois macronutriments, le rythme nyctéméral de la prise alimentaire n'est pas modifié chez les rats SEP5 nourris au régime dissocié. Ne disposant pas d'appareils permettant un enregistrement continu, nous ne pouvons confirmer que les rythmes nyctéméraux de prise des macronutriments sont normaux chez nos rats SEP5. Toutefois, la diminution de la consommation de glucides des rats SEP5 est observable tout le long du cycle nyctéméral, il est donc probable que le cycle nyctéméral normal n'est pas altéré (pic au début de la période active [10]). L'augmentation relative de la prise diurne de lipides chez les rats SEP5 est significative seulement à la fin de la période nocturne et au début de la période diurne, mais elle est présente de façon non-significative tout le long du cycle nyctéméral, ce qui rend improbable une perturbation du cycle nyctéméral normal (pic pendant la deuxième moitié de la période active [10]). L'ingestion des protéines est normalement constante durant toute la période active, ce qui semble inchangé chez nos rats SEP5 [10].

Le fait que la diminution de la prise alimentaire totale des rats SEP5 nourris au régime dissocié est observée sur l'ensemble de la journée, et pas seulement pendant la période diurne – comme c'est le cas des rats SEP5 nourris au régime standard – indique que les causes de ces phénomènes ne sont pas exactement les mêmes. Cette hypothèse est supportée par le fait que, contrairement aux rats SEP5 nourris au régime standard, ceux nourris au régime dissocié n'ont pas un poids corporel plus faible que les NSEP. En raison de la rareté des travaux comparant directement les mécanismes de la régulation du comportement alimentaire des rats nourris au régime dissociés avec ceux des rats nourris des croquettes standard, notre hypothèse est difficile à vérifier. Cependant, il est clair que les différences de palatabilité et de métabolisme induite existent entre les deux régimes. Nos résultats sont supportés par les études démontrant que les rats nourris de macronutriments dissociés consomment, par rapport aux rats nourris au régime standard, une partie plus faible de leur prise journalière pendant la phase diurne [332]. De plus, l'exercice diminue la graisse corporelle de façon plus importante chez les rats nourris de macronutriments dissociés que chez les rats nourris de croquettes standard [333].

La modification observée des effets d'un agent sérotoninergique indique des changements dans système sérotoninergique et/ou dans le système CRH-ergique des rats SEP. L'agent sérotoninergique utilisé, la dF inhibe la récapture présynaptique de la sérotonine et augmente sa libération [334]. L'effet anorexigène de la sérotonine est dû au moins en partie au fait qu'elle stimule la libération de la CRH dans l'hypothalamus, qui est lui-même anorexigène [94, 95].

La diminution de l'effet anorexigène de la dF chez les animaux SEP5 dans les deux heures suivant son injection, et l'augmentation de la réponse anorexique par la suite suggère que deux mécanismes différents sont mis en jeu. En effet, dans le cerveau des rats, la dF est rapidement désalkylée en dexnorfenfluramine (dNF) : les niveaux de la dNF dépassent ceux de la dF à partir de deux heures après son injection périphérique [335]. Ainsi, les deux premières heures suivant l'injection de la dF, l'effet hypophagique est dû majoritairement à la dF, et par la suite à la dNF. Ces molécules modifient la prise alimentaire par différents mécanismes.

Les caractéristiques pharmacocinétiques de la dF suggèrent que la diminution de la réponse anorexique pendant les deux heures suivant l'injection de la dF chez les animaux SEP5 peut être attribuée à la modification de l'action de la dF. La voie par laquelle la dF induit une hypophagie est mal connue, en partie en raison de son métabolisme rapide et de sa demi-vie courte, et ne semble pas impliquer une action agonistique directe sur aucun des récepteurs 5-HT [336]. Un des mécanismes probables de l'action anorexique de la dF serait lié à ses effets sur les systèmes catécholaminergiques qui participent aussi dans le stress [337].

L'amplification de la réponse anorexique des rats SEP dans les quatre heures suivant les premières deux heures après l'injection est due à l'accroissement de l'action de la dNF, probablement en raison de l'augmentation de la sensibilité des récepteurs à sérotonine de l'hypothalamus. L'hypophagie induite par la dNF est due à son action sur les récepteurs 5-HT_{2C} et/ou 5-HT_{1B} situés dans l'hypothalamus médian [337-339]. L'amplification de la réponse anorexique des rats SEP dans la période correspondant à l'action de la dNF est, par conséquent, due à l'augmentation de la sensibilité des récepteurs 5-HT_{2C} et/ou 5-HT_{1B} dans l'hypothalamus. Cependant, l'interaction avec la CRH joue un rôle important dans les effets hypophagiques des agonistes 5-HT_{2A/2C}. En effet, l'injection des agonistes 5-HT_{2A/2C} induit une augmentation de l'immunoréactivité Fos des neurones exprimant la CRH dans le NPV [95, 106, 340], qui peut inhiber la prise alimentaire en activant la voie corticotrope et/ou

en augmentant l'activité du système nerveux sympathique [341, 342]. Par conséquent, l'augmentation de la réaction anorexique à la dNF des rats SEP peut être également due à une augmentation de la sensibilité des récepteurs à CRH hypophysaires. Comme il n'existe pas de données concernant les récepteurs 5-HT_{2C} ou 5-HT_{1B} dans l'hypothalamus ou les récepteurs à CRH hypophysaires des rats ayant subi une séparation maternelle, le mécanisme sous-tendant cette modification du comportement alimentaire reste à confirmer.

L'amplification de la réponse anorexique à la contention chez les rats SEP14 peut être due à la désinhibition de la réponse CRH dans le NPV face aux stimuli stressants. L'effet anorexigène de la contention est lié à la CRH, puisque l'hypophagie induite par la contention peut être inhibée par l'injection intracérébroventriculaire d'un antagoniste de CRH [132, 343]. L'existence d'une désinhibition de l'augmentation de la sécrétion de CRH du NPV est supportée par nos données démontrant une augmentation de l'expression de l'ARNm de la CRH chez les rats SEP14 nourris à un régime peu palatable (régime dissocié), ainsi qu'une amplification de la réponse ACTH à un stimulus de contention.

Il reste toutefois possible que l'augmentation de la réponse anorexique à la contention chez les rats SEP14 soit en partie due à des modifications du système sérotoninergique, qui sont probables comme nous l'avons vu. En effet, en dehors l'activation du système CRH-ergique, la contention met en jeu des voies sérotoninergiques pour produire des effets hypophagiques : l'injection de l'antagoniste 5-HT_{2A/2C} ketansérine dans le NPV atténue l'hypophagie induite par la contention chez le rat [137]. En raison de la connexion morphologique des voies sérotoninergiques avec les neurones à CRH du NPV, il est probable que les deux systèmes sont impliqués dans l'effet hypophagique de la contention [94, 95]. Par conséquent, l'augmentation de l'effet anorexigène de la contention des rats SEP14 peut être induite par l'augmentation du nombre/sensibilité des récepteurs 5-HT_{2A/2C} du NPV, ce qui serait cohérent avec les résultats de l'expérience dF. Cependant, contrairement à la dF, la contention n'agit pas sur la réponse anorexique des animaux SEP5, ce qui indique que ces deux stimuli mobilisent des mécanismes différents. L'origine de l'augmentation de la réponse hypophagique à la contention chez les rats SEP14, en l'absence de données dans la littérature, reste à être précisée.

L'absence d'un effet anorexigène chez nos rats témoins, contraire aux observations d'autres auteurs, est probablement due aux différences concernant la réponse aux stimuli stressants entre les souches [132, 133]. En effet, ces auteurs utilisent la souche Sprague-

Dawley, caractérisée par une réponse exagérée de catécholamines à un stimulus stressant par rapport aux Long-Evans [344], qui peut être responsable d'une plus grande sensibilité aux stimuli stressants au niveau comportemental. D'autre part, la prise alimentaire journalière des rats Sprague-Dawley est plus de 25% plus importante que celle des rats Long-Evans, et la différence de consommation entre la période diurne et nocturne est plus prononcée chez les rats Sprague-Dawley (A. Burlet, communication personnelle, voir aussi [345]). Par conséquent, les rats Sprague-Dawley mangent plus de 35% de plus pendant la période nocturne que les rats Long-Evans. Ceci peut contribuer au fait que l'effet anorexigène est plus prononcé chez la souche Sprague-Dawley, la contention ayant été subie juste avant l'extinction des lumières.

L'augmentation de la réponse à l'effet hyperphagique du régime "cafétéria" chez les SEP5 n'est probablement pas directement reliée à des modifications de leur axe corticotrope, mais semble plutôt due à une augmentation de leur réactivité à la dopamine. Le régime "cafétéria" est un modèle expérimental de l'obésité d'origine nutritionnelle très répandu [346, 347]. Dans ce modèle, plusieurs types de nourriture humaine, très palatables et denses en énergie, sont offerts aux animaux afin d'induire une hyperphagie volontaire, qui entraîne l'apparition de l'obésité [346].

L'augmentation du poids corporel des rats SEP5 nourris au régime "cafétéria" indique que leur réactivité aux qualités hédoniques de la nourriture est augmentée. Bien que, en raison des contraintes méthodologiques (plusieurs rats dans la même cage), nous n'ayons pas pu mesurer directement la prise alimentaire, nous supposons que l'augmentation de la prise de poids des rats SEP5 nourris de régime "cafétéria" est due à l'augmentation de leur prise énergétique. L'augmentation de la prise alimentaire de ces animaux contraste avec la diminution de leur prise alimentaire des animaux SEP5 nourris au régime standard ou au régime dissocié. La différence principale entre ces régimes est leur valeur hédonique : le régime "cafétéria" est palatable et varié, le régime standard est relativement palatable mais pas varié, et le régime dissocié est plus varié mais peu palatable.

L'augmentation de la réactivité des rats SEP5 aux qualités hédoniques de la nourriture peut être liée à l'augmentation de leur réactivité à la dopamine. La réponse hédonique à la nourriture est contrôlée par des systèmes dopaminergique et opioïde [348, 349]. En effet, une suppression modérée de la fonction dopaminergique réduit la valeur hédonique des nourritures préférées [348]. Il a été démontré que les rats ayant subi une

séparation maternelle le JPN 3 sont plus sensibles à l'apomorphine, ce qui indique une augmentation de la réactivité nigrostriatale à la dopamine [231]. Cette augmentation de la réactivité peut être liée aux modifications de la fonction corticotrope, notamment à la diminution de la sensibilité des RG dans le NPV et dans l'hypophyse [231]. La relation entre l'hyperréactivité dopaminergique et la diminution du rétrocontrôle de CORT apparaît aussi chez les rats sélectionnés génétiquement pour une augmentation de la sensibilité à l'apomorphine [350].

L'augmentation de l'anxiété des rats SEP14 est probablement liée à l'amplification de la réponse de l'axe corticotrope aux stimuli stressants. La diminution du comportement locomoteur, l'augmentation du nombre de fèces ainsi que de la latence avant le début d'un repas dans l'appareil "open field" observées chez les rats SEP14 indiquent qu'un environnement stressant induit une anxiété élevée chez ces rats par rapport aux témoins [280, 351]. Il a été démontré que l'élévation de l'anxiété peut être liée à l'hyperréactivité de l'axe corticotrope. Notamment, dans un modèle génétique de rats sélectionnés pour une anxiété élevée, on observe une augmentation de la réponse ACTH à un stimulus stressant [352]. Dans un modèle de stress prénatal, l'augmentation de l'anxiété des rats est hautement corrélée avec l'augmentation de la réponse CORT à un stimulus stressant [193]. Chez les rats ayant subi le stress prénatal, l'augmentation de l'anxiété est liée à l'augmentation des niveaux de la CRH de l'amygdale [191, 193]. En effet, la CRH de l'amygdale joue un rôle important dans l'expression de l'anxiété [13]. D'autre part, les afférences de l'amygdale contribuent à l'activation de l'axe corticotrope en réponse à des stimuli stressants neurogéniques [7]. L'activation de l'amygdale peut ainsi être le lien entre l'hyperréactivité de l'axe corticotrope et l'élévation de l'anxiété chez les rats ayant subi un stress prénatal et chez nos rats SEP14.

La participation d'autres systèmes de neurotransmetteurs que l'axe corticotrope dans l'élévation de l'anxiété chez les rats SEP14 ne peut être exclue. En effet, l'anxiété est régulée par plusieurs systèmes de neurotransmetteurs, dont le plus connu est celui du GABA_A-benzodiazépine. Le site de benzodiazépines est un site qui module de façon allostérique le pentamère GABA_A et leurs agonistes diminuent l'anxiété [353]. D'autres études suggèrent que les systèmes sérotoninergique et cholécystokininergique sont impliqués dans l'expression de l'anxiété [353].

Le fait que la littérature scientifique est très divergente en ce qui concerne l'anxiété des rats adultes ayant subi une séparation maternelle nous met en garde contre la

généralisation de nos résultats, et suggère d'évaluer l'anxiété des rats SEP par davantage de tests comportementaux pour tirer des conclusions définitives. En effet, dans une étude, aucun changement d'anxiété n'a été observé dans l'appareil "open field" ou dans le test de croix surélevé chez les rats adultes ayant subi une séparation maternelle de 24 heures le JPN 4, 9 ou 18 [235]. De plus, une séparation maternelle de 24 heures a diminué l'anxiété chez les rats juvéniles (mesurée dans un "open field" [228]). Les rats issus de protocoles du stress néonatal consistant en quelques heures de séparation maternelle répétée plusieurs jours de suite ne se comportent guère de façon plus homogène : la plupart des auteurs n'ont pas trouvé d'effet de la séparation sur l'anxiété, d'autres ont démontré une anxiété diminuée dans "l'open field" mais non pas dans le test de croix, et d'autres ont trouvé une augmentation de l'anxiété dans le test de croix (revue [254]). La divergence de ces résultats peut être due à plusieurs facteurs, dont l'âge au moment du test et le paradigme expérimental utilisé. En effet, même les tests portant le même nom sont très hétérogènes : "l'open field" peut se pratiquer dans une arène circulaire ou carrée, sous un éclairage de luminosité variable qui peut rendre ce nouvel environnement plus ou moins anxiogène [354].

L'absence de modification de la réponse ingestive à une injection de leptine indique que les changements de l'axe corticotrope survenus chez nos rats SEP ne sont pas suffisamment robustes pour influencer la réponse anorexique à ce stimulus. En effet, leur réponse anorexique à la leptine était similaire à celle des témoins, et comparable à celle décrite dans la littérature : la prise alimentaire était diminuée pendant deux jours suivant l'injection, puis elle s'est normalisée (p. ex. [355-357]). Le mécanisme le plus important permettant à la leptine de diminuer la prise alimentaire est l'inhibition du système NPY-ergique orexigène [110, 358, 359]. Toutefois, il semble que la stimulation de la sécrétion de la CRH peut contribuer aux effets anorexigènes de la leptine (revue [360]), l'injection des anticorps anti-CRH atténuant l'effet hypophagique de la leptine [361]. Si, comme les résultats des expériences avec la dF et la contention l'ont suggéré, la sensibilité des récepteurs à CRH hypophysaires de nos rats SEP14 est augmentée, ces rats devraient réagir de façon plus importante à l'injection de la leptine. Tel n'étant pas le cas, notre hypothèse concernant l'augmentation de la sensibilité des récepteurs hypophysaires à CRH n'est donc pas confirmée par cette dernière expérience.

D'autre part, l'absence de modification de la réponse anorexique à la leptine chez les rats SEP14 peut également être due au fait que les actions centrales de la leptine sur les

neurones à CRH contrôlant la prise alimentaire sont dissociables des actions contrôlant l'activation de l'axe corticotrope [101]. Ce point de vue est supporté par les études démontrant que la leptine inhibe l'activation de l'axe corticotrope [111], notamment, la réponse ACTH et CORT à la contention [362], et ce malgré son effet stimulant l'expression de la CRH dans le NPV [110]. La CRH stimulée par la leptine induirait notamment une activation du système nerveux sympathique [363].

La diminution robuste et persistante de la prise alimentaire diurne chez les rats adultes SEP nourris de régime standard ne semble pas être liée à des modifications corticotropes identifiées. Cette conclusion se base sur le fait que les modifications corticotropes identifiées sont tout à fait différentes entre les deux groupes SEP, alors que la modification de leur comportement alimentaire basal est très similaire durant toutes les périodes observées. Le rythme nyctéméral normal de la prise alimentaire se caractérise par une ingestion intense et un stockage des nutriments pendant la période active, ainsi que par la diminution de la prise alimentaire pendant la période inactive en raison de la décomposition et de l'utilisation accrue des stocks nutritionnels de l'organisme [10]. L'apparition de la diminution uniquement pendant la période diurne chez les rats SEP implique une amplification du rythme nyctéméral de la prise alimentaire.

Il est intéressant de noter qu'une séparation maternelle de 24 heures diminue l'expression de l'ARNm du récepteur CRH-R2 dans le NVM, ce qui peut indiquer que la quantité de CRH qui atteint ce noyau est augmentée [211]. Puisque le NVM et notamment ses récepteurs CRH-R2 jouent un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire [364], il est possible que la perturbation néonatale du développement de ces récepteurs par la séparation maternelle soit à l'origine de l'altération du comportement alimentaire à l'âge adulte.

La régulation du poids corporel étant très complexe, et opérant par des processus métaboliques aussi bien que par la prise alimentaire, nous ne pouvons pas déterminer si la diminution de la prise alimentaire est la cause de la diminution du poids corporel, si le contraire est vrai, ou si ces deux paramètres interagissent. Une diminution du poids corporel est généralement observée chez les rats stressés pendant la période périnatale [365-367]. Différentes hypothèses ont été suggérées pour expliquer ce phénomène, comme le manque de nourriture, la suppression de l'hormone de croissance pendant la séparation, la modification des interactions entre la mère et les ratons et un changement de la sécrétion du lait [212, 271,

368]. Il est probable que dans le cas des rats ayant subi une séparation maternelle, plusieurs facteurs interagissent pour le maintien d'un *set-point* moins élevé du poids corporel et de la prise alimentaire.

Ce travail est le premier à montrer que la séparation maternelle a des effets persistants jusqu'à l'âge adulte sur le comportement alimentaire. La prise alimentaire basale, les préférences alimentaires, la réponse hédonique et la réponse ingestive à plusieurs facteurs anorexigènes sont modifiées, d'une façon dépendant de l'âge de la séparation. Il semble que la modification du comportement ingestif est en partie due aux changements de l'axe corticotrope, mais il est évident que la modification d'autres systèmes – sérotoninergique, dopaminergique etc. – entre également en jeu. Les altérations de ces systèmes chez les rats ayant subi une séparation maternelle sont encore peu connues, et davantage d'études sont encore nécessaires pour compléter l'interprétation des modifications observées du comportement alimentaire.

CONCLUSIONS

Le but de ce travail était d'étudier sur un modèle animal les effets d'un stress néonatal. A l'âge néonatal, la maturation du cerveau n'est pas terminée, ce qui le rend vulnérable aux changements. Par conséquent, comme cela a été montré par de nombreuses études, les effets de perturbations à cet âge perdurent jusqu'à l'âge adulte. Chez le rat, ces perturbations se traduisent par des modifications neuroendocriniennes et comportementales. Chez l'homme, l'étude de plusieurs maladies psychiatriques a montré que la vulnérabilité à ces maladies est liée à des traumatismes subis à l'âge néonatal [13, 173, 331]. Notamment, un stress précoce sous forme d'abus émotionnel, physique et/ou sexuel pendant l'enfance augmente fortement le risque de l'apparition de l'anorexie mentale [166].

Nous avons choisi d'étudier chez les rats les effets de 24 heures de séparation maternelle néonatale, qui est composée de plusieurs stimuli stressants forts. Il a été décrit que la séparation maternelle de 24 heures peut avoir des actions sur l'axe corticotrope. Cependant, les données sont plutôt divergentes quant aux facteurs déterminant si une réponse stress est déclenchée, et quant aux voies de l'activation de la réponse CORT.

Par conséquent, nous avons étudié dans un premier temps quels sont les effets immédiats de la séparation maternelle sur l'axe corticotrope des jeunes rats, quelles sont les voies activées, et si les effets dépendent de l'âge où la séparation est subie.

En établissant un protocole de deux groupes expérimentaux, dont l'un a été séparé de la mère le JPN 5 et l'autre le JPN 14, nous avons pu mettre en évidence une absence totale de réaction corticotrope à la séparation pendant la période HRS (JPN 4-12). Le JPN 5, la séparation maternelle n'activait pas la sécrétion de la VP, de la CRH dans le NPV, et par conséquent, celle de l'ACTH dans l'hypophyse et de la CORT dans les surrénales. Au contraire, le JPN 14, après la fin de la période HRS, la séparation maternelle modifiait l'axe corticotrope à tous les niveaux, rappelant l'état de l'axe corticotrope des adultes soumis à un stress chronique. La déshydratation a entraîné une augmentation des niveaux de la VP dans le NPV et probablement dans le NSO, puisque sa quantité était élevée dans l'EMI. La production de la CRH semble cependant diminuée comme chez les adultes déshydratés ou soumis à un jeûne. C'est par conséquent l'augmentation de la sécrétion de la VP (d'origine

parvo- et/ou magnocellulaire) qui a entraîné une augmentation des taux plasmatiques d'ACTH et de CORT.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à des effets persistants chez l'adulte de la séparation maternelle, au niveau de l'axe corticotrope et au niveau comportemental.

Il semblait probable que l'axe corticotrope des rats SEP14 soit modifié par son activation par la séparation maternelle le JPN 14, notamment en raison de l'élévation prolongée des taux plasmatiques de CORT. Nous nous sommes attendus à trouver moins de changements au niveau de l'axe corticotrope des rats SEP5. Nos résultats ont contredit ces attentes : une diminution du rétrocontrôle par la CORT est apparue chez les rats adultes SEP5 en situation de stress, alors que très peu de modifications ont pu être observées chez les rats SEP14. Nos résultats nous amènent à considérer que l'occurrence faible de modifications de l'axe corticotrope chez les rats SEP14 est due au fait que l'élévation des niveaux de CORT et des niveaux de vasopressine pendant la séparation maternelle permet à leur organisme de mieux traverser la période hostile. Les rats SEP5, qui ne bénéficient pas d'une telle aide, sont plus perturbés.

En ce qui concerne le comportement des animaux SEP, nous avons étudié en particulier le comportement alimentaire, en raison de son intérêt pour la recherche clinique et de l'absence de données bibliographiques. Nous avons montré que la prise alimentaire des animaux SEP est profondément modifiée, et que cette modification dépend de l'âge quand la séparation maternelle est subie. Les rats SEP5 avaient une prise alimentaire basale diminuée, une préférence diminuée pour les glucides, une réponse hédonique accrue, une réponse anorexique diminuée à la dF et une réponse anorexique augmentée à la dNF. Cependant, les rats SEP14, ayant également une prise alimentaire basale diminuée et une réponse anorexique augmentée à la dNF, ne montraient pas de changement de préférence pour aucun des trois macronutriments, ni de diminution de réponse à la dF, mais une réponse accrue au stimulus de contention. Les rats SEP14 étaient aussi plus anxieux dans un nouvel environnement.

Nos résultats ont montré pour la première fois que la perturbation de la maturation néonatale par un environnement hostile modifie de façon persistante le comportement alimentaire. Ces modifications peuvent être en partie attribuées à la perturbation de l'axe corticotrope, notamment la diminution de la prise des glucides par les rats SEP5 est

probablement due à la diminution de la sensibilité de leurs RG dans le NPV, et l'augmentation de la réponse hypophagique et de l'anxiété des rats SEP14 face aux stimuli stressants sont attribuables à une désinhibition de la réponse CRH du NPV. Cependant, les autres modifications du comportement alimentaire ne peuvent pas être directement reliées aux changements de l'axe corticotrope, mais plutôt dues aux modifications d'autres systèmes, comme le système sérotoninergique (réponse à la dNF) et dopaminergique (rats cafétéria). La survenue de ces modifications chez les rats SEP14 indique que la séparation maternelle induit des perturbations robustes de la maturation neuronale qui ne peuvent pas être contrecarrées par la réponse corticotrope observée chez les rats SEP14.

Le modèle de séparation maternelle de 24 heures utilisé dans notre étude a montré un avantage comparé au modèle de la séparation répétée : il a permis de dissocier les effets de la séparation subie aux âges différents. Un examen plus approfondi des effets neuraux et endocriniens de la séparation maternelle infligée aux différentes étapes du développement est nécessaire afin de pouvoir identifier les éléments d'un mécanisme complexe sous-tendant les modifications comportementales.

Nos résultats, qui établissent une connexion entre la séparation maternelle et la perturbation du comportement alimentaire et de l'anxiété, supportent l'hypothèse que le stress précoce augmente la vulnérabilité à plusieurs maladies psychiques, comme l'anorexie mentale et la dépression. Dans l'avenir, la séparation maternelle peut devenir un modèle utile des troubles du comportement alimentaire humain. En identifiant les mécanismes sous-tendant les changements du comportement alimentaire induits par un stress précoce, des nouvelles voies de prévention et de guérison peuvent être ouvertes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, and Meaney MJ, *Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1998. **95**(9): p. 5335-5340.
2. Meaney MJ, Mitchell JB, Aitken DH, Bhatnagar S, Bodnoff SR, Iny LJ, and Sarrieau A, *The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life*. Psychoneuroendocrinology, 1991. **16**(1-3): p. 85-103.
3. Mohammed AH, Henriksson BG, Soderstrom S, Ebendal T, Olsson T, and Seckl JR, *Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat*. Behav Brain Res, 1993. **57**(2): p. 183-191.
4. Oitzl MS, Workel JO, Fluttert M, Frosch F, and De Kloet ER, *Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats*. Eur. J. Neurosci., 2000. **12**(10): p. 3771-3780.
5. Van Oers HJ, De Kloet ER, and Levine S, *Persistent, but Paradoxical, Effects on HPA Regulation of Infants Maternally Deprived at Different Ages*. Stress, 1997. **1**(4): p. 249-262.
- 6a. Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, and Merali Z, *Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors?* Int J Dev Neurosci, 1998. **16**(3-4): p. 149-164.
- 6b. Godfrey KM, Barker DJ, *Fetal nutrition and adult disease*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(5 Suppl): p. 1344S-1352S.
- 6c. Phillips DI, Barker DJ, Fall CH, Seckl JR, Whorwood CB, Wood PJ and Walker BR. *Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome?* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 757-760.
7. Herman JP and Cullinan WE, *Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. Trends. Neurosci., 1997. **20**(2): p. 78-84.
8. Sapolsky RM, Romero LM, and Munck AU, *How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions*. Endocr Rev, 2000. **21**(1): p. 55-89.
9. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, and Joels M, *Brain corticosteroid receptor balance in health and disease*. Endocr. Rev., 1998. **19**(3): p. 269-301.
10. Tempel DL and Leibowitz SF, *Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism*. J. Neuroendocrinol., 1994. **6**(5): p. 479-501.
11. Spiess J, Rivier J, Rivier C, and Vale W, *Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1981. **78**(10): p. 6517-6521.
12. Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, and Vale WW, *Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study*. Neuroendocrinology, 1983. **36**(3): p. 165-186.
13. Schulkin J, Gold PW, and McEwen BS, *Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load*. Psychoneuroendocrinology, 1998. **23**(3): p. 219-243.
14. Aguilera G, Rabadan-diehl C, and Nikodemova M, *Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors*. Peptides, 2001. **22**(5): p. 769-774.

15. De Souza EB, *Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders.* Psychoneuroendocrinology, 1995. **20**(8): p. 789-819.
16. Drolet G and Rivest S, *Corticotropin-releasing hormone and its receptors; an evaluation at the transcription level in vivo.* Peptides, 2001. **22**(5): p. 761-777.
17. Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, and Vale WW, *Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor.* Endocrinology, 1993. **133**(6): p. 3058-3061.
18. Chang CP, Pearce Rv ND, O'connell S, and Rosenfeld MG, *Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain.* Neuron, 1993. **11**(6): p. 1187-1195.
19. Chen FM, Bilezikjian LM, Perrin MH, Rivier J, and Vale W, *Corticotropin releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain.* Brain. Res., 1986. **381**(1): p. 49-57.
20. Labrie F, Veilleux R, Lefevre G, Coy DH, Sueiras-diaz J, and Schally AV, *Corticotropin-releasing factor stimulates accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate in rat pituitary corticotrophs.* Science, 1982. **216**(4549): p. 1007-1008.
21. Abou-Samra AB, Catt KJ, and Aguilera G, *Involvement of protein kinase C in the regulation of adrenocorticotropin release from rat anterior pituitary cells.* Endocrinology, 1986. **118**(1): p. 212-217.
22. Cronin MJ, Zysk JR, and Baertschi AJ, *Protein kinase C potentiates corticotropin releasing factor stimulated cyclic AMP in pituitary.* Peptides, 1986. **7**(5): p. 935-938.
23. Antoni FA, *Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age.* Front. Neuroendocrinol., 1993. **14**(2): p. 76-122.
24. Aguilera G and Rabadan-diehl C, *Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation.* Regul. Pept., 2000. **96**(1-2): p. 23-29.
25. Aguilera G, Pham Q, and Rabadan-diehl C, *Regulation of pituitary vasopressin receptors during chronic stress: relationship to corticotroph responsiveness.* J. Neuroendocrinol., 1994. **6**(3): p. 299-304.
26. Kovacs KJ, *Functional neuroanatomy of the parvocellular vasopressinergic system: transcriptional responses to stress and glucocorticoid feedback.* Prog. Brain. Res., 1998. **119**: p. 31-43.
27. Kovacs KJ and Sawchenko PE, *Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons.* J. Neurosci., 1996. **16**(1): p. 262-273.
28. De Goeij DC, Kvetnansky R, Whitnall MH, Jezova D, Berkenbosch F, and Tilders FJ, *Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats.* Neuroendocrinology, 1991. **53**(2): p. 150-159.
29. Ma XM and Aguilera G, *Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids.* Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5642-5650.
30. Eipper BA and Mains RE, *Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides.* Endocr. Rev., 1980. **1**(1): p. 1-27.
31. Vergoni AV and Bertolini A, *Role of melanocortins in the central control of feeding.* Eur. J. Pharmacol., 2000. **405**(1-3): p. 25-32.
32. Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, and Reincke M, *ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation.* Eur. J. Endocrinol., 2001. **144**(3): p. 199-206.
33. Evans RM, *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.* Science, 1988. **240**(4854): p. 889-895.

34. Evans RM and Arriza JL, *A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system*. *Neuron*, 1989. **2**(2): p. 1105-1112.
35. De Kloet ER, *Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control*. *Front. Neuroendocrinol.*, 1991. **12**: p. 95-164.
36. Reul JM and De Kloet ER, *Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation*. *Endocrinology*, 1985. **117**(6): p. 2505-2511.
37. Ahima R, Krozowski Z, and Harlan R, *Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids*. *J. Comp. Neurol.*, 1991. **313**(3): p. 522-538.
38. Fuxe K, Wikstrom AC, Okret S, Agnati LF, Harfstrand A, Yu ZY, Granholm L, Zoli M, Vale W, and Gustafsson JA, *Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor*. *Endocrinology*, 1985. **117**(5): p. 1803-1812.
39. Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, and Levin N, *Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B*. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 1987. **43**: p. 113-173.
40. Ma XM, Levy A, and Lightman SL, *Rapid changes of heteronuclear RNA for arginine vasopressin but not for corticotropin releasing hormone in response to acute corticosterone administration*. *J. Neuroendocrinol.*, 1997. **9**(10): p. 723-728.
- 41a. Ma XM and Aguilera G, *Transcriptional responses of the vasopressin and corticotropin-releasing hormone genes to acute and repeated intraperitoneal hypertonic saline injection in rats*. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, 1999. **68**(1-2): p. 129-140.
- 41b. Ma XM and Aguilera G, *Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids*. *Endocrinology*, 1999. **140**(12): p. 5642-5650.
42. Altman J and Bayer SA, *The development of the rat hypothalamus*. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.*, 1986. **100**: p. 1-178.
43. Baram TZ and Lerner SP, *Ontogeny of corticotropin releasing hormone gene expression in rat hypothalamus--comparison with somatostatin*. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1991. **9**(5): p. 473-478. .
44. Daikoku S, Okamura Y, Kawano H, Tsuruo Y, Maegawa M, and Shibasaki T, *Immunohistochemical study on the development of CRF-containing neurons in the hypothalamus of the rat*. *Cell. Tissue. Res.*, 1984. **238**(3): p. 539-544.
45. Grino M, Young Ws RD, and Burgunder JM, *Ontogeny of expression of the corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in rat pituitary*. *Endocrinology*, 1989. **124**(1): p. 60-68.
46. Chatelain A, Boudouresque F, Chautard T, Dupouy JP, and Oliver C, *Corticotrophin-releasing factor immunoreactivity in the hypothalamus of the rat during the perinatal period*. *J. Endocrinol.*, 1988. **119**(1): p. 59-64.
47. Emanuel RL, Thull DL, Girard DM, and Majzoub JA, *Developmental expression of corticotropin releasing hormone messenger RNA and peptide in rat hypothalamus*. *Peptides*, 1989. **10**(6): p. 1165-1169.
48. Avishai-Eliner S, Yi SJ, and Baram TZ, *Developmental profile of messenger RNA for the corticotropin-releasing hormone receptor in the rat limbic system*. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.*, 1996. **91**(2): p. 159-163.
49. Boudouresque F, Guillaume V, Grino M, Strbak V, Chautard T, Conte-devolx B, and Oliver C, *Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses*. *Neuroendocrinology*, 1988. **48**(4): p. 417-422.
50. Hotta M, Shibasaki T, Masuda A, Imaki T, Demura H, Ohno H, Daikoku S, Benoit R, Ling N, and Shizume K, *Ontogeny of pituitary responsiveness to corticotropin-releasing hormone in rat*. *Regul. Pept.*, 1988. **21**(3-4): p. 245-252.
51. Lugo DI and Pintar JE, *Ontogeny of basal and regulated secretion from POMC cells of the developing anterior lobe of the rat pituitary gland*. *Dev. Biol.*, 1996. **173**(1): p. 95-109.

52. Altstein M and Gainer H, *Differential biosynthesis and posttranslational processing of vasopressin and oxytocin in rat brain during embryonic and postnatal development*. J. Neurosci., 1988. **8**(11): p. 3967-3977.
53. Laurent FM, Hindelang C, Klein MJ, Stoeckel ME, and Felix JM, *Expression of the oxytocin and vasopressin genes in the rat hypothalamus during development: an in situ hybridization study*. Brain. Res. Dev. Brain. Res., 1989. **46**(1): p. 145-154.
54. Trembleau A, Ugrumov M, Roche D, and Calas A, *Vasopressin and oxytocin gene expression in intact rats and under catecholamine deficiency during ontogenesis*. Brain. Res. Bull., 1995. **37**(5): p. 437-448.
55. Buijs RM, Velis DN, and Swaab DF, *Ontogeny of vasopressin and oxytocin in the fetal rat: early vasopressinergic innervation of the fetal brain*. Peptides, 1980. **1**(4): p. 315-324.
56. Tribollet E, Goumaz M, Raggenbass M, and Dreifuss JJ, *Appearance and transient expression of vasopressin and oxytocin receptors in the rat brain*. J. Recept. Res., 1991. **11**(1-4): p. 333-346.
57. Lugo DI, Roberts JL, and Pintar JE, *Analysis of proopiomelanocortin gene expression during prenatal development of the rat pituitary gland*. Mol. Endocrinol., 1989. **3**(8): p. 1313-1324.
- 58a. Taniguchi Y, Kominami R, Yasutaka S, and Kawarai Y, *Proliferation and differentiation of pituitary corticotrophs during the fetal and postnatal period: a quantitative immunocytochemical study*. Anat. Embryol. (Berl.), 2000. **201**(4): p. 229-234.
- 58b. Nemeskeri A, Setalo G and Halasz B, *Ontogenesis of the three parts of the fetal rat adenohypophysis. A detailed immunohistochemical analysis*. Neuroendocrinology, 1988. **48**(5): p. 534-543.
59. Vazquez DM and Akil H, *Development of pituitary pro-opiomelanocortin gene and peptide expression: characterization and effect of repeated intermittent maternal isolation*. Neuroendocrinology, 1992. **56**(3): p. 320-330.
60. Vazquez DM, *Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. Psychoneuroendocrinology, 1998. **23**(7): p. 663-700.
61. Diaz R, Brown RW, and Seckl JR, *Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions*. J. Neurosci., 1998. **18**(7): p. 2570-2580.
62. Rosenfeld P, Sutanto W, Levine S, and De Kloet ER, *Ontogeny of mineralocorticoid (type 1) receptors in brain and pituitary: an in vivo autoradiographical study*. Brain. Res. Dev. Brain. Res., 1990. **52**(1-2): p. 57-62.
63. Yi SJ, Masters JN, and Baram TZ, *Glucocorticoid receptor mRNA ontogeny in the fetal and postnatal rat forebrain*. Mol. Cell. Neurosci., 1994. **5**(5): p. 385-393.
64. Meaney MJ, Sapolsky RM, Aitken DH, and Mcewen BS, *3H]dexamethasone binding in the limbic brain of the fetal rat*. Brain. Res., 1985. **355**(2): p. 297-300.
65. Meaney MJ, Sapolsky RM, and Mcewen BS, *The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. I. Ontogeny and autoregulation*. Brain. Res., 1985. **350**(1-2): p. 159-164.
66. Clayton CJ, Grosser BI, and Stevens W, *The ontogeny of corticosterone and dexamethasone receptors in rat brain*. Brain. Res., 1977. **134**(3): p. 445-453.
67. Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Levine S, and De Kloet ER, *Ontogeny of the type 2 glucocorticoid receptor in discrete rat brain regions: an immunocytochemical study*. Brain. Res., 1988. **470**(1): p. 119-127.
68. Cintra A, Solfrini V, Bunnemann B, Okret S, Bortolotti F, Gustafsson JA, and Fuxe K, *Prenatal development of glucocorticoid receptor gene expression and immunoreactivity in the rat brain and pituitary gland: a combined in situ hybridization and immunocytochemical analysis*. Neuroendocrinology, 1993. **57**(6): p. 1133-1147.

69. Rosenfeld P, Sutanto W, Levine S, and De Kloet ER, *Ontogeny of type I and type II corticosteroid receptors in the rat hippocampus*. Brain. Res., 1988. **470**(1): p. 113-118.
70. Van Eekelen JA, Kiss JZ, Westphal HM, and De Kloet ER, *Immunocytochemical study on the intracellular localization of the type 2 glucocorticoid receptor in the rat brain*. Brain. Res., 1987. **436**(1): p. 120-128.
71. Olpe HR and Mcewen BS, *Glucocorticoid binding to receptor-like proteins in rat brain and pituitary: ontogenetic and experimentally induced changes*. Brain. Res., 1976. **105**(1): p. 121-128.
72. Sapolsky RM and Meaney MJ, *Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period*. Brain. Res., 1986. **396**(1): p. 64-76.
73. Goldman L, Winget C, Hollingshead GW, and Levine S, *Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat*. Neuroendocrinology, 1973. **12**(3): p. 199-211.
74. Vazquez DM and Akil H, *Pituitary-adrenal response to ether vapor in the weanling animal: characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on adrenocorticotropin secretion*. Pediatr. Res., 1993. **34**(5): p. 646-653.
75. Vazquez DM, Morano MI, Taylor L, and Akil H, *Kinetics of radiolabeled adrenocorticotropin hormone in infant and weanling rats*. J. Neuroendocrinol., 1997. **9**: p. 529-536.
76. De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Sutanto W, and Levine S, *Stress, glucocorticoids and development*. Prog. Brain. Res., 1988. **73**: p. 101-120.
77. Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, and Dallman MF, *The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion*. Endocrinology, 1991. **128**(3): p. 1385-1395.
78. Le Magnen J, *Neurobiology of feeding and nutrition*. 1992, San Diego: Academic Press. 385 pp.
79. Schwartz MW, Woods SC, Porte D JR, Seeley RJ, and Baskin DG, *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-671.
80. Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D JR, and Schwartz MW, *Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight*. Brain. Res., 1999. **848**(1-2): p. 114-123.
81. Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, and Rossi-fanelli F, *Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake*. Nutrition, 2000. **16**(10): p. 843-857.
82. Bagdade JD, Bierman EL, and Porte D JR, *The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects*. J. Clin. Invest., 1967. **46**(10): p. 1549-1557.
83. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, Mckee LJ, Bauer TL, and Et AL, *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N. Engl. J. Med., 1996. **334**(5): p. 292-295.
84. Baura GD, Foster DM, Porte D JR, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, and Schwartz MW, *Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain*. J. Clin. Invest., 1993. **92**(4): p. 1824-1830.
85. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, and Porte D JR, *Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans*. Nat. Med., 1996. **2**(5): p. 589-593.
86. Wilding JP, *Leptin and the control of obesity*. Curr Opin Pharmacol, 2001. **1**(6): p. 656-661.

87. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, and Kalra PS, *Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight*. *Endocr. Rev.*, 1999. **20**(1): p. 68-100.
88. Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, and Liu XH, *The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes*. *Physiol. Behav.*, 2001. **74**(4-5): p. 683-701.
89. Rossi M, Beak SA, Choi SJ, Small CJ, Morgan DG, Ghatei MA, Smith DM, and Bloom SR, *Investigation of the feeding effects of melanin concentrating hormone on food intake—action independent of galanin and the melanocortin receptors*. *Brain. Res.*, 1999. **846**(2): p. 164-170.
90. Wang S, Behan J, O'Neill K, Weig B, Fried S, Laz T, Bayne M, Gustafson E, and Hawes BE, *Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor, mch-r2*. *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**(37): p. 34664-34670.
91. Floren A, Land T, and Langel U, *Galanin receptor subtypes and ligand binding*. *Neuropeptides*, 2000. **34**(6): p. 331-337.
92. Wellman PJ, *Norepinephrine and the control of food intake*. *Nutrition*, 2000. **16**(10): p. 837-842.
93. Drucker DJ, *Minireview: the glucagon-like peptides*. *Endocrinology*, 2001. **142**(2): p. 521-527.
94. Liposits Z, Phelix C, and Paull WK, *Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotropin releasing factor (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study*. *Histochemistry*, 1987. **86**(6): p. 541-549.
95. Van De Kar LD, Javed A, Zhang Y, Serres F, Raap DK, and Gray TS, *5-HT_{2A} receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells*. *J. Neurosci.*, 2001. **21**(10): p. 3572-3579.
96. Stanley SA, Small CJ, Murphy KG, Rayes E, Abbott CR, Seal LJ, Morgan DG, Sunter D, Dakin CL, Kim MS, Hunter R, Kuhar M, Ghatei MA, and Bloom SR, *Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats*. *Brain. Res.*, 2001. **893**(1-2): p. 186-194.
97. Hastings JA, McClure-sharp JM, and Morris MJ, *NPY Y1 receptors exert opposite effects on corticotropin releasing factor and noradrenaline overflow from the rat hypothalamus in vitro*. *Brain. Res.*, 2001. **890**(1): p. 32-37.
98. Li C, Chen P, and Smith MS, *Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study*. *Brain. Res.*, 2000. **854**(1-2): p. 122-129.
99. Menzaghi F, Heinrichs SC, Pich EM, Tilders FJ, and Koob GF, *Functional impairment of hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons with immunotargeted toxins enhances food intake induced by neuropeptide Y*. *Brain. Res.*, 1993. **618**(1): p. 76-82.
100. Britton DR, Varela M, Garcia A, and Rosenthal M, *Dexamethasone suppresses pituitary-adrenal but not behavioral effects of centrally administered CRF*. *Life. Sci.*, 1986. **38**(3): p. 211-216.
101. Heinrichs SC and Richard D, *The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior*. *Neuropeptides*, 1999. **33**(5): p. 350-359.
102. Contarino A, Heinrichs SC, and Gold LH, *Understanding corticotropin releasing factor neurobiology: contributions from mutant mice*. *Neuropeptides*, 1999. **33**(1): p. 1-12.
103. Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, and Morley JE, *Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects*. *Brain. Res.*, 1988. **443**(1-2): p. 63-69.

104. Muller MB, Keck ME, Zimmermann S, Holsboer F, and Wurst W, *Disruption of feeding behavior in CRH receptor 1-deficient mice is dependent on glucocorticoids*. Neuroreport, 2000. **11**(9): p. 1963-1966.
105. Coste SC, Murray SE, and Stenzel-poore MP, *Animal models of CRH excess and CRH receptor deficiency display altered adaptations to stress*. Peptides, 2001. **22**(5): p. 733-741.
106. Bovetto S, Rouillard C, and Richard D, *Role of CRH in the effects of 5-HT-receptor agonists on food intake and metabolic rate*. Am. J. Physiol., 1996. **271**(5 Pt 2): p. R1231-R1238.
107. Le Feuvre RA, Aisenthal L, and Rothwell NJ, *Involvement of corticotrophin releasing factor (CRF) in the thermogenic and anorexic actions of serotonin (5-HT) and related compounds*. Brain. Res., 1991. **555**(2): p. 245-250.
108. Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, and Koob GF, *Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y*. Brain Res, 1993. **611**(1): p. 18-24.
109. Raber J, Chen S, Mucke L, and Feng L, *Corticotropin-releasing factor and adrenocorticotrophic hormone as potential central mediators of OB effects*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(24): p. 15057-15060.
110. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, and Baskin DG, *Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus*. J. Clin. Invest., 1996. **98**(5): p. 1101-1106.
111. Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, Chrousos GP, Karp B, Allen C, Flier JS, and Gold PW, *Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function*. Nat. Med., 1997. **3**(5): p. 575-579.
112. Devenport LD, Goodwin KG, and Hopkins PM, *Continuous infusion of aldosterone: correlates of body weight gain*. Pharmacol. Biochem. Behav., 1985. **22**(5): p. 707-709.
113. Tempel DL and Leibowitz SF, *PVN steroid implants: effect on feeding patterns and macronutrient selection*. Brain. Res. Bull., 1989. **23**(6): p. 553-560.
114. Tempel DL, Yamamoto M, Kim T, and Leibowitz SF, *Effects of adrenalectomy on macronutrient selection patterns in the rat*. Pharmacol. Biochem. Behav., 1991. **40**(4): p. 861-866.
115. Tempel DL, Kim T, and Leibowitz SF, *The paraventricular nucleus is uniquely responsive to the feeding stimulatory effects of steroid hormones*. Brain. Res., 1993. **614**(1-2): p. 197-204.
116. Tempel DL, McEwen BS, and Leibowitz SF, *Effects of adrenal steroid agonists on food intake and macronutrient selection*. Physiol. Behav., 1992. **52**(6): p. 1161-1166.
117. Tempel DL, McEwen BS, and Leibowitz SF, *Adrenal steroid receptors in the PVN: studies with steroid antagonists in relation to macronutrient intake*. Neuroendocrinology, 1993. **57**(6): p. 1106-1113.
118. King BM, Zansler CA, Richard SM, Gutierrez C, and Dallman MF, *Paraventricular hypothalamic obesity in rats: role of corticosterone*. Physiol. Behav., 1992. **51**(6): p. 1207-1212.
119. Tokunaga K, Fukushima M, Lupien JR, Bray GA, Kemnitz JW, and Schemmel R, *Effects of food restriction and adrenalectomy in rats with VMH or PVH lesions*. Physiol. Behav., 1989. **45**(6): p. 1131-1137.
120. Leibowitz SF and Alexander JT, *Analysis of neuropeptide Y-induced feeding: dissociation of Y1 and Y2 receptor effects on natural meal patterns*. Peptides, 1991. **12**(6): p. 1251-1260.
121. Stanley BG, Lanthier D, Chin AS, and Leibowitz SF, *Suppression of neuropeptide Y-elicited eating by adrenalectomy or hypophysectomy: reversal with corticosterone*. Brain. Res., 1989. **501**(1): p. 32-36.
122. Roland CR, Bhakthavatsalam P, and Leibowitz SF, *Interaction between corticosterone and alpha-2-noradrenergic system of the paraventricular nucleus in relation to feeding behavior*. Neuroendocrinology, 1986. **42**(4): p. 296-305.

123. Tempel DL and Leibowitz SF, *Glucocorticoid receptors in PVN: interactions with NE, NPY, and Gal in relation to feeding*. Am. J. Physiol., 1993. **265**(5 Pt 1): p. E794-800.
124. Greeno CG and Wing RR, *Stress-induced eating*. Psychol. Bull., 1994. **115**(3): p. 444-464.
125. Badiani A, Jakob A, Rodaros D, and Stewart J, *Sensitization of stress-induced feeding in rats repeatedly exposed to brief restraint: the role of corticosterone*. Brain. Res., 1996. **710**(1-2): p. 35-44.
126. Heinrichs SC, Cole BJ, Pich EM, Menzaghi F, Koob GF, and Hauger RL, *Endogenous corticotropin-releasing factor modulates feeding induced by neuropeptide Y or a tail-pinch stressor*. Peptides, 1992. **13**(5): p. 879-884.
127. Morley JE and Levine AS, *Stress-induced eating is mediated through endogenous opiates*. Science, 1980. **209**(4462): p. 1259-1261.
128. Larson AA and Kondzielski MH, *Serotonin-induced gnawing in rats: comparison with tail pinch-induced gnawing*. Pharmacol. Biochem. Behav., 1982. **16**(3): p. 407-409.
129. Varma M, Chai JK, Meguid MM, Gleason JR, and Yang ZJ, *Effect of operative stress on food intake and feeding pattern in female rats*. Nutrition, 1999. **15**(5): p. 365-372.
130. Harris RB, Zhou J, Youngblood BD, Rybkin II, Smagin GN, and Ryan DH, *Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets*. Am. J. Physiol., 1998. **275**(6 Pt 2): p. R1928-1938.
131. Howell LA, Harris RB, Clarke C, Youngblood BD, Ryan DH, and Gilbertson TA, *The effects of restraint stress on intake of preferred and nonpreferred solutions in rodents*. Physiol. Behav., 1999. **65**(4-5): p. 697-704.
132. Smagin GN, Howell LA, Redmann S JR, Ryan DH, and Harris RB, *Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist*. Am. J. Physiol., 1999. **276**(5 Pt 2): p. R1461-1468.
133. Rybkin II, Zhou Y, Volaufova J, Smagin GN, Ryan DH, and Harris RB, *Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day*. Am. J. Physiol., 1997. **273**(5 Pt 2): p. R1612-1622.
134. Hotta M, Shibasaki T, Arai K, and Demura H, *Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats*. Brain. Res., 1999. **823**(1-2): p. 221-225.
135. Marti O, Marti J, and Armario A, *Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure*. Physiol. Behav., 1994. **55**(4): p. 747-753.
136. Krebs H, Macht M, Weyers P, Weijers HG, and Janke W, *Effects of stressful noise on eating and non-eating behavior in rats*. Appetite, 1996. **26**(2): p. 193-202.
137. Grignaschi G, Mantelli B, and Samanin R, *The hypophagic effect of restraint stress in rats can be mediated by 5-HT₂ receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. Neurosci. Lett., 1993. **152**(1-2): p. 103-106.
138. Vergoni AV, Bertolini A, Wikberg JE, and Schioth HB, *Selective melanocortin MC4 receptor blockage reduces immobilization stress-induced anorexia in rats*. Eur. J. Pharmacol., 1999. **369**(1): p. 11-15.
139. Herman CP and Polivy J, *Anxiety, restraint, and eating behavior*. J. Abnorm. Psychol., 1975. **84**(6): p. 66-72.
140. Frost RO, Goolkasian GA, Ely RJ, and Blanchard FA, *Depression, restraint and eating behavior*. Behav. Res. Ther., 1982. **20**(2): p. 113-121.
141. Schotte DE, Cools J, and McNally RJ, *Film-induced negative affect triggers overeating in restrained eaters*. J. Abnorm. Psychol., 1990. **99**(3): p. 317-320.
142. Heatherton TF, Herman CP, and Polivy J, *Effects of physical threat and ego threat on eating behavior*. J. Pers. Soc. Psychol., 1991. **60**(1): p. 138-143.

143. Wardle J, Steptoe A, Oliver G, and Lipsey Z, *Stress, dietary restraint and food intake*. J. Psychosom. Res., 2000. **48**(2): p. 195-202.
144. Epel E, Lapidus R, McEwen B, and Brownell K, *Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior*. Psychoneuroendocrinology, 2001. **26**(1): p. 37-49.
145. Kalin NH, Takahashi LK, and Chen FL, *Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus*. Brain. Res., 1994. **656**(1): p. 182-186.
146. Liang KC, Melia KR, Campeau S, Falls WA, Miserendino MJ, and Davis M, *Lesions of the central nucleus of the amygdala, but not the paraventricular nucleus of the hypothalamus, block the excitatory effects of corticotropin-releasing factor on the acoustic startle reflex*. J. Neurosci., 1992. **12**(6): p. 2313-2320.
147. Britton DR, Koob GF, Rivier J, and Vale W, *Intraventricular corticotropin-releasing factor enhances behavioral effects of novelty*. Life. Sci., 1982. **31**(4): p. 363-367.
148. Britton DR, Hoffman DK, Lederis K, and Rivier J, *A comparison of the behavioral effects of CRF, sauvagine and urotensin I*. Brain. Res., 1984. **304**(2): p. 201-205.
149. Britton KT, Lee G, Dana R, Risch SC, and Koob GF, *Activating and 'anxiogenic' effects of corticotropin releasing factor are not inhibited by blockade of the pituitary-adrenal system with dexamethasone*. Life. Sci., 1986. **39**(14): p. 1281-1286.
150. Britton KT, Lee G, Vale W, Rivier J, and Koob GF, *Corticotropin releasing factor (CRF) receptor antagonist blocks activating and 'anxiogenic' actions of CRF in the rat*. Brain. Res., 1986. **369**(1-2): p. 303-306.
151. Swerdlow NR, Britton KT, and Koob GF, *Potentiation of acoustic startle by corticotropin-releasing factor (CRF) and by fear are both reversed by alpha-helical CRF (9-41)*. Neuropsychopharmacology, 1989. **2**(4): p. 285-292.
152. Heinrichs SC, Pich EM, Miczek KA, Britton KT, and Koob GF, *Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action*. Brain. Res., 1992. **581**(2): p. 190-197.
153. Schulz DW, Mansbach RS, Sprouse J, Braselton JP, Collins J, Corman M, Dunaiskis A, Faraci S, Schmidt AW, Seeger T, Seymour P, Tingley Fd RD, Winston EN, Chen YL, and Heym J, *CP-154,526: a potent and selective nonpeptide antagonist of corticotropin releasing factor receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996. **93**(19): p. 10477-10482.
154. Skutella T, Probst JC, Renner U, Holsboer F, and Behl C, *Corticotropin-releasing hormone receptor (type I) antisense targeting reduces anxiety*. Neuroscience, 1998. **85**(3): p. 795-805.
155. Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W, and Lee KF, *Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development*. Neuron, 1998. **20**(6): p. 1093-1102.
156. Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, and Wurst W, *Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1*. Nat. Genet., 1998. **19**(2): p. 162-166.
157. Schmidt U, Tiller J, Blanchard M, Andrews B, and Treasure J, *Is there a specific trauma precipitating anorexia nervosa?* Psychol. Med., 1997. **27**(3): p. 523-530.
158. Hetherington MM, *Eating disorders: diagnosis, etiology, and prevention*. Nutrition, 2000. **16**(7-8): p. 547-551.
159. Association AP, *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV*. 1994, Washington, DC: American Psychiatric Association. 886 pp.
160. Devlin MJ, *Assessment and treatment of binge-eating disorder*. Psychiatr. Clin. North. Am., 1996. **19**(4): p. 761-772.

161. Mauri MC, Rudelli R, Somaschini E, Roncoroni L, Papa R, Mantero M, Longhini M, and Penati G, *Neurobiological and psychopharmacological basis in the therapy of bulimia and anorexia*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry., 1996. **20**(2): p. 207-240.
162. Kaye WH, Frank GK, and McConaha C, *Altered dopamine activity after recovery from restricting-type anorexia nervosa*. Neuropsychopharmacology, 1999. **21**(4): p. 503-506.
163. Licinio J, Wong ML, and Gold PW, *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anorexia nervosa*. Psychiatry. Res., 1996. **62**(1): p. 75-83.
164. Stoving RK, Hangaard J, Hansen-nord M, and Hagen C, *A review of endocrine changes in anorexia nervosa*. J. Psychiatr. Res., 1999. **33**(2): p. 139-152.
165. Mortola JF, Rasmussen DD, and Yen SS, *Alterations of the adrenocorticotropin-cortisol axis in normal weight bulimic women: evidence for a central mechanism*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1989. **68**(3): p. 517-522.
166. Kent A and Waller G, *Childhood emotional abuse and eating psychopathology*. Clin. Psychol. Rev., 2000. **20**(7): p. 887-903.
167. Bray GA, *Etiology and pathogenesis of obesity*. Clin. Cornerstone., 1999. **2**(3): p. 1-15.
168. Bjorntorp P and Rosmond R, *Obesity and cortisol*. Nutrition, 2000. **16**(10): p. 924-936.
169. Cavagnini F, Croci M, Putignano P, Petroni ML, and Invitti C, *Glucocorticoids and neuroendocrine function*. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord., 2000. **24 Suppl 2**: p. S77-S79.
170. Hirschfeld RM, *History and evolution of the monoamine hypothesis of depression*. J. Clin. Psychiatry., 2000. **61 Suppl 6**: p. 4-6.
171. Delgado PL, *Depression: the case for a monoamine deficiency*. J. Clin. Psychiatry., 2000. **61 Suppl 6**: p. 7-11.
172. Holsboer F, *The corticosteroid receptor hypothesis of depression*. Neuropsychopharmacology, 2000. **23**(5): p. 477-501.
173. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, and Nemeroff CB, *The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders*. J. Endocrinol., 1999. **160**(1): p. 1-12.
174. McCauley J, Kern DE, Kolodner K, Dill L, Schroeder AF, Dechant HK, Ryden J, Derogatis LR, and Bass EB, *Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds*. Jama, 1997. **277**(17): p. 1362-1368.
175. Keck ME and Holsboer F, *Hyperactivity of CRH neuronal circuits as a target for therapeutic interventions in affective disorders*. Peptides, 2001. **22**(5): p. 835-844.
176. Grace AA, *Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia*. Neuroscience, 1991. **41**(1): p. 1-24.
177. Serretti A, Macciardi F, and Smeraldi E, *Dopamine receptor D2 Ser/Cys311 variant associated with disorganized symptomatology of schizophrenia*. Schizophr. Res., 1998. **34**(3): p. 207-210.
178. Inayama Y, Yoneda H, Sakai T, Ishida T, Nonomura Y, Kono Y, Takahata R, Koh J, Sakai J, Takai A, Inada Y, and Asaba H, *Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia*. Am. J. Med. Genet., 1996. **67**(1): p. 103-105.
179. Adams W, Kendell RE, Hare EH, and Munk-jorgensen P, *Epidemiological evidence that maternal influenza contributes to the aetiology of schizophrenia. An analysis of Scottish, English, and Danish data*. Br. J. Psychiatry., 1993. **163**: p. 522-534.
180. Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, and Bonett D, *Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic*. Arch. Gen. Psychiatry., 1988. **45**(2): p. 189-192.
181. Rantakallio P, Jones P, Moring J, and Von Wendt L, *Association between central nervous system infections during childhood and adult onset schizophrenia and other psychoses: a 28-year follow-up*. Int. J. Epidemiol., 1997. **26**(4): p. 837-843.

182. Cohen CI, *Poverty and the course of schizophrenia: implications for research and policy.* Hosp. Community. Psychiatry., 1993. **44**(10): p. 951-958.
183. Jones PB, Rantakallio P, Hartikainen AL, Isohanni M, and Sipila P, *Schizophrenia as a long-term outcome of pregnancy, delivery, and perinatal complications: a 28-year follow-up of the 1966 north Finland general population birth cohort.* Am. J. Psychiatry., 1998. **155**(3): p. 355-364.
184. Susser ES and Lin SP, *Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945.* Arch. Gen. Psychiatry., 1992. **49**(12): p. 983-988.
185. Susser E, Neugebauer R, Hoek HW, Brown AS, Lin S, Labovitz D, and Gorman JM, *Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence.* Arch. Gen. Psychiatry., 1996. **53**(1): p. 25-31.
186. Ellenbroek BA and Cools AR, *The neurodevelopment hypothesis of schizophrenia: clinical evidence and animal models.* Neurosci. Res. Commun., 1998. **22**(3): p. 127-136.
187. Levine S, Chevalier JA, and Korchin SJ, *The effects of shock and handling in infancy on later avoidance learning.* J. Personality., 1956. **24**: p. 475-493.
188. Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, and Koolhaas JM, *The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity.* J. Neuroendocrinol., 1999. **11**(12): p. 925-933.
189. Vallee M, Maccari S, Dellu F, Simon H, Le Moal M, and Mayo W, *Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat.* Eur. J. Neurosci., 1999. **11**(8): p. 2906-2916.
190. Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, and Le Moal M, *Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress.* J. Neurosci., 1995. **15**(1 Pt 1): p. 110-116.
191. Weinstock M, *Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis?* Neurosci. Biobehav. Rev., 1997. **21**(1): p. 1-10.
192. Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, and Maccari S, *Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats.* J. Neuroendocrinol., 1994. **6**(3): p. 341-345.
193. Vallee M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, and Maccari S, *Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion.* J. Neurosci., 1997. **17**(7): p. 2626-2636.
194. Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, and Mcewen BS, *Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat.* Brain. Res., 1992. **595**(2): p. 195-200.
195. Fride E, Dan Y, Feldon J, Halevy G, and Weinstock M, *Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats.* Physiol. Behav., 1986. **37**(5): p. 681-687.
196. Poltyrev T, Keshet GI, Kay G, and Weinstock M, *Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats.* Dev. Psychobiol., 1996. **29**(5): p. 453-462.
197. Welberg LA and Seckl JR, *Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain.* J. Neuroendocrinol., 2001. **13**(2): p. 113-128.
198. Holson RR, Gough B, Sullivan P, Badger T, and Sheehan DM, *Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats.* Neurotoxicol. Teratol., 1995. **17**(4): p. 393-401.
199. Kuhn CM and Schanberg SM, *Responses to maternal separation: mechanisms and mediators.* Int. J. Dev. Neurosci., 1998. **16**(3-4): p. 261-270.
200. Dent GW, Okimoto DK, Smith MA, and Levine S, *Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny.* Neuroendocrinology, 2000. **71**(6): p. 333-342.

201. Avishai-Eliner S, Yi SJ, Newth CJ, and Baram TZ, *Effects of maternal and sibling deprivation on basal and stress induced hypothalamic-pituitary-adrenal components in the infant rat.* Neurosci. Lett., 1995. **192**(1): p. 49-52.
202. Dent GW, Smith MA, and Levine S, *Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat.* Endocrinology, 2000. **141**(5): p. 1593-1598.
203. Smith MA, Kim SY, Van Oers HJ, and Levine S, *Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain.* Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 4622-4628.
204. Van Oers HJ, De Kloet ER, Whelan T, and Levine S, *Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone.* J. Neurosci., 1998. **18**(23): p. 10171-10179.
205. Vazquez DM, Van Oers H, Levine S, and Akil H, *Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of the maternally deprived infant rat.* Brain. Res., 1996. **731**(1-2): p. 79-90.
206. Pihoker C, Owens MJ, Kuhn CM, Schanberg SM, and Nemeroff CB, *Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor.* Psychoneuroendocrinology, 1993. **18**(7): p. 485-493.
207. Suchecki D, Nelson DY, Van Oers H, and Levine S, *Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation.* Psychoneuroendocrinology, 1995. **20**(2): p. 169-182.
208. Viau V, Sharma S, and Meaney MJ, *Changes in plasma adrenocorticotropin, corticosterone, corticosteroid-binding globulin, and hippocampal glucocorticoid receptor occupancy/translocation in rat pups in response to stress.* J. Neuroendocrinol., 1996. **8**(1): p. 1-8.
209. Avishai-Eliner S, Hatalski CG, Tabachnik E, Eghbal-Ahmadi M, and Baram TZ, *Differential regulation of glucocorticoid receptor messenger RNA (GR-mRNA) by maternal deprivation in immature rat hypothalamus and limbic regions.* Brain. Res. Dev. Brain. Res., 1999. **114**(2): p. 265-268.
210. Eghbal-Ahmadi M, Hatalski CG, Avishai-Eliner S, and Baram TZ, *Corticotropin releasing factor receptor type II (CRF2) messenger ribonucleic acid levels in the hypothalamic ventromedial nucleus of the infant rat are reduced by maternal deprivation.* Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 5048-5051.
211. Eghbal-Ahmadi M, Avishai-Eliner S, Hatalski CG, and Baram TZ, *Differential regulation of the expression of corticotropin-releasing factor receptor type 2 (CRF2) in hypothalamus and amygdala of the immature rat by sensory input and food intake.* J. Neurosci., 1999. **19**(10): p. 3982-3991.
212. Kuhn CM, Pauk J, and Schanberg SM, *Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats.* Dev. Psychobiol., 1990. **23**(5): p. 395-410.
213. Levine S and Suchecki D, *Feeding and the HPA axis: a developmental perspective.* Adv. Biosci., 1993. **90**: p. 11-24.
214. Levine S, Huchton DM, Wiener SG, and Rosenfeld P, *Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat.* Dev. Psychobiol., 1991. **24**(8): p. 547-558.
215. Rosenfeld P, Gutierrez YA, Martin AM, Mallett HA, Alleva E, and Levine S, *Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rats.* Physiol. Behav., 1991. **50**(4): p. 661-671.
216. Rosenfeld P, Wetmore JB, and Levine S, *Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats.* Physiol. Behav., 1992. **52**(4): p. 787-791.

217. Rosenfeld P, Ekstrand J, Olson E, Suchecki D, and Levine S, *Maternal regulation of adrenocortical activity in the infant rat: effects of feeding*. Dev. Psychobiol., 1993. **26**(5): p. 261-277.
218. Stanton ME, Wallstrom J, and Levine S, *Maternal contact inhibits pituitary-adrenal stress responses in preweanling rats*. Dev. Psychobiol., 1987. **20**(2): p. 131-145.
219. Suchecki D, Rosenfeld P, and Levine S, *Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking*. Brain. Res. Dev. Brain. Res., 1993. **75**(2): p. 185-192.
220. Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, and Levine S, *Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat*. Neuroendocrinology, 1993. **57**(2): p. 204-212.
221. Van Oers HJ, De Kloet ER, and Levine S, *Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress*. Brain. Res. Dev. Brain. Res., 1998. **111**(2): p. 245-252.
222. Van Oers HJ, De Kloet ER, Li C, and Levine S, *The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation*. Endocrinology, 1998. **139**(6): p. 2838-2846.
223. Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Levine S, and De Kloet ER, *Ontogeny of corticosteroid receptors in the brain*. Cell. Mol. Neurobiol., 1993. **13**(4): p. 295-319.
224. Suchecki D and Tufik S, *Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats*. Am. J. Physiol., 1997. **273**(4 Pt 2): p. R1332-1338.
225. Dent GW, Smith MA, and Levine S, *Stress-induced alterations in locus coeruleus gene expression during ontogeny*. Brain. Res. Dev. Brain. Res., 2001. **127**(1): p. 23-30.
226. Spear LP and Scalzo FM, *Ontogenetic alterations in the effects of food and/or maternal deprivation on 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratios*. Brain. Res., 1985. **350**(1-2): p. 143-157.
227. Evoniuk GE, Kuhn CM, and Schanberg SM, *The effect of tactile stimulation on serum growth hormone and tissue ornithine decarboxylase activity during maternal deprivation in rat pups*. Commun. Psychopharmacol., 1979. **3**(5): p. 363-370.
228. Suchecki D, Duarte Palma B, and Tufik S, *Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field*. Behav. Brain. Res., 2000. **111**(1-2): p. 99-106.
229. Van Oers HJ, De Kloet ER, and Levine S, *Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone*. J. Neuroendocrinol., 1999. **11**(8): p. 581-588.
230. Erskine MS, Geller E, and Yuwiler A, *Effects of neonatal hydrocortisone treatment of pituitary and adrenocortical response to stress in young rats*. Neuroendocrinology, 1979. **29**(3): p. 191-199.
231. Rots NY, De Jong J, Workel JO, Levine S, Cools AR, and De Kloet ER, *Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine*. J. Neuroendocrinol., 1996. **8**(7): p. 501-506.
232. Sutanto W, Rosenfeld P, De Kloet ER, and Levine S, *Long-term effects of neonatal maternal deprivation and ACTH on hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors*. Brain. Res. Dev. Brain. Res., 1996. **92**(2): p. 156-163.
233. Workel JO, Oitzl MS, Fluttert M, Lesscher H, Karssen A, and de Kloet ER, *Differential and age-dependent effects of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of brown norway rats from youth to senescence*. J Neuroendocrinol, 2001. **13**(7): p. 569-580.
234. Workel JO, Oitzl MS, Ledeboer A, and De Kloet ER, *The Brown Norway rat displays enhanced stress-induced ACTH reactivity at day 18 after 24-h maternal deprivation at day 3*. Brain. Res. Dev. Brain. Res., 1997. **103**(2): p. 199-203.

235. Lehmann J, Pryce CR, Bettschen D, and Feldon J, *The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats*. Pharmacol. Biochem. Behav., 1999. **64**(4): p. 705-715.
236. Leshem M, Maroun M, and Del Canho S, *Sodium depletion and maternal separation in the suckling rat increase its salt intake when adult*. Physiol. Behav., 1996. **59**(1): p. 199-204.
237. Ellenbroek BA and Cools AR, *The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background*. Neuropsychopharmacology, 2000. **23**(1): p. 99-106.
238. Ellenbroek BA, Sluyter F, and Cools AR, *The role of genetic and early environmental factors in determining apomorphine susceptibility*. Psychopharmacology. (berl.), 2000. **148**(2): p. 124-131.
239. De Kloet ER, Rots NY, and Cools AR, *Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent*. Cell. Mol. Neurobiol., 1996. **16**(3): p. 345-356.
240. Ellenbroek BA, Van Den Kroonenberg PT, and Cools AR, *The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats*. Schizophr. Res., 1998. **30**(3): p. 251-260.
241. Lehmann J, Pryce CR, and Feldon J, *Lack of effect of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats*. Schizophr. Res., 2000. **41**(2): p. 365-371.
242. Sibug RM, Oitzl MS, Workel JO, and de Kloet ER, *Maternal deprivation increases 5-HT(1A) receptor expression in the CA1 and CA3 areas of senescent Brown Norway rats*. Brain Res, 2001. **912**(1): p. 95-8.
243. Boxwell J, Ayson P, and Ramenofsky M, *Growth and metabolic parameters in pups of undernourished lactating rats*. Physiol. Behav., 1995. **57**(3): p. 469-475.
244. Bedi KS, *Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life*. Physiol. Behav., 1992. **51**(5): p. 1001-1007.
245. Salas M, Pulido S, Torrero C, and Escobar C, *Neonatal undernutrition and self-grooming development in the rat: long-term effects*. Physiol. Behav., 1991. **50**(3): p. 567-572.
246. Wiggins RC, Fuller G, and Enna SJ, *Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems*. Life. Sci., 1984. **35**(21): p. 2085-2094.
247. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, and Meaney MJ, *Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1659-1662.
248. Pryce CR, Bettschen D, and Feldon J, *Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat*. Dev. Psychobiol., 2001. **38**(4): p. 239-251.
249. Bohn MC, *Glucocorticoid induced teratologies of the nervous system*, in *Glucocorticoid induced teratologies of the nervous system*, J. Yauci, Editor. 1984, Elsevier: Amsterdam. p. 365-387.
250. Zoli M, Agnati LF, Fuxe K, Ferraguti F, Biagini G, Cintra A, and Gustafsson JA, *Long-lasting reduction of glucocorticoid receptor immunoreactivity in the hippocampal field CA1 but not in the dentate gyrus after neonatal treatment with corticosterone in the rat*. Acta. Physiol. Scand., 1990. **138**(4): p. 577-579.
251. Casolini P, Cigliana G, Alema GS, Ruggieri V, Angelucci L, and Catalani A, *Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning in offspring in the early stages of life*. Neuroscience, 1997. **79**(4): p. 1005-1012.
252. Catalani A, Marinelli M, Scaccianoce S, Nicolai R, Muscolo LA, Porcu A, Koranyi L, Piazza PV, and Angelucci L, *Progeny of mothers drinking corticosterone during lactation has lower stress-induced corticosterone secretion and better cognitive performance*. Brain. Res., 1993. **624**(1-2): p. 209-215.
253. Catalani A, Casolini P, Scaccianoce S, Patacchioli FR, Spinozzi P, and Angelucci L, *Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny*. Neuroscience, 2000. **100**(2): p. 319-325.

254. Lehmann J and Feldon J, *Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing?* Rev. Neurosci., 2000. **11**(4): p. 383-408.
255. Levine S, Huchton D, Wiener S, and Rosenfeld P, *Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the infant rat.* Dev. Psychobiol., 1992. **24**: p. 547-558.
256. McCormick CM, Kehoe P, and Kovacs S, *Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: evidence of sensitization.* Int J Dev Neurosci, 1998. **16**(3-4): p. 175-85.
257. Patchev VK, Montkowski A, Rouskova D, Koranyi L, Holsboer F, and Almeida OF, *Neonatal treatment of rats with the neuroactive steroid tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) abolishes the behavioral and neuroendocrine consequences of adverse early life events.* J. Clin. Invest., 1997. **99**(5): p. 962-966.
258. Ladd CO, Owens MJ, and Nemeroff CB, *Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation.* Endocrinology, 1996. **137**(4): p. 1212-1218.
259. Biagini G, Pich EM, Carani C, Marrama P, and Agnati LF, *Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field.* Int. J. Dev. Neurosci., 1998. **16**(3-4): p. 187-197.
260. Wigger A and Neumann ID, *Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats.* Physiol. Behav., 1999. **66**(2): p. 293-302.
261. Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K, and Takahashi K, *Periodic maternal deprivation-induced potentiation of the negative feedback sensitivity to glucocorticoids to inhibit stress-induced adrenocortical response persists throughout the animal's life-span.* Neurosci. Lett., 1994. **168**(1-2): p. 89-92.
262. Ogawa T, Mikuni M, Kuroda Y, Muneoka K, Mori KJ, and Takahashi K, *Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors.* Pharmacol. Biochem. Behav., 1994. **49**(4): p. 961-967.
263. Lau C, Cameron AM, Antolick LL, and Stanton ME, *Repeated maternal separation in the neonatal rat: cellular mechanisms contributing to brain growth sparing.* J. Dev. Physiol., 1992. **17**(6): p. 265-276.
264. Plotsky PM and Meaney MJ, *Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats.* Brain. Res. Mol. Brain. Res., 1993. **18**(3): p. 195-200.
265. Kehoe P, Shoemaker WJ, Triano L, Hoffman J, and Arons C, *Repeated isolation in the neonatal rat produces alterations in behavior and ventral striatal dopamine release in the juvenile after amphetamine challenge.* Behav. Neurosci., 1996. **110**(6): p. 1435-1444.
266. Kehoe P, Shoemaker WJ, Triano L, Callahan M, and Rappolt G, *Adult rats stressed as neonates show exaggerated behavioral responses to both pharmacological and environmental challenges.* Behav. Neurosci., 1998. **112**(1): p. 116-125.
267. Kehoe P, Shoemaker WJ, Arons C, Triano L, and Suresh G, *Repeated isolation stress in the neonatal rat: relation to brain dopamine systems in the 10-day-old rat.* Behav. Neurosci., 1998. **112**(6): p. 1466-1474.
268. Lehmann J, Stohr T, Schuller J, Domeney A, Heidbreder C, and Feldon J, *Long-term effects of repeated maternal separation on three different latent inhibition paradigms.* Pharmacol. Biochem. Behav., 1998. **59**(4): p. 873-882.
269. Zimmerberg B and Shartrand AM, *Temperature-dependent effects of maternal separation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat.* Dev. Psychobiol., 1992. **25**(3): p. 213-226.

270. Lehmann J, Stohr T, and Feldon J, *Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes*. Behav. Brain. Res., 2000. **107**(1-2): p. 133-144.
271. McIntosh J, Anisman H, and Merali Z, *Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects*. Brain. Res. Dev. Brain. Res., 1999. **113**(1-2): p. 97-106.
272. Kaneko WM, Riley EP, and Ehlers CL, *Behavioral and electrophysiological effects of early repeated maternal separation*. Depression, 1994. **2**: p. 43-53.
273. Matthews K, Wilkinson LS, and Robbins TW, *Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood*. Physiol. Behav., 1996. **59**(1): p. 99-107.
274. Iwasaki S, Inoue K, Kiriiike N, and Hikiji K, *Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life*. Physiol. Behav., 2000. **70**(5): p. 551-556.
275. Barbazanges A, Vallee M, Mayo W, Day J, Simon H, Le Moal M, and Maccari S, *Early and later adoptions have different long-term effects on male rat offspring*. J. Neurosci., 1996. **16**(23): p. 7783-7790.
276. Atkinson HC and Waddell BJ, *Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle*. Endocrinology, 1997. **138**(9): p. 3842-3848.
277. Paxinos G and Watson C, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 1982, Sidney: Academic Presspp.
278. Remie R, van Dongen JJ, and Rensema JW, *Permanent cannulation of jugular vein (acc. to Steffens)*, in *Manual of microsurgery on the laboratory rat*, J.J. Van Dongen, et al., Editors. 1990, Elsevier Science Publishers: Amsterdam. p. 159-169.
279. Simon P, Dupuis R, and Costentin J, *Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions*. Behav. Brain. Res., 1994. **61**(1): p. 59-64.
280. Britton DR and Britton KT, *A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity*. Pharmacol. Biochem. Behav., 1981. **15**(4): p. 577-582.
281. Kawata M, Yuri K, and Kumamoto K, *In situ hybridization histochemistry with oligodeoxynucleotide probe as a tool for the detection of neuropeptide mRNAs*. Acta. Histochem. Cytochem., 1990. **23**(3): p. 307-325.
282. Ivell R and Richter D, *Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1984. **81**(7): p. 2006-2010.
283. Shibahara S, Morimoto Y, Furutani Y, Notake M, Takahashi H, Shimizu S, Horikawa S, and Numa S, *Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene*. Embo. J., 1983. **2**(5): p. 775-779.
284. Jingami H, Mizuno N, Takahashi H, Shibahara S, Furutani Y, Imura H, and Numa S, *Cloning and sequence analysis of cDNA for rat corticotropin-releasing factor precursor*. Febs. Lett., 1985. **191**(1): p. 63-66.
285. Rondeel JM and Jackson IM, *Molecular biology of the regulation of hypothalamic hormones*. J. Endocrinol. Invest., 1993. **16**(3): p. 219-246.
286. Robert FR, Leon-henri BP, Chapleur-chateau MM, Girr MN, and Burlet AJ, *Comparison of three immunoassays in the screening and characterization of monoclonal antibodies against arginine-vasopressin*. J. Neuroimmunol., 1985. **9**(3-4): p. 205-220.
287. Reul JM, Van Den Bosch FR, and De Kloet ER, *Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications*. J. Endocrinol., 1987. **115**(3): p. 459-467.
288. Lowry OH, Rosebrouh NJ, Farr AL, and Randall RJ, *Protein measurement with the folin-phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**: p. 265-275.

289. Spencer RL, Kalman BA, Cotter CS, and Deak T, *Discrimination between changes in glucocorticoid receptor expression and activation in rat brain using western blot analysis*. Brain Res, 2000. **868**(2): p. 275-286.
290. Laemmli UK, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
291. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
292. Conte-Devolx B, Oliver C, Giraud P, Castanas E, Boudouresque F, Gillioz P, and Millet Y, *Adrenocorticotropin, and corticosterone secretion in Brattleboro rats*. Endocrinology, 1982. **110**(6): p. 2097-2100.
293. Ammar A, Roseau S, and Butlen D, *Postnatal ontogenesis of vasopressin receptors in the rat collecting duct*. Mol Cell Endocrinol, 1992. **86**(3): p. 193-203.
294. Walker CD, Tankosic P, Tilders FJ, and Bulet A, *Immunotargeted lesions of paraventricular CRF and AVP neurons in developing rats reveal the pattern of maturation of these systems and their functional importance*. J. Neuroendocrinol., 1997. **9**(1): p. 25-41.
295. Yi SJ and Baram TZ, *Corticotropin-releasing hormone mediates the response to cold stress in the neonatal rat without compensatory enhancement of the peptide's gene expression*. Endocrinology, 1994. **135**(6): p. 2364-2368.
296. Leal AM, Carvalho J, and Moreira AC, *Ontogenetic diurnal variation of adrenal responsiveness to ACTH and stress in rats*. Horm Res, 1999. **52**(1): p. 25-29.
297. Bulet A, Chateau-Chapleur M, and Dreyfuss F, *The vasopressinergic infundibular fibres: collaterals from the hypothalamo-neurohypophysial tract?*, in *Neuroendocrinology of vasopressin, corticotropin and opiomelanocortins*, A.J. Baertschi and J.J. Dreifuss, Editors. 1982, Academic Press: London. p. 95-105.
298. Aguilera G, Lightman SL, and Kiss A, *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during water deprivation*. Endocrinology, 1993. **132**(1): p. 241-248.
299. Meeker RB, Greenwood RS, and Hayward JN, *Vasopressin mRNA expression in individual magnocellular neuroendocrine cells of the supraoptic and paraventricular nucleus in response to water deprivation*. Neuroendocrinology, 1991. **54**(3): p. 236-247.
300. Ogasa T, Hashimoto K, and Ota Z, *Food deprivation decreases vasopressin mRNA in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus in rats*. Acta. Med. Okayama., 1991. **45**(4): p. 283-293.
301. Sladek CD and Olschowka JA, *Dehydration induces Fos, but not increased vasopressin mRNA in the supraoptic nucleus of aged rats*. Brain. Res., 1994. **652**(2): p. 207-215.
302. Alonso G and Assenmacher I, *Radioautographic studies on the neurohypophysial projections of the supraoptic and paraventricular nuclei in the rat*. Cell. Tissue. Res., 1981. **219**(3): p. 525-534.
303. Watts AG and Sanchez-watts G, *A cell-specific role for the adrenal gland in regulating CRH mRNA levels in rat hypothalamic neurosecretory neurons after cellular dehydration*. Brain. Res., 1995. **687**(1-2): p. 63-70.
304. Brady LS, Smith MA, Gold PW, and Herkenham M, *Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats*. Neuroendocrinology, 1990. **52**(5): p. 441-447.
305. Hwang BH and Guntz JM, *Downregulation of corticotropin-releasing factor mRNA, but not vasopressin mRNA, in the paraventricular hypothalamic nucleus of rats following nutritional stress*. Brain. Res. Bull., 1997. **43**(5): p. 509-514.
306. Kiss A, Jezova D, and Aguilera G, *Activity of the hypothalamic pituitary adrenal axis and sympathoadrenal system during food and water deprivation in the rat*. Brain. Res., 1994. **663**(1): p. 84-92.

307. Suemaru S, Hashimoto K, Hattori T, Inoue H, Kageyama J, and Ota Z, *Starvation-induced changes in rat brain corticotropin-releasing factor (CRF) and pituitary-adrenocortical response*. Life. Sci., 1986. **39**(13): p. 1161-1166.
308. Chateau M, *Mise en évidence de vasopressine dans l'antéhypophyse. Recherche de son intervention dans l'activité corticotrope.*, in *Sciences*. 1976, Nancy I.: Nancy, France.
309. Bergland RM and Page RB, *Can the pituitary secrete directly to the brain? (Affirmative anatomical evidence)*. Endocrinology, 1978. **102**(5): p. 1325-1338.
310. Buma P and Nieuwenhuys R, *Ultrastructural demonstration of oxytocin and vasopressin release sites in the neural lobe and median eminence of the rat by tannic acid and immunogold methods*. Neurosci. Lett., 1987. **74**(2): p. 151-157.
311. Dallman MF, Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Walker CD, Strack AM, and Cascio CS, *Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis*. J Neuroendocrinol, 1991. **4**(5): p. 517-526.
312. Blanchard RJ, Nikulina JN, Sakai RR, McKittrick C, McEwen B, and Blanchard DC, *Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress*. Physiol Behav, 1998. **63**(4): p. 561-569.
313. Vazquez DM, Lopez JF, Van Hoers H, Watson SJ, and Levine S, *Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat*. Brain. Res., 2000. **855**(1): p. 76-82.
314. Kwak SP, Morano MI, Young EA, Watson SJ, and Akil H, *Diurnal CRH mRNA rhythm in the hypothalamus: decreased expression in the evening is not dependent on endogenous glucocorticoids*. Neuroendocrinology, 1993. **57**(1): p. 96-105.
315. Hauger RL, Lorang M, Irwin M, and Aguilera G, *CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress*. Brain. Res., 1990. **532**(1-2): p. 34-40.
316. Marti O, Harbuz MS, Andres R, Lightman SL, and Armario A, *Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress*. Brain. Res., 1999. **821**(1): p. 1-7.
317. De Goeij DC, Dijkstra H, and Tilders FJ, *Chronic psychosocial stress enhances vasopressin, but not corticotropin-releasing factor, in the external zone of the median eminence of male rats: relationship to subordinate status*. Endocrinology, 1992. **131**(2): p. 847-853.
318. Grinevich V, Ma XM, Verbalis J, and Aguilera G, *Hypothalamic pituitary adrenal axis and hypothalamic-neurohypophyseal responsiveness in water-deprived rats*. Exp. Neurol., 2001. **171**(2): p. 329-341.
319. Burlet AJ, Jhanwar-uniyal M, Chapleur-chateau M, Burlet CR, and Leibowitz SF, *Effect of food deprivation and refeeding on the concentration of vasopressin and oxytocin in discrete hypothalamic sites*. Pharmacol. Biochem. Behav., 1992. **43**(3): p. 897-905.
320. Makino S, Kaneda T, Nishiyama M, Asaba K, and Hashimoto K, *Lack of decrease in hypothalamic and hippocampal glucocorticoid receptor mRNA during starvation*. Neuroendocrinology, 2001. **74**(2): p. 120-128.
321. Koehl M, Darnaudery M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, and Maccari S, *Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender*. J Neurobiol, 1999. **40**(3): p. 302-315.
322. Ratka A, Sutanto W, Bloemers M, and de Kloet ER, *On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation*. Neuroendocrinology, 1989. **50**(2): p. 117-123.
323. Spencer RL, Kim PJ, Kalman BA, and Cole MA, *Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity*. Endocrinology, 1998. **139**(6): p. 2718-2726.

324. Marissal-Arvy N, Mormede P, and Sarrieau A, *Strain differences in corticosteroid receptor efficiencies and regulation in Brown Norway and Fischer 344 rats*. J. Neuroendocrinol., 1999. **11**(4): p. 267-273.
325. Marissal-Arvy N, Ribot E, Sarrieau A, and Mormede P, *Is the mineralocorticoid receptor in Brown Norway rats constitutively active?* J. Neuroendocrinol., 2000. **12**(6): p. 576-588.
326. Arvy D, Moisan NP, and Mormede P. *Un locus sur le chromosome 19 significativement associé à l'insensibilité du rat Brown Norway à la surrénalectomie : implication fonctionnelle du récepteur aux minéralocorticoïdes ?* in *5e Colloque de la Société des Neurosciences*. 2001. Toulouse. 99.
327. Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec IS, Weber A, Bachmann C, Bilang-Bleuel A, Holsboer F, and Linthorst AC, *The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function*. Eur J Pharmacol, 2000. **405**(1-3): p. 235-249.
328. Bamberger CM, Schulte HM, and Chrousos GP, *Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids*. Endocr. Rev., 1996. **17**(3): p. 245-261.
329. Lopez JF, Akil H, and Watson SJ, *Neural circuits mediating stress*. Biol Psychiatry, 1999. **46**(11): p. 1461-1471.
330. Gross MJ, Kahn JP, Laxenaire M, Nicolas JP, and Burlet C, *Corticotropin-releasing factor and anorexia nervosa: reactions of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to neurotropic stress*. Ann Endocrinol (Paris), 1994. **55**(6): p. 221-228.
331. Kent A, Waller G, and Dagnan D, *A greater role of emotional than physical or sexual abuse in predicting disordered eating attitudes: the role of mediating variables*. Int. J. Eat. Disord., 1999. **25**(2): p. 159-167.
332. Larue-Achagiotis C, Martin C, Verger P, and Louis-sylvestre J, *Dietary self-selection vs. complete diet: body weight gain and meal pattern in rats*. Physiol. Behav., 1992. **51**(5): p. 995-999.
333. Rieth N and Larue-achagiotis C, *Exercise training decreases body fat more in self-selecting than in chow-fed rats*. Physiol. Behav., 1997. **62**(6): p. 1291-1297.
334. Borroni E, Ceci A, Garattini S, and Mennini T, *Differences between d-fenfluramine and d-norfenfluramine in serotonin presynaptic mechanisms*. J Neurochem, 1983. **40**(3): p. 891-893.
335. Caccia S, Anelli M, Ferrarese A, Fracasso C, and Garattini S, *The role of D-norfenfluramine in the indole-depleting effect of D-fenfluramine in the rat*. Eur. J. Pharmacol., 1993. **233** : p. 71-77.
336. Porter RH, Benwell KR, Lamb H, Malcolm CS, Allen NH, Revell DF, Adams DR, and Sheardown MJ, *Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells*. Br. J. Pharmacol., 1999. **128**(1): p. 13-20.
337. Vickers SP, Dourish CT, and Kennett GA, *Evidence that hypophagia induced by d-fenfluramine and d-norfenfluramine in the rat is mediated by 5-HT_{2C} receptors*. Neuropharmacology, 2001. **41**(2): p. 200-209.
338. Curzon G, Gibson EL, and Oluyomi AO, *Appetite suppression by commonly used drugs depends on 5-HT receptors but not on 5-HT availability*. Trends. Pharmacol. Sci., 1997. **18**(1): p. 21-25.
339. Leibowitz SF and Alexander JT, *Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight*. Biol. Psychiatry., 1998. **44**(9): p. 851-864.
340. Javed A, Kamradt MC, Van De Kar LD, and Gray TS, *D-Fenfluramine induces serotonin-mediated Fos expression in corticotropin-releasing factor and oxytocin neurons of the hypothalamus, and serotonin-independent Fos expression in enkephalin and neurotensin neurons of the amygdala*. Neuroscience, 1999. **90**(3): p. 851-858.
341. Glowa JR, Barrett JE, Russell J, and Gold PW, *Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors*. Peptides, 1992. **13**(3): p. 609-621.

342. Richard D, *Involvement of corticotropin-releasing factor in the control of food intake and energy expenditure.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1993. **697**: p. 155-172.
343. Krahn DD, Gosnell BA, Grace M, and Levine AS, *CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding.* Brain. Res. Bull., 1986. **17**(3): p. 285-289.
344. Perkin MF, Terblanche SE, Boschmans SA, Van Jaarsveld A, Nel W, and Lamarque KJ, *A comparative study on the effects of diethyl ether and thiopentone sodium on plasma catecholamine levels in the rat.* Comp. Biochem. Physiol. C., 1992. **102**(2): p. 293-296.
345. Pu S, Dube MG, Kalra PS, and Kalra SP, *Regulation of leptin secretion: effects of aging on daily patterns of serum leptin and food consumption.* Regul Pept, 2000. **92**(1-3): p. 107-111.
346. Sclafani A and Springer D, *Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes.* Physiol Behav, 1976. **17**(3): p. 461-471.
347. Mandenoff A, Lenoir T, and Apfelbaum M, *Tardy occurrence of adipocyte hyperplasia in cafeteria-fed rat.* Am J Physiol, 1982. **242**(3): p. R349-351.
348. Berridge KC, *Food reward: brain substrates of wanting and liking.* Neurosci. Biobehav. Rev., 1996. **20**(1): p. 1-25.
349. Glass MJ, Billington CJ, and Levine AS, *Opioids and food intake: distributed functional neural pathways?* Neuropeptides, 1999. **33**(5): p. 360-368.
350. Rots NY, Cools AR, De Jong J, and De Kloet ER, *Corticosteroid feedback resistance in rats genetically selected for increased dopamine responsiveness.* J. Neuroendocrinol., 1995. **7**(2): p. 153-161.
351. Green S and Hodges H, *Animal models of anxiety*, in *Behavioural models in psychopharmacology : theoretical, industrial and clinical perspectives.*, P. Willner, Editor. 1991, Cambridge University Press: Cambridge. p. 21-49.
352. Landgraf R, Wigger A, Holsboer F, and Neumann ID, *Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour.* J. Neuroendocrinol., 1999. **11**(6): p. 405-407.
353. Clement Y and Chapouthier G, *Biological bases of anxiety.* Neurosci Biobehav Rev, 1998. **22**(5): p. 623-633.
354. Igarashi E and Takeshita S, *Effects of illumination and handling upon rat open field activity.* Physiol Behav, 1995. **57**(4): p. 699-703.
355. Azain MJ, Wang T, Hulsey MG, Qian H, Hartzell DL, and Baile CA, *Effects of intracerebroventricularly administered leptin on protein selection in the rat.* Physiol. Behav., 1999. **66**(3): p. 537-541.
356. Choi S, Sparks R, Clay M, and Dallman MF, *Rats with hypothalamic obesity are insensitive to central leptin injections.* Endocrinology, 1999. **140**(10): p. 4426-4433.
357. Wang T, Hartzell DL, Rose BS, Flatt WP, Hulsey MG, Menon NK, Makula RA, and Baile CA, *Metabolic responses to intracerebroventricular leptin and restricted feeding.* Physiol. Behav., 1999. **65**(4-5): p. 839-848.
358. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, and Et AL, *The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product.* Nature, 1995. **377**(6549): p. 530-532.
359. Yokosuka M, Xu B, Pu S, Kalra PS, and Kalra SP, *Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake.* Physiol. Behav., 1998. **64**(3): p. 331-338.
360. Inui A, Lowry OH, Rosebrouh NJ, Farr AL, and Randall RJ, *Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides--mediation of the actions of leptin.* Trends Neurosci, 1999. **22**(2): p. 62-67.
361. Okamoto S, Kimura K, and Saito M, *Anorectic effect of leptin is mediated by hypothalamic corticotropin-releasing hormone, but not by urocortin, in rats.* Neurosci. Lett., 2001. **307**(3): p. 179-182.

362. Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schonert B, Stephens TW, and Flier JS, *Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress*. *Endocrinology*, 1997. **138**(9): p. 3859-3863.
363. Rahmouni K and Haynes WG, *Leptin signaling pathways in the central nervous system: interactions between neuropeptide Y and melanocortins*. *Bioessays*, 2001. **23**(12): p. 1095-1099.
364. Smagin GN, Howell LA, Ryan DH, De Souza EB, and Harris RB, *The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor- and urocortin-induced anorexia*. *Neuroreport*, 1998. **9**(7): p. 1601-6.
365. Drago F, Di Leo F, and Giardina L, *Prenatal stress induces body weight deficit and behavioural alterations in rats: the effect of diazepam*. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 1999. **9**(3): p. 239-245.
366. Gilles EE, Schultz L, and Baram TZ, *Abnormal corticosterone regulation in an immature rat model of continuous chronic stress*. *Pediatr. Neurol.*, 1996. **15**(2): p. 114-119.
367. Vallee M, Mayo W, Maccari S, Le Moal M, and Simon H, *Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response*. *Brain. Res.*, 1996. **712**(2): p. 287-292.
368. Arbogast LA and Voogt JL, *The responsiveness of tuberoinfundibular dopaminergic neurons to prolactin feedback is diminished between early lactation and midlactation in the rat*. *Endocrinology*, 1996. **137**(1): p. 47-54.

PUBLICATIONS

Ce travail a donné lieu aux publications suivants :

- Z. Penke, B. Fernette, C. Nyakas and A. Burlet : Early maternal deprivation modifies feeding response to pharmacological and behavioral agents in adult rats. *Neuropharmacology*, 2001, **42** : 421-427.
- Z. Penke, K. Felszeghy, B. Fernette, C. Nyakas and A. Burlet : Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the rat stress response, feeding and stress-related behaviour. *European Journal of Neuroscience*, 2001, **14** : 747-755.
- Z. Penke, B. Fernette, C. Nyakas and A. Burlet: Maternal deprivation modifies the stress response and the feeding behavior of adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 2000, **12** : 96. (*abstract*)

Autres travaux :

- M. Das, Z. Penke and J.A.R.A.M. van Hooff : Postconflict affiliation and stress-related behavior of long-tailed macaque aggressors. *International Journal of Primatology*, 1998, **19** : 53-71.
- M. Das, Z. Penke and J.A.R.A.M. van Hooff : Affiliation between aggressors and third parties following conflicts in long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *International Journal of Primatology*, 1997, **18** : 157-179.
- Z. Penke, T. Jiang, M. de Talance and C. Burlet : Approche psychoneuroendocrinienne du dégoût alimentaire : étude préliminaire chez le sujet humain. *Annales d'Endocrinologie*, 1997, **58** : 1S33. (*abstract*)

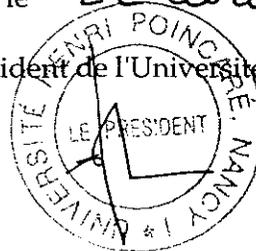
Mademoiselle PENKE Zsuzsa

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en NEUROSCIENCES & COMPORTEMENT

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER n° 730

Nancy, le 22 avril 2003

Le Président de l'Université



Cl. BURLET

Le but de ce travail était d'étudier les effets immédiats et persistants d'un stress néonatal (séparation maternelle) sur l'axe corticotrope et la prise alimentaire chez le rat.

Les ratons expérimentaux sont placés 24 heures dans une couveuse, le JPN 5 (rats SEP5), ou le JPN 14 (rats SEP14), les ratons témoins ne sont pas séparés de la mère.

La séparation maternelle n'induit aucune réaction corticotrope le JPN 5, mais elle active cet axe le JPN 14. A l'âge adulte, une diminution du rétrocontrôle par la corticostérone apparaît chez les rats SEP5 en situation de stress, alors qu'une augmentation transitoire de la réponse ACTH est observée chez les rats SEP14.

Nous montrons pour la première fois que la perturbation de la maturation néonatale modifie de façon persistante le comportement alimentaire, et ce de façon dépendant de l'âge où elle est subie. Les deux groupes SEP ont une prise alimentaire basale diminuée et une réponse anorexique à la dexnorfenfluramine augmentée. Les rats SEP5 ont aussi une préférence diminuée pour les glucides, une réponse hédonique accrue et une réponse anorexique diminuée à la dexfenfluramine. Les rats SEP14 répondent plus fortement au stimulus de contention.

Nos résultats, qui établissent une connexion entre la séparation maternelle et la perturbation du comportement alimentaire et de l'anxiété, supportent l'hypothèse que le stress précoce augmente la vulnérabilité à plusieurs maladies psychiques, comme l'anorexie mentale et la dépression. Dans l'avenir, la séparation maternelle peut devenir un modèle utile des troubles du comportement alimentaire humain.

Neonatal stress and long-term regulation of food intake in the rat : neuroendocrine, morphological and behavioural explorations.

The aim of this work was to study immediate and persistent effects of a neonatal stress (maternal deprivation) on the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and on the food intake in the rat.

Experimental rat pups were placed in an incubator either on the 5th or the 14th postnatal day (DEP5 or DEP14 treatment); control rats were not separated from the mother.

Maternal deprivation induced no HPA response on the 5th postnatal day, but it activated the HPA axis on the 14th postnatal day. In adults, a diminution of the corticosterone feedback appeared in DEP5 rats in a stressful situation, whereas a transitory increase of the ACTH response was observed in DEP14 rats.

We show for the first time that the perturbation of neonatal maturation modifies persistently feeding behaviour, and this modification depends on the age at which deprivation is experienced. Both DEP groups had a diminished basal food intake and an increased anorexic response to dexnorfenfluramine. DEP5 rats had also a decreased preference for carbohydrates, an increased hedonic response, and a decreased anorexic response to dexfenfluramine. The anorexic response of DEP14 rats to restraint stress was increased.

Our results, showing a connection between maternal deprivation and disturbed feeding behaviour as well as anxiety, support the hypothesis according to which early stress increases vulnerability to many psychiatric diseases, such as anorexia nervosa and depression. In the future, maternal deprivation can become a useful model for the research into human eating disorders.

Discipline : Neurosciences et comportement

Mots clés : stress néonatal, axe corticotrope, comportement alimentaire, préférences alimentaires, anxiété, rat

Equipe d'Accueil 3453 Systèmes Neuromodulateurs des Comportements Ingestifs
38, rue Lionnois, Nancy