

Chapitre 1 : Présentation de l'hormone de mélanocortine et de son récepteur

1. L'hormone de mélan-concentration (MCH)

1.1. Structure

L'hormone de mélan-concentration (*melanin-concentrating hormone*, MCH) est un neuropeptide cyclique qui a été initialement isolé à partir de la glande pituitaire du saumon (Figure 1) (Baker, 1993; Kawauchi *et al.*, 1983; Minth *et al.*, 1989; Nahon, Schoepfer & Vale, 1989b; Ono *et al.*, 1988). Cette hormone circulante induit un éclaircissement de la peau chez les poissons en réaction au stress ou lors de mimétisme (Baker, 1988; Green & Baker, 1991a; Green, Baker & Kawauchi, 1991b). De nos jours, ce neuropeptide a été décelé chez tous les mammifères, incluant le rat (Nahon *et al.*, 1989a; Vaughan *et al.*, 1989), la souris (Breton, Schorpp & Nahon, 1993) et l'humain (Presse *et al.*, 1990).

Chez les mammifères, la MCH est produite à partir de la pré-pro hormone de mélan-concentration (ppMCH) qui génère également deux autres peptides : le neuropeptide EI (NEI) et le neuropeptide GE (NGE) (Bittencourt *et al.*, 1992; Nahon *et al.*, 1989a; Presse *et al.*, 1990).

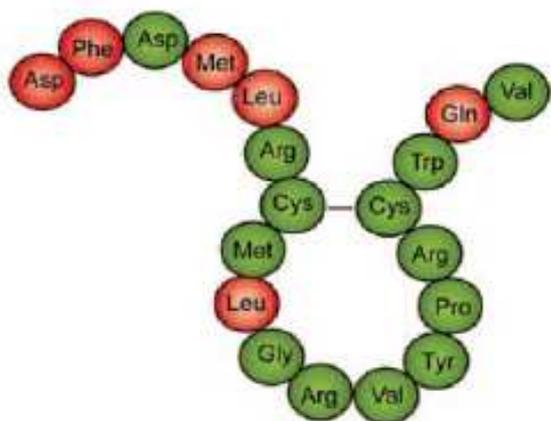


Figure 1. Séquence d'acides aminés du peptide MCH chez les mammifères. Les résidus verts sont communs aux mammifères et au saumon, les rouges sont différents chez le saumon (Pissios, Bradley & Maratos-Flier, 2006, fig. 1, p. 607).

Au niveau des neurones de l'hypothalamus, il a été montré *in vitro* que la MCH inhibe l'activité tant pré- que post-synaptique de ces derniers. Ainsi, la transmission glutamatergique et GABAergique (dans une moindre mesure) au sein de l'hypothalamus sont diminuées, voire complètement supprimées, par l'application de MCH via un mécanisme calcium-dépendant réduisant la libération des neurotransmetteurs (Gao & van den Pol, 2001).

1.2. Distribution neuroanatomique

Les corps cellulaires des neurones produisant la MCH sont principalement localisés dans l'hypothalamus latéral (LH), et dans la « zona incerta » (ZI) (Bittencourt *et al.*, 1992; Hervieu *et al.*, 2000; Oldfield *et al.*, 2002; Presse *et al.*, 1990; Skofitsch *et al.*, 1985), deux régions impliquées dans les processus d'alimentation (Mondal *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2001), ainsi que dans l'aire périfornicale (peFxa), site de l'intégration neuronale des comportements émotionnels, tel que le stress (Bittencourt *et al.*, 1992; Pajot *et al.*, 1995; Skofitsch *et al.*, 1985; Smith & De Vito, 1984; Zamir *et al.*, 1986).

Toutefois, les projections de ces neurones atteignent la majorité des aires cérébrales, comme par exemple, les aires néocorticales et striatales, l'amygdale, le cervelet, l'hippocampe, le thalamus, mais également d'autres structures du diencephale et du mésencéphale (Bittencourt *et al.*, 1992; Skofitsch *et al.*, 1985; Sone *et al.*, 2000) (Figure 2).

Une telle localisation suggère que la MCH pourrait avoir un rôle modulateur dans plusieurs processus neuronaux sous-tendus par ces structures (Hökfelt, 1991; Krieger, 1983; Saito *et al.*, 2000; Sekiya *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1995).

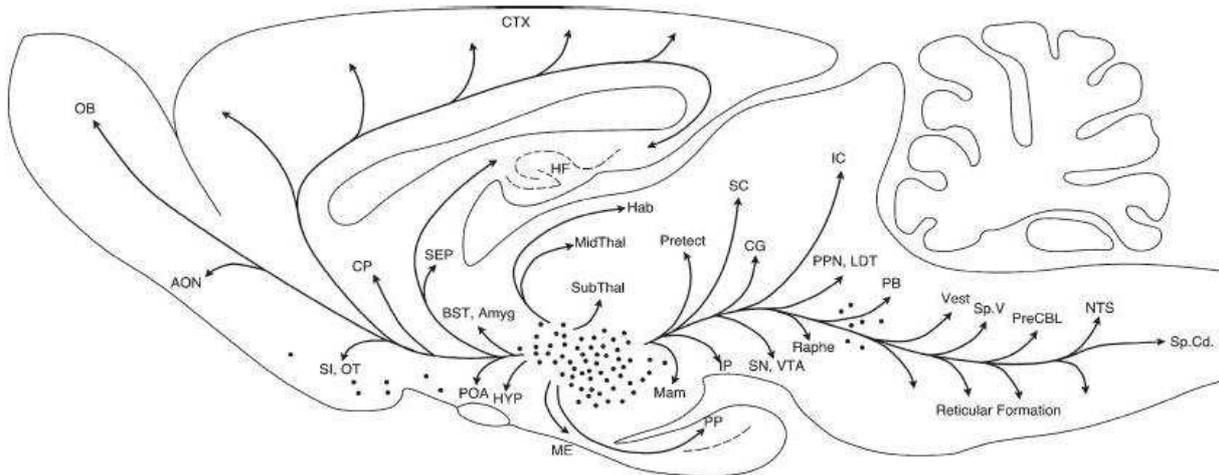


Figure 2. Coupe sagittale d'un cerveau de rat résumant la distribution des neurones à MCH. Les points noirs représentent la localisation ainsi que la densité des noyaux des neurones et les flèches indiquent les structures vers lesquelles ces neurones projettent (Bittencourt *et al.*, 1992, fig. 14, p. 240).

Au sein de l'hypothalamus, qui est reconnu comme étant la principale structure cérébrale impliquée dans la régulation des comportements alimentaires ainsi que dans le métabolisme énergétique (Bernardis & Bellinger, 1996; Brobergert & Hökfelt, 2001; Elmquist *et al.*, 1999; Hillebrand *et al.*, 2002; Luiten *et al.*, 1986; Mercer & Speakman, 2001; Oomura, 1980; Williams *et al.*, 2001), les neurones à MCH projettent dans le noyau hypothalamique ventromédial (VMN) considéré comme le « centre de la satiété » (Chambers *et al.*, 1999; Lembo *et al.*, 1999; Mondal *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 1999), ainsi que dans le noyau arqué, responsable des réponses adaptatives nécessaires à l'homéostasie énergétique (Elmquist *et al.*, 1999; Schwartz & Morton, 2002).

1.3. Les récepteurs à la MCH

Il a été démontré que la MCH agit comme un ligand endogène sur deux récepteurs couplés aux protéines G, appelés MCHR1 et MCHR2. Ces deux récepteurs ont été identifiés comme fonctionnels chez plusieurs espèces, incluant l'humain, le singe rhésus, le furet et le chien (An *et al.*, 2001; Bächner *et al.*, 1999; Breton *et al.*, 1993; Chambers *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2001; Lembo *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001; Sailer *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 1999; Shimomura *et al.*, 1999; Skofitsch *et al.*, 1985; Tan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001).

Nonobstant, chez d'autres espèces de mammifères, comme le rat, la souris, le hamster, le cochon d'Inde et le lapin, seul le récepteur MCHR1 est actif, tandis que le second est soit absent soit non fonctionnel (Forray, 2003 ; Tan *et al.*, 2002).

Dans le cerveau du rat, le récepteur MCHR1, qui présente 96% d'identité avec son homologue humain (Saito *et al.*, 2000), a initialement été nommé SLC-1 (Kolakowski *et al.*, 1996; Lakaye *et al.*, 1998, 2004). Il est exprimé dans plusieurs régions cérébrales, tels que le cortex cérébral, le cortex préfrontal, la formation hippocampique, l'amygdale, l'aire tegmentale ventrale, le noyau accumbens, le locus coeruleus, le thalamus, et divers noyaux de l'hypothalamus (Bittencourt *et al.*, 1992 ; Hervieu *et al.*, 2000 ; Lembo *et al.*, 1999 ; Saito *et al.*, 2001) (Figure 3).

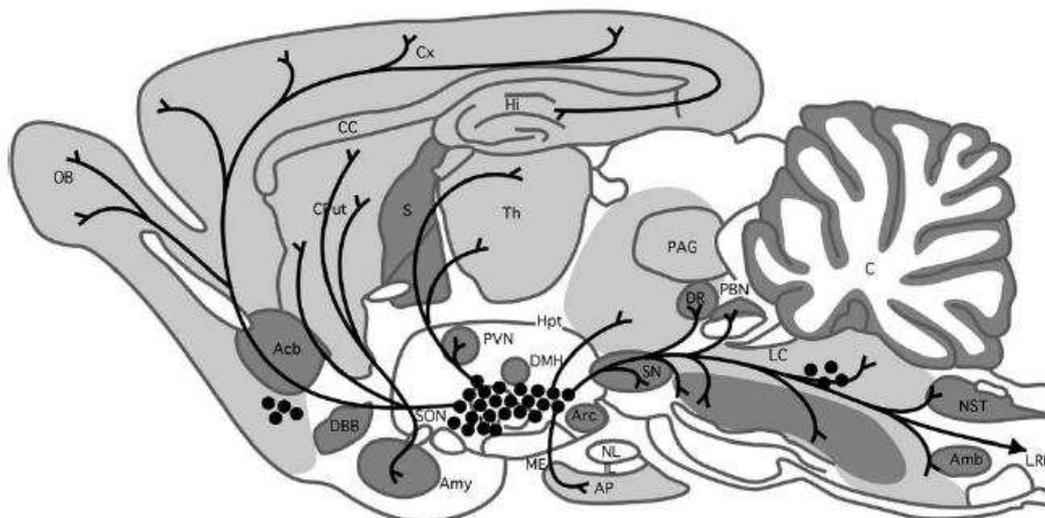


Figure 3. Coupe sagittale d'un cerveau de rat représentant la localisation et la distribution des neurones à MCH (points et lignes noirs), ainsi que le taux d'expression d'ARN messager des MCHR1. Les tons gris foncé, gris clair et blanc correspondent à un taux d'expression élevé, moyen ou faible, respectivement (Nahon, 2006, fig. 3, p. 632).

Le MCHR1, couplé à différentes protéines G, se lie à la MCH avec une affinité nanomolaire et son activation entraîne diverses réponses intracellulaires (Figure 4). Il provoque l'activation des protéines ERK1/2 et des enzymes phospholipases C (PLC), ce qui entraîne la libération des seconds messagers inositol triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG). A leur tour, l'IP3 et le DAG vont induire la libération de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire ainsi que l'activation des protéines kinase C (PKC), respectivement. Le récepteur interagit également avec des protéines intracellulaires (*periplakin* et MIZIP) et inhibe l'activité de l'adénylate cyclase (AC) et indirectement, celle de l'AMP cyclique induite par la forskoline (Bächner *et al.*, 1999; Chambers *et al.*, 1999; Gao & van den Pol, 2001, 2002; Hawes *et al.*, 2000; Lembo *et al.*, 1999; Pissios *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 1999, 2000; Shimomura *et al.*, 1999).

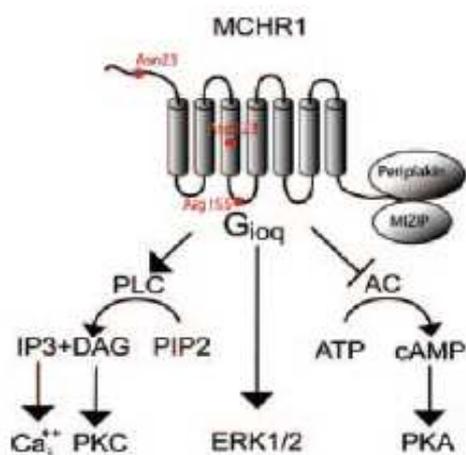


Figure 4. Représentation du récepteur à la MCH de type 1 et des différentes réponses intracellulaires provoquées par son activation (Pissios *et al.*, 2006, fig. 6, p. 611).

1.4. Implications fonctionnelles

Chez les rongeurs, la vaste distribution du MCHR1, ainsi que des projections axonales des neurones produisant la MCH, suggère fortement l'implication de ce système peptidergique dans une variété importante de fonctions physiologiques, qui sont décrites ci-dessous (Figure 5).

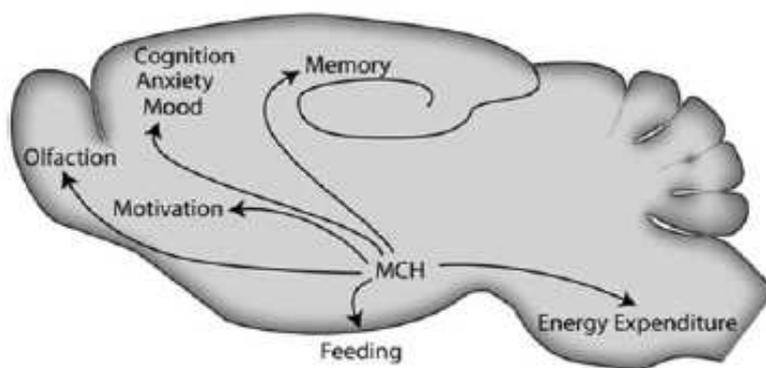


Figure 5. Illustration schématique des effets de la MCH sur la cognition, les processus sensoriels et l'homéostasie énergétique (Pissios *et al.*, 2006, fig. 8, p. 616).

1.4.1. Les fonctions autonomes

Plusieurs études ont montré que les KO MCHR1 présentait plusieurs altérations de l'activité autonome, telles qu'une température corporelle plus élevée ou l'augmentation moyenne du rythme cardiaque (Astrand *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 2002). La tachycardie relevée chez les KO MCHR1 peut être complètement abolie par l'administration d'un antagoniste adrénergique, suggérant une activité plus importante du système sympathique chez ces animaux (Astrand *et al.*, 2004). De manière similaire, l'administration de MCH (i.c.v. ou dans le tractus solitaire) provoque une bradycardie et une diminution de la pression artérielle chez les rats, via une activation du nerf vague (Brown *et al.*, 2007; Messina & Overton, 2007).

L'axe MCH/MCHR1 semble également être impliqué dans le contrôle de la miction. En effet, le contrôle de la miction est sous-tendu par des aires cérébrales dans lesquelles les MCHR1 sont exprimés et où les neurones à MCH projettent à partir de l'hypothalamus, tels que le locus coeruleus ou le noyau paraventriculaire (Hervieu *et al.*, 2000; Valentino *et al.*, 1994; Taniguchi *et al.*, 2002).

Une étude a montré que l'administration intraveineuse et intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'un antagoniste MCHR1 (SNAP 7941) produit une inhibition dose-dépendante des contractions de la vessie entraînant la miction et inversement, l'injection de MCH (i.c.v.) induit l'effet opposé, augmentant ainsi la fréquence urinaire chez des rats anesthésiés (Hegde *et al.*, 2009). Chez des rats conscients, l'injection du même antagoniste engendre une réduction de la fréquence urinaire, accompagnée d'une élévation de la capacité de la vessie. Ces données indiquent donc que la MCH agit au sein du système nerveux central via les MCHR1 pour moduler le réflexe de miction chez le rat. De plus, les effets des antagonistes MCHR1 offrent la possibilité d'un traitement alternatif pour soigner le syndrome de vessie hyperactive (*overactive bladder syndrome*, OAB), le traitement actuel via des antagonistes muscariniques engendrant de nombreux effets indésirables (Burgard *et al.*, 2005).

1.4.2. Les maladies

L'ostéoporose résulte d'une diminution de la masse osseuse. L'étude de Bohlooly-Y (2004) a montré que les taux de c-telopeptide, un marqueur de la résorption osseuse, est plus élevée chez des KO MCHR1. Ainsi, cette maladie dégénérative pourrait être traitée par des agonistes MCH/MCHR1. Nonobstant, ces résultats impliquent également que des patients traités chroniquement avec ce type d'antagoniste devront être suivis régulièrement pour contrôler leur densité osseuse et/ou l'expression de bio-marqueurs spécifiques (Luthin, 2007).

Cependant, un rapport d'une firme pharmaceutique, la German Mouse Clinic (GMC), a effectué une batterie de test sur des WT et KO MCHR1 (fond génétique C57/BL6x129/Sv) et n'a pas pu mettre en évidence une ostéoporose plus marquée chez les mutants à l'aide de rayons X.



Figure 6. Radiographies de la partie inférieure de corps de souris WT et KO MCHR1 (tiré d'un rapport non publié de la GMC (*German Mouse Clinic*)).

La MCH et son récepteur sont également exprimés dans des cellules du système immunitaire et il est postulé qu'ils interviendraient dans la régulation de celui-ci (Lakaye *et al.*, 2009).

1.4.3. Le sommeil

L'hypothalamus, et plus particulièrement le noyau suprachiasmatique, gère les rythmes circadiens de la température corporelle ainsi que les états de vigilance veille/sommeil (Saper, Scammell & Lu, 2005). Les recherches effectuées sur la MCH indiquent que, chez le rat, l'activité des neurones MCH est plus importante durant la phase de sommeil en comparaison à la phase de veille (Verret *et al.*, 2003). Ainsi, l'activité des neurones MCH augmente lors de l'entrée en sommeil profond, atteignant le maximum durant le sommeil paradoxal (*rapid-eye-movement sleep*, REM) (Hassani, Lee & Jones, 2009). Lorsqu'elle est injectée en i.c.v., la MCH provoque une augmentation des épisodes de sommeil profond et paradoxal (Verret *et al.*, 2003). D'autres études ont montré une augmentation des taux de *c-Fos* au sein des neurones MCH après une privation de sommeil totale ou d'épisodes REM uniquement (Modirrousta, Mainville & Jones, 2005; Verret *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent donc que la MCH jouerait un rôle atténuateur de l'excitation afin de promouvoir le sommeil (Bayer *et al.*, 2005).

L'injection d'antagonistes MCHR1 (Compounds A et B) diminue de manière dose-dépendante le sommeil profond, notamment en réduisant la durée moyenne des épisodes durant les quatre premières heures post-administration. En parallèle, les autres stades de sommeil, dont le REM, sont également diminués (Ahnaou *et al.*, 2008). De plus, les souris déficientes en MCH dorment significativement moins que les WT (Willie *et al.*, 2008).

De plus, les KO MCH démontrent une réduction plus importante du sommeil, incluant les stades de sommeil profond et REM, durant une phase de jeûne, suggérant un rôle particulier de la MCH dans la régulation du sommeil en fonction du statut métabolique (Willie *et al.*, 2008).

Ces études sont néanmoins en contradiction avec l'observation que les KO MCHR1 présentent un phénotype légèrement hypersomniaque, associée avec des épisodes de sommeil REM plus longs (Adamantidis *et al.*, 2008). De plus, une autre étude n'a pas pu reproduire l'impact de l'antagoniste MCHR1 Compound A sur l'architecture des différentes phases de sommeil, malgré un taux d'occupation des récepteurs élevé (Able *et al.*, 2009).

1.4.4. Les comportements sexuels

Des fibres contenant de la MCH ainsi que des MCHR1 ont été localisés dans des aires cérébrales qui contiennent des neurones à gonadolibérine (*gonadotropin releasing hormone*, GnRH). De plus, l'expression de MCHR1 sur les organes reproducteurs suggèrent une implication de l'axe MCH/MCHR1 dans la régulation des comportements sexuels (Bittencourt & Elias, 1998; Hervieu & Nahon, 1995; Saito *et al.*, 2001).

La MCH a la capacité d'augmenter la sécrétion d'hormone lutéinisante (LH) et celle de la GnRH sécrétées à partir de l'hypothalamus et de l'anté-hypophyse (voir Williamson, Grove & Smith (2005) pour une synthèse de la littérature). Néanmoins, cet effet s'avère être biphasique, dans la mesure où il dépend du taux d'estrogènes. En effet, si le taux d'estrogènes est normal, la MCH stimule la libération des hormones (Chiocchio *et al.*, 2001; Gonzales, Baker & Wilson, 1997; Murray *et al.*, 2000a, 2000b). A contrario, si le taux est trop bas, la MCH aura un effet inhibiteur, illustrant un état de balance énergétique négatif qui peut entraîner la suppression du cycle de reproduction (aménorrhée) (Tsukamura *et al.*, 2000).

Cet effet modulateur de la MCH semble être sous-tendu par une autre hormone, la leptine, qui active également l'axe hypothalamo-hypophysaire dans le but d'activer les neurones GnRH (Yu *et al.*, 1997). Cette hormone sert également de médiateur entre la balance énergétique et la capacité reproductive d'un organisme. En effet, la leptine est produite par les tissus adipeux, qui reflètent les réserves énergétiques corporelles et son rôle dans la fonction reproductive a été découvert par la création de rongeurs obèses qui s'avèrent être stériles (Barash *et al.*, 1996 ; Friedman & Halaas, 1998).

Des interactions entre l'expression de MCH et la leptine au sein de l'hypothalamus ont été démontrées chez les rongeurs ainsi que l'expression de neurones à la leptine dans la zona incerta (Huang *et al.*, 1999; Sahu, 1998). Une étude a ainsi montré que le pré-traitement avec la MCH dans l'aire pré-optique prévenait le pic de LH provoqué par l'injection ultérieure de leptine dans la zona incerta.

De plus, lorsque la MCH est injectée dans l'aire pré-optique ou le noyau ventromédian, elle augmente l'occurrence du comportement de lordose chez des rattes ovariectomisées (Gonzalez *et al.*, 1996).

1.4.5. Le comportement alimentaire

Un rôle critique de la MCH dans l'homéostasie énergétique est suggéré par l'hypophagie et la maigreur inhérentes à la suppression du gène cible codant ce neuropeptide (Segal-Lieberman *et al.*, 2003; Shimada *et al.*, 1998; Pissios *et al.*, 2008). A l'inverse, la surexpression de ce même gène entraîne une légère obésité et une résistance à l'insuline (Ludwig *et al.*, 2001). De nombreuses études ont donc mis en lumière le fait que la MCH constitue un important régulateur des comportements alimentaires et du poids corporel (Chen *et al.*, 2002; Kokkotou *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 2001; Mountjoy & Wong, 1997; Presse *et al.*, 1996; Qu *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 1997; Tritos & Maratos-Flier, 1999).

De fait, diverses recherches ont mis en évidence que l'injection i.c.v., intra-amygdale ou intra-accumbens de MCH ou d'agonistes MCHR1 stimule la prise alimentaire de manière dose-dépendante chez le rat et la souris (Carlini, Schiöth & de Barioglio, 2006; Della-Zuana *et al.*, 2002; Duncan, Proulx & Woods, 2005; Georgescu *et al.*, 2005; Gomori *et al.*, 2003; Guesdon *et al.*, 2009; Kela *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 2003). Une série d'injections de MCH dans des régions plus ciblées a permis de mettre en évidence que cet effet n'était pas ubiquitaire au sein des différents noyaux de l'hypothalamus (Figure 7) (Abbott *et al.*, 2003) et n'était pas sous-tendu par le système opioïde, contrairement à d'autres neuropeptide (Clegg *et al.*, 2002). Ainsi, l'activité des neurones MCH du LH sur le NAc pourrait moduler la composante motivationnelle qui sous-tend l'aspect hédonique du comportement alimentaire (Saper *et al.*, 2002).

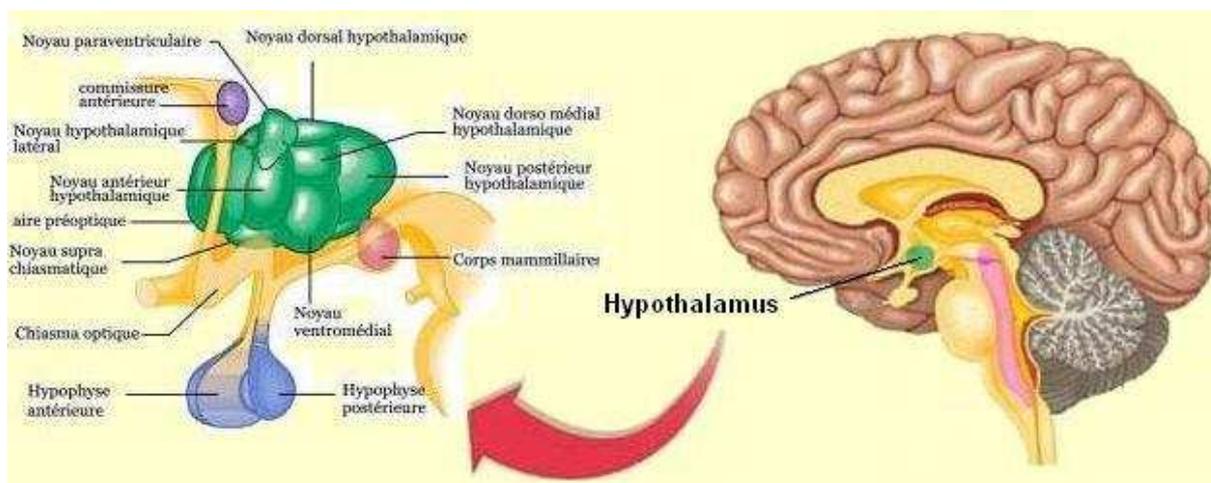


Figure 7. Localisation de l'hypothalamus dans le cerveau (à droite) et représentation des différents noyaux qui le composent (à gauche) (adapté de Bear, Connors & Paradiso, 2002, fig. 16.6, p. 549).

Récemment, il a été montré que ces neurones MCH du LH participaient à une boucle de feedback auto-renforçante de la prise alimentaire en recevant indirectement des inputs inhibiteurs du NAc (Sano & Yokoi, 2007). En effet, le NAc serait connecté via des neurones GABAergique inhibiteurs à la partie antérieure du LH contenant des neurones glutamatergiques (Glu). Ces derniers activeraient ensuite les neurones MCH qui, à leur tour, enverraient des inputs inhibiteurs aux neurones épineux du NAc pour compléter la boucle, résultant en une activation constante des neurones MCH qui sous-tendrait l'aspect renforçant de la nourriture (Figure 8). Cette hypothèse est appuyée par l'observation que l'injection d'agoniste GABA_A dans la partie antérieure du LH supprimait la prise alimentaire provoquée par l'inhibition des neurones dans le NAc (Maldonado-Irizarry, 1995). De plus, l'injection d'un antagoniste Glu dans le LH bloque complètement l'hyperphagie engendrée par la stimulation GABAergique des neurones du NAc (Stratford & Kelley, 1999).

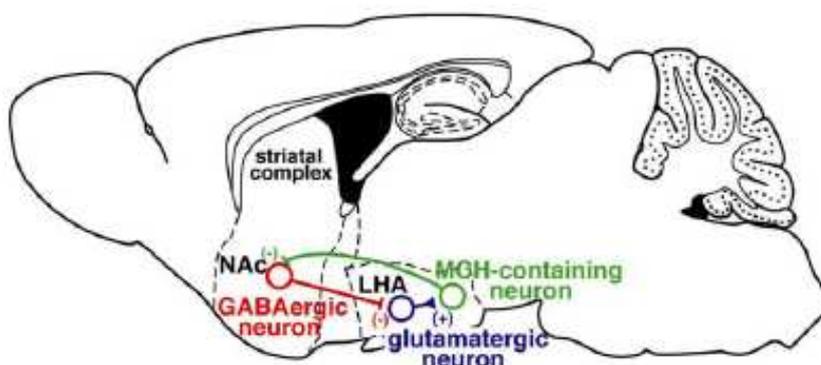


Figure 8. Modèle du circuit neuronal composé du NAc, de la partie antérieure du LH (LHA) et des neurones MCH. Les neurones MCH envoient des projections inhibitrices (-) aux neurones du NAc. Les neurones GABAergiques du NAc envoient des projections (-) aux neurones glutamatergiques du LH antérieur qui, à leur tour, envoient des projections excitatrices aux neurones MCH situés dans la partie postérieure (Sano & Yokoi, 2007, fig. 6, p. 6954).

L'effet de l'injection de la MCH sur la nourriture prévaut également pour les liquides, comme l'eau (Clegg *et al.*, 2003; Morens *et al.*, 2005) ou l'alcool (Duncan *et al.*, 2005, 2006, 2007). En effet, l'équipe de Woods a mis en évidence que l'injection i.c.v. de MCH augmente la consommation d'éthanol de façon plus marquée chez des souris KO MCHR1 (par rapport aux WT) et s'avère s'opérer de manière dose-dépendante chez le rat. Néanmoins, l'injection i.c.v. d'un antagoniste MCHR1 (Compound B) ne produit aucun effet sur la consommation d'éthanol, suggérant que la MCH endogène n'est pas impliquée.

Cet effet de la MCH sur la prise alimentaire serait dû à la libération d'autres peptides anorexigènes et orexigéniques au sein de l'hypothalamus (Abbott *et al.*, 2003). De fait, l'administration *in vitro* de MCH augmente la libération des neuropeptides orexigéniques NPY (*neuropeptide Y*) et AgRP (*agouti-related peptide*) et diminue celle des neurotransmetteurs anorexigènes, tels que α -MSH et CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*)¹. Pour conforter cette hypothèse, une autre étude a montré qu'un antagoniste NPY (Y1) était capable de bloquer partiellement l'effet de la MCH sur la nourriture (Chaffer & Morris, 2002).

En accord avec les résultats précédents, l'injection d'antagonistes MCHR1 bloque complètement l'augmentation de la prise de nourriture induite par l'injection i.c.v. de MCH (Borowsky *et al.*, 2002; Handlon & Zhou, 2006 ; Morens *et al.*, 2005; Nagasaki *et al.*, 2009; Takekawa *et al.*, 2002). Cet effet serait dû à une réduction de la quantité de nourriture ingérée à chaque repas (Kowalski *et al.*, 2004), ainsi qu'à la capacité des antagonistes à passer la barrière hémato-encéphalique (Hu *et al.*, 2008). Les souris déficientes en MCHR1 sont, quant à elles, hyperphagiques et résistantes à l'obésité, mais possèdent également un métabolisme élevé (Chen *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 2002).

Enfin, l'expression d'ARNm de la MCH et des MCHR1 est augmentée lors d'une période de jeûne² chez des souris normales et obèses, ainsi que dans l'hypothalamus de souris *ob/ob*, génétiquement obèses (Kokkotou *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 1996).

1.4.6. L'activité locomotrice

L'axe MCH/MCHR1 pourrait moduler la locomotion, étant donné que les récepteurs à la MCH sont densément exprimés dans la région du système extrapyramidal, qui est responsable des mouvements en général (Hervieu *et al.*, 2000).

Monzon & de Barioglio (1999a) montrent que l'injection i.c.v. de MCH augmente l'activité locomotrice chez les rats. Néanmoins, d'autres études indiquent que la même injection de MCH n'a pas d'impact sur l'activité locomotrice, mais qu'elle antagonise les comportements d'hyperlocomotion induits par l'injection de α -MSH et de NEI chez le rat (Gonzalez *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 1998; Kela *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 1997).

¹ L'impact de ces différents peptides sur la prise alimentaire est détaillé dans le chapitre 3.

² La thématique de la privation de nourriture sera abordée plus en profondeur dans le chapitre n° 3.

Une autre étude, impliquant des souris mutantes, indique que les KO MCH sont plus actives que les WT et ce, qu'elles soient issues d'un fond C57BL/6J ou 129/SvJ (Kokkotou *et al.*, 2005, mais voir Shimada *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les souris déficientes en MCHR1, les différentes études réalisées n'obtiennent pas systématiquement des résultats similaires. En effet, une différence entre les génotypes apparaît lors de l'exposition à un nouveau contexte (Lalonde & Qian, 2007 ; Smith *et al.*, 2005; Tyhon *et al.*, 2006, 2008b).

Nonobstant, plusieurs études ne mettent pas en évidence cette différence entre génotypes (Adamantadis *et al.*, 2005; Astrand *et al.*, 2004; Marsh *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2008; Tyhon *et al.*, 2008a, 2008b; Zhou *et al.*, 2005). Il apparaît donc que cet effet n'est pas stable et plutôt difficile à révéler, dans la mesure où il semble dépendre fortement du moment où le test est effectué. En effet, dans certaines de ces études, un dispositif permettant de mesurer l'activité locomotrice durant le cycle veille/sommeil a permis de montrer que l'hyperactivité observée chez les KO MCHR1 se manifestait essentiellement durant la phase sombre et lorsqu'une roue était placée dans la cage (Astrand *et al.*, 2004; Marsh *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2005). L'équipe de Smith (2005) a d'ailleurs montré que le phénotype hyperactif observé chez les KO MCHR1 était sous-tendu par un dérèglement du système dopaminergique mésolimbique.

1.4.7. L'anxiété

L'implication de la MCH dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA) a également été étudiée. L'axe HPA trouve son origine au sein des neurones contenant la corticolibérine (*corticotropin-releasing hormone*, CHR) situés dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et est activé par le stress (Tsigos & Chrousos, 2002). Plusieurs études ont démontré l'expression d'ARN messager de MCHR1 ainsi que l'existence de projection de fibres contenant de la MCH dans des régions associées à l'anxiété, tels que le locus coeruleus, la raphé dorsal, l'hippocampe, le cortex préfrontal et l'amygdale (Chambers *et al.*, 1999; Foote, Bloom, & Aston-Jones, 1983; Hamon, 1994; Hervieu *et al.*, 2000; Lembo *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2001).

L'effet anxiogénique de la MCH a été démontré chez le poisson (Baker, 1994; Nahon, 1994). Néanmoins, chez les mammifères, les premières études ont provoqué la controverse. En effet, l'effet inhibiteur de la MCH sur la libération d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) provenant de cellules hypophysaires chez le rat n'a pas pu être répliqué (Baker, Bird & Buckingham, 1985; Navarra *et al.*, 1990).

Les recherches ultérieures sur la MCH ne sont malheureusement pas plus homogènes dans leurs résultats. Il a été démontré que l'injection de MCH en i.c.v. ou effectuée dans les noyaux paraventriculaires augmentait les taux d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et ceux de corticostérone chez le rat (Jezova *et al.*, 1992; Kennedy *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006, 2009).

Par contre, d'autres études ont montré que l'injection centrale de MCH diminuait les taux de corticostérone (Bluet-Pajot *et al.*, 1995; Ludwig *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2006). Néanmoins, l'administration centrale de MCH augmente l'activité de décharge des neurones à norépinéphrine (NE) au sein du locus coeruleus, qui constitue le point d'origine des projections NE, et le blocage des MCHR1 atténue cet effet (Hegde *et al.*, 2004).

En complément de l'implication contradictoire dans les réponses endocriniennes au stress, le rôle de la MCH dans les réponses comportementales mesurées à l'aide de tests incluant l'exposition à des stimuli stressants est également incohérent. Dans le *Vogel's punished drinking test*, les rats ayant reçu une injection i.c.v. de MCH continuent à boire malgré l'administration de chocs électriques (Kela *et al.*, 2003). Dans l'*elevated plus maze* (EPM)¹, l'équipe de Monzon a montré que le nombre d'entrées dans les bras ouverts ainsi que le temps passé dans ceux-ci sont augmentés par l'injection i.c.v., intra-amygdale et intra-hippocampique de MCH (Monzon & de Barioglio, 1999a; Monzon *et al.*, 2001). De même, chez le rat, l'augmentation de la prise de nourriture suite à un stress important (plusieurs chocs électriques) ainsi que la réponse de *freezing*² sont inhibées par l'injection intra-amygdale de MCH (Carlini *et al.*, 2006).

¹ Ce test consiste à mesurer le taux d'anxiété des rongeurs face à un espace ouvert. L'appareil est composé de deux bras en Plexiglas opaque placés en croix (29x5x0.25 cm). L'un des bras possède des parois de ±15 cm (bras fermé) et l'autre, pas (bras ouvert). Les rongeurs ont naturellement tendance à explorer les bras ouverts moins longtemps (Crawley, 2000).

² Le pourcentage de *freezing* est habituellement utilisé comme mesure comportementale d'anxiété dans le paradigme de *fear conditioning* et renvoie à l'absence de mouvement autre que celui de respiration (Blanchard & Blanchard, 1969). Ce paradigme consiste à apprendre aux animaux à associer la présentation d'un stimulus neutre (un son) à l'administration d'un stimulus aversif (un choc électrique). Lorsque l'association est apprise, l'animal présentera une réponse comportementale défensive (le *freezing*) suite à la présentation du son ou du contexte dans lequel le choc a été administré (Crawley, 2000).

Malgré ces résultats probants, l'effet anxiolytique de la MCH est complètement inversé dans d'autres études employant également des tests d'anxiété (Duncan *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2006).

Les résultats des recherches ayant étudié l'impact d'antagoniste MCHR1 ne sont pas plus harmonieux. Le premier d'entre eux, le SNAP 7941 qui est hautement sélectif, produit un effet anxiolytique chez le rat dans le test d'interaction sociale¹ ainsi que chez le cochon d'Inde, dans le test de vocalisation suite à la séparation maternelle (Borowsky *et al.*, 2002 ; Millan *et al.*, 2008). En effet, après l'injection de l'antagoniste, la durée des interactions sociales entre rats non familiers augmente et les vocalisations émises par les animaux suite à la séparation maternelle diminuent de manière aussi robuste qu'après une injection de chlordiazepoxide ou de buspirone, deux anxiolytiques.

Quelques années plus tard, l'équipe de Chaki a répliqué les résultats de Borowsky avec deux autres antagonistes MCHR1, ATC0065 et ATC0175 (Chaki *et al.*, 2005a, 2005b). D'autres antagonistes ont vu le jour les années suivantes, tels que le GW3430, dont le prétraitement renverse l'effet anxiogénique provoqué par l'injection i.c.v. de MCH dans l'EPM et le test d'hyperthermie induite par le stress (*stress-induced hyperthermia*, SIH) (Smith *et al.*, 2006). Cet antagoniste présente également un effet anxiolytique dans d'autres tests d'anxiété (Millan *et al.*, 2008). Dernièrement, la même équipe a testé les propriétés présumées anxiolytiques du SNAP 94847 et a mis en évidence qu'un prétraitement avec cet antagoniste MCHR1 bloquait la libération d'ACTH induite par l'injection i.c.v. de MCH chez le rat, ainsi qu'une diminution du stress dans différents tests lorsqu'il est injecté seul (Smith *et al.*, 2009). Nonobstant, ces effets ne sont pas observés de manière systématique (Basso *et al.*, 2006) et nécessitent des recherches supplémentaires.

Enfin, l'impact des MCHR1 dans la régulation de l'anxiété a également été évalué à l'aide de souris mutantes (Roy *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). Il apparaît que les knock-out (KO) MCHR1 sont moins anxieuses que leurs congénères wild-type (WT) et ce, dans plusieurs tests d'anxiété (EMP, test d'interaction social, SIH, *open-field*). Cependant, une expérience d'EPM dans nos laboratoires n'a pas réussi à reproduire l'effet anxiolytique chez les KO MCHR1 (Adamantidis *et al.*, 2005).

¹ Ce test est utilisé pour mesurer l'anxiété. Le principe consiste à placer, dans un territoire neutre, des rats non-familiers et ensuite, de mesurer le nombre et l'intensité des interactions, qui sont augmentées par un prétraitement avec des anxiolytiques (File & Hyde, 1987; Rodgers *et al.*, 1977).

Une mesure de la neurotransmission sérotoninergique (5-HT), qui sous-tend la régulation de l'humeur, du stress et de l'anxiété, a mis en évidence une diminution des taux 5-HT de base chez les KO dans le cortex préfrontal ainsi qu'à la suite de l'exposition à un test de nage forcée (Gordon & Hen, 2004; Roy *et al.*, 2006).

De plus, une libération plus marquée d'acétylcholine due à l'exposition à une odeur de prédateur (urine de rat) est observée dans le cortex préfrontal des WT et pas chez les KO MCHR1 et, elle peut être supprimée par l'administration d'un antagoniste MCHR1 (Smith *et al.*, 2006). Ces résultats indiquent donc que la modulation des comportements liés à l'anxiété par les MCHR1 pourrait être sous-tendue par des changements dans la neurotransmission 5-HT dans certaines régions, à savoir une sensibilité plus élevée dans le cortex préfrontal qui est clairement associé avec le contrôle des émotions et de la cognition (Miller, 1999; Stockmeier, 1997).

1.4.8. La dépression

L'implication de l'axe MCH/MCHR1 dans la dépression émane des nombreuses recherches qui ont mis en évidence une diminution des réponses comportementales reliées à la dépression chez les rongeurs, comme par exemple le temps de flottaison dans le *forced swim test* (FST)¹, à la suite de l'administration d'antagonistes MCHR1 (Borowsky *et al.*, 2002; Chaki *et al.*, 2005; Georgescu *et al.*, 2005).

Roy et collègues (2006) ont montré que les KO MCHR1 présentaient un taux 5-HT de base moins élevé que les WT dans le cortex préfrontal, reflétant le mécanisme d'action des antidépresseurs de type SSRI² sur la sérotonine (Kugaya *et al.*, 2003). Néanmoins, ces résultats n'ont pas été répliqués, mais une diminution du taux de liaison au transporteur à la sérotonine dans le NAc a été rapportée (Marsteller *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2005).

¹ Ce test consiste à placer l'animal pendant 15 minutes dans un cylindre en Plexiglas transparent rempli à moitié d'eau tiède. Le lendemain, un test de 5 minutes est effectué afin de mesurer le temps passé par l'animal sans bouger. Ce temps d'immobilité est diminué par des antidépresseurs (review Petit-Demouliere *et al.*, 2005).

² Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (*selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI)

Quant à elle, l'injection de MCH directement au sein de la partie ventrale du NAc produit une augmentation des réponses dépressives comportementales (Georgescu *et al.*, 2005). Issus de la même étude, les résultats montrent aussi que l'application de MCH dans des coupes de NAc inhibait la phosphorylation des récepteurs AMPA (de type GluR1) induite par un agoniste D₁ (SKF 81297). Cette phosphorylation a comme conséquence d'augmenter l'activité des récepteurs AMPA qui produisent des effets antidépressifs dans plusieurs tests, comme le FST ou le test de suspension¹ (Li *et al.*, 2001).

Dans le cadre d'épisodes dépressifs, la transmission dopaminergique mésolimbique est altérée. En effet, une des caractéristiques majeures des antidépresseurs pris chroniquement est qu'ils augmentent les effets stimulants moteurs induits par l'administration d'agonistes D₂/D₃ chez le rat (D'Aquila *et al.*, 2000). L'hypothèse d'une régulation de la dopamine par la MCH est soutenue par le fait que le traitement chronique à un antagoniste MCHR1 (ainsi que celui à la fluoxétine, un SSRI) produit une réponse locomotrice marquée suite à l'injection de quinpirole, un agoniste D₂/D₃, chez le rat et la souris (Marsteller *et al.*, 2009). Smith et collègues (2005) corroborent ces résultats en montrant que des KO MCHR1 présentent une sensibilité élevée, tant comportementale que neurochimique, à des agonistes DA direct et indirects. De plus, l'antagoniste SNAP 7941 produit un marquage intense dans des régions riches en innervations dopaminergiques, telle que la partie ventrale du NAc (Borowski *et al.*, 2002).

Georgescu et collègues (2005) ont montré que les récepteurs à la MCH étaient co-localisés avec les neurones épineux du NAc positifs à la dynorphine et l'enképhaline. La dynorphine agit au niveau pré-synaptique des récepteurs opioïdes κ pour inhiber la libération de dopamine dans le NAc. Le blocage de ces récepteurs par un antagoniste lève donc l'inhibition de la dopamine et produit également un effet antidépressif chez le rat (Spanagel, Herz & Shippenberg, 1992). De plus, l'immuno-réactivité de la dynorphine est augmentée dans le NAc dans plusieurs tests de dépression (Shirayama *et al.*, 2004). Il apparaît également que le traitement chronique sous antidépresseurs induit une élévation de l'ARNm des récepteurs D1 dans le système limbique (Huzarska, Zielinski & Herman, 2006).

En résumé, la régulation de l'activité dopaminergique mésolimbique par le système MCH semble sous-tendre le développement de la dépression et plus précisément, il est postulé que la MCH contrôlerait les états émotionnels via une modulation des transmissions glutamatergique et sérotoninergique (Nestler & Carlezon, 2006; Shimazaki, Yoshimizu & Chaki, 2006).

¹ Ce test consiste à attacher la souris par la queue le long d'une barre de fil de fer et de mesurer le temps passé à rester immobile. L'administration d'antidépresseurs diminue le temps d'immobilisation (Crawley, 2000).

1.4.9. La mémoire

Etant donné que des taux élevés d'expression d'ARN messager codant le MCHR1 ainsi que des projections de fibres contenant de la MCH ont été détectés dans la formation hippocampique et dans l'amygdale (Bittencourt *et al.*, 1992; Varas *et al.*, 2002a), deux régions jouant un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire (McGaugh, 2000), plusieurs recherches ont étudié le rôle éventuel du peptide dans la transmission synaptique dans ces régions (voir Adamantidis & de Lecea (2009) pour une revue de la littérature).

Il a été montré que des micro injections de MCH dans le champ CA1 hippocampique et dans l'amygdale directement après l'apprentissage, augmentaient les temps de latence des rats testés dans le paradigme d'évitement passif lors de la phase test, signe d'une facilitation de la formation et de la rétention mnésique. L'injection du peptide 4 heures après l'apprentissage produisait des effets similaires, mais uniquement si elle est réalisée dans l'hippocampe (Monzon *et al.*, 1999b; Varas *et al.*, 2002a).

Ces résultats indiquent que la MCH entrerait en jeu durant différentes étapes de la formation mnésique. Néanmoins, l'injection sous-cutanée de MCH chez le rat précipite l'extinction dans un retest effectué 48 et 72h après l'administration du choc électrique (McBride *et al.*, 1994).

D'autre part, l'équipe de Varas (2002b, 2003) a mis en évidence que l'injection de MCH dans le gyrus dentelé ou l'application exogène dans des coupes de la même structure produisait une augmentation durable de l'efficacité de la transmission synaptique hippocampique. Cette potentialisation apparaît après 30 minutes et perdure jusqu'à 120 minutes post injection. De plus, l'injection de MCH augmentait l'expression d'ARNm des sous unités NR1, NR2A et NR2B des récepteurs NMDA dans l'hippocampe. Ces résultats pourraient expliquer la facilitation de la capacité à générer une LTP ainsi que la facilitation mnésique observée après une injection hippocampique de MCH (Varas *et al.*, 2003).

En raison de la similitude entre la potentialisation à long terme observée après une injection de MCH et le phénomène de potentialisation à long terme (LTP), les auteurs ont investigué les effets de l'APV (20 μ M), un antagoniste des récepteurs glutamatergiques N – methyl – D – Aspartate (NMDA) qui bloque la génération de la LTP, et ceux de la dizocilpine (MK-801, 10 μ M), un antagoniste compétitif de ces mêmes récepteurs, sur la potentialisation engendrée par une dose de 4 μ M de MCH.

En effet, l'induction d'une LTP requiert, entre autre, l'activation des récepteurs NMDA (Bliss & Lomo, 1973; Collingridge, 1985; Kirkwood *et al.*, 1993). Il apparaît que la concentration d'APV n'empêche pas la potentialisation induite par la MCH. Cependant, si l'injection de MCH est précédée par l'administration de dizocilpine, la potentialisation n'apparaît plus. Les auteurs concluent que la MCH interagirait directement avec les récepteurs NMDA en augmentant les courants cationiques (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) à travers ceux-ci. Cette interprétation rejoint le fait que l'activation des récepteurs à la MCH provoque une augmentation des taux calciques intracellulaires (Chambers *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2000). Cette augmentation des concentrations calciques pourrait expliquer la durée de la potentialisation synaptique induite par la MCH, dans la mesure où différents mécanismes calciques dépendants seraient impliqués dans la génération et la maintenance de la LTP (Bliss & Collingridge, 1993).

Enfin, Varas *et al.* (2002a) montrent que la facilitation de la rétention mnésique produite par l'injection hippocampique de MCH corrèle avec une augmentation significative, au sein de l'hippocampe, des taux de GMPc et d'oxyde nitrique (NO), un neurotransmetteur gazeux impliqué dans la plasticité synaptique, qui constituerait une des bases de l'apprentissage et de la mémoire (Dawson & Snyder, 1994), ainsi que dans la cascade biochimique de la mémoire dans l'hippocampe.

Brièvement, le phénomène de mémorisation est sous-tendu par le mécanisme cellulaire de potentialisation à long terme (*long-term potentiation*, LTP) (Bliss & Lomo, 1973; Bliss & Collingridge, 1993; voir Bennett en 2000 pour une synthèse). La LTP est déclenchée par des récepteurs glutamatergiques. L'activation des récepteurs NMDA provoque la libération des influx de Ca^{2+} , l'activation de différentes protéines kinases, la phosphorylation des neurotransmetteurs ainsi que l'expression de messagers rétrogrades comme le NO et le GMPc (Izquierdo & Medina, 1997; voir Soderling & Derkach (2000) et Sweatt (2001) pour une revue de la littérature). Ainsi, l'accroissement des taux de NO et de GMPc après l'administration de MCH suggère que l'effet facilitateur du peptide sur la rétention mnésique pourrait être relié à l'augmentation de l'activation de stades particuliers au début de la cascade mnésique.

Sur base de cette littérature, nous avons testé les KO MCHR1 dans un test d'évitement passif, évaluant la mémoire (voir Myhrer en 2003 pour une synthèse de la littérature). Différentes mesures cellulaires et moléculaires ont également été réalisées, tels que l'enregistrement intracellulaire de l'activité des neurones CA1 de l'hippocampe ainsi que l'hybridation *in situ* des sous-unités des récepteurs NMDA (voir Adamantidis *et al.* (2005) dans la partie Annexes, p. 180).

Les résultats obtenus dans l'évitement passif démontrent que des KO MCHR1 présentent des capacités mnésiques et d'apprentissage réduites. En effet, la latence de ces derniers à pénétrer la chambre sombre dans laquelle ils ont reçu un choc électrique la veille est nettement plus courte que celle des WT. De plus, lors du second test de rétention effectué six jours après la phase d'acquisition, les KO MCHR1 ne montrent plus du tout de signe d'apprentissage, dans la mesure où le niveau de leur latence a rejoint celui des groupes non choqués. Par contre, les WT continuent à exprimer une rétention mnésique assez marquée, même après plusieurs jours.

En ce qui concerne les mesures cellulaires et moléculaires, une diminution de la réponse des récepteurs NMDA dans la région CA1 hippocampique, ainsi qu'une expression réduite des sous-unités NMDAR1 dans la région CA1 et, dans une moindre mesure, CA3 ont également été observées.

Ces résultats sont en concordance avec les autres études ayant montré l'effet bénéfique de la MCH sur l'expression des récepteurs NMDA situés dans l'hippocampe (Varas *et al.*, 2003), ainsi que sur la formation mnésique (Monzon *et al.*, 1999b ; Varas *et al.*, 2002a, 2002b, mais voir McBride *et al.*, 1994). Il apparaît donc que l'axe MCH/MCHR1 joue un rôle essentiel dans le phénomène d'apprentissage et de mémorisation, notamment via une interaction avec les récepteurs NMDA. Cet effet « promnésiant » de la MCH pourrait également être sous-tendu indirectement par la modulation du sommeil (Adamantidis *et al.*, 2008), vu l'implication du sommeil paradoxal dans la consolidation mnésique (Born *et al.*, 2006 ; Walker & Stickgold, 2004).

Une récente étude chez le rat a également mis en évidence que deux antagonistes MCHR1 déjà étudiés pour leurs actions anxiolytiques (SNAP 7941 et GW3430) contrecarraient le déficit observé dans le test de reconnaissance sociale après un délai de retest très important ou à la suite d'injection de scopolamine, un antagoniste muscarinique aux effets amnésiants (Green *et al.*, 2005; Hasselmo, 2006; Millan *et al.*, 2008).

1.4.10. L'addiction

Des études lésionnelles et d'auto-stimulation intracrânienne suggèrent que l'hypothalamus latéral (LH) sous-tendrait l'aspect hédonique, à la fois de la nourriture et des drogues d'abus (Bozarth, Gerber & Wise, 1980; Gallistel, Shizgal & Yeomans, 1981; Olds & Milner, 1954). En effet, la nourriture et les drogues d'abus agissent sur le cerveau à travers des substrats moléculaires communs, tel que le système dopaminergique (Carr, 2002). De plus, les connections entre le LH et le noyau accumbens (NAc) et entre le LH et l'aire tegmentale ventrale (VTA) pourraient également intervenir dans la sensibilisation aux deux types de renforcements, dans la mesure où le NAc et la VTA jouent également un rôle dans les comportements alimentaires et addictifs (DiLeone, Georgescu & Nestler, 2003; Harris & Aston-Jones, 2003; Ikegami & Duvauchelle, 2004; Koob, 1999; Korotkova *et al.*, 2003; Steketee, 1998; Stratford & Kelley, 1999). Une étude a mis en évidence que la MCH, injectée *in vitro*, n'avait aucun effet sur l'activité des neurones situés dans la VTA, qu'ils soient dopaminergiques ou non (Korotkova *et al.*, 2003).

De plus, de nombreuses études montrent que la privation chronique de nourriture et le maintien d'un faible poids corporel augmentent les propriétés renforçantes, l'auto-administration ainsi que la locomotion induite par les drogues d'abus (Bell *et al.*, 1997; Cabeza de Vaca & Carr, 1998; Carr, 1996, 2002; Carroll & Meisch, 1984)¹.

Ainsi, en reliant l'hypothalamus latéral avec le système mésolimbique et vu l'implication importante de l'axe MCH/MCHR1 dans l'alimentation, il a été postulé qu'il pourrait moduler l'effet de stimuli renforçants, comme les drogues d'abus (DiLeone, Georgescu & Nestler, 2003; Nahon, 2006; Saper *et al.*, 2002).

Des recherches portant sur l'étude d'un autre peptide ont appuyé cette hypothèse. Il s'agit de l'orexine (ou hypocréatine) qui partage beaucoup de points communs avec la MCH (de Lecea *et al.*, 1998). En effet, en plus d'être localisée exclusivement au sein du LH (Elias *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 1998), elle est impliquée entre autre dans le sommeil et les réponses au stress (Chemelli *et al.*, 1999; Ida *et al.*, 2000), mais également dans les comportements alimentaires (Edwards *et al.*, 1999; Haynes *et al.*, 1999). Tout comme la MCH, l'injection i.c.v. d'orexine augmente la prise de nourriture et les taux d'ARNm du peptide s'élèvent durant le jeûne (Sakurai *et al.*, 1998).

¹ Les effets de la privation chronique de nourriture sur les capacités des WT et KO MCHR1 à être renforcées par l'administration chronique d'amphétamine feront l'objet du chapitre n° 3.

De plus, les neurones à orexine projettent également vers des régions cérébrales impliquées dans les réponses comportementales aux drogues d'abus, tels que le noyau accumbens, le locus coeruleus et l'aire tegmentale ventrale (Peyron *et al.*, 1998). Des études ont également mis en exergue que les neurones à orexine répondaient à un traitement chronique d'amphétamine via l'augmentation d'AMPC (DiLeone *et al.*, 2003), ainsi qu'à la morphine (Geogescu *et al.*, 2003). En effet, des souris invalidées en ce peptide présentent une atténuation des signes physiques de sevrage à la morphine par rapport aux WT, suggérant que l'orexine contribue à la dépendance ainsi qu'à l'expression du sevrage morphinique (Figure 9).

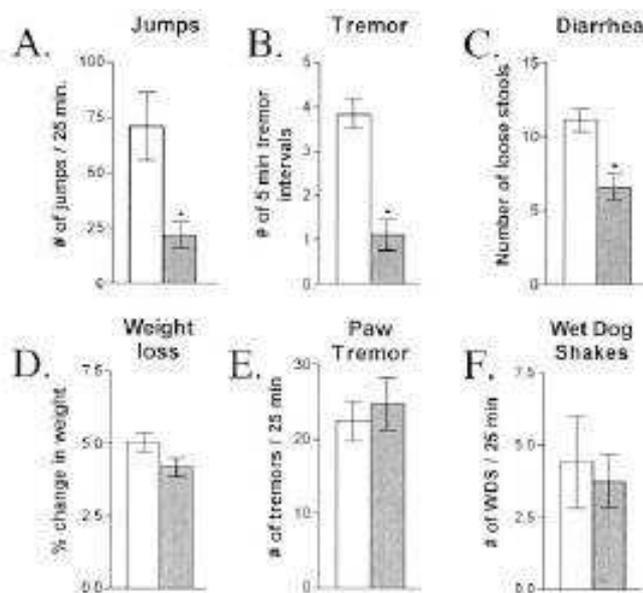


Figure 9. Expérience sur le sevrage morphinique chez des souris WT (barres blanches) et KO (barres grises) en orexine (n=8). Deux jours après avoir reçu 25 mg de morphine en i.p., les souris reçoivent 1 mg de naloxone (un antagoniste de récepteurs opioïdes μ) et les symptômes de sevrage sont ensuite mesurés (**A**: les sauts, **B**: les tremblements, **C**: la diarrhée, **D**: la perte de poids, **E**: le tremblements des pattes, **F**: le secouement de la tête). Plusieurs de ces signes sont fortement atténués chez les KO par rapport aux WT. (*): différence significative entre les génotypes à $P < 0.01$ (Geogescu *et al.*, 2003, fig. 4, p. 3109).

1.5. Création des knock-out

Les différentes expériences réalisées dans le cadre de cette thèse ont été effectuées avec des souris hybrides males, résultant d'un croisement entre les souches C57BL/6J et 129/SvJ. Il est à noter que la souche de 129 que nous avons utilisée pour l'hybridation n'était pas un fond pur dans le sens où elle résultait également d'un croisement entre deux souches de 129, les souches 129/Sv-^{Tyr}+^P et 129cX/Sv (Threadgill *et al.*, 1997).

Le croisement des souris, dont le principe est expliqué ci-dessous, a été effectué au Centre de Recherche en Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire (CNCM), à l'Université de Liège via la technique d'inactivation par recombinaison homologue (Lakaye *et al.*, 1998). Celle-ci est utilisée afin d'inactiver un allèle sauvage, ici en l'occurrence, celui codant le récepteur MCHR1. La méthode consiste tout d'abord à générer *in vitro* une version inactive d'un allèle en remplaçant une portion de celui-ci par un gène conférant une résistance à un antibiotique, généralement la néomycine.

On obtient de la sorte un « vecteur cible » qui est inséré dans une culture de cellules souches (*ES cell*) via le processus d'électroporation. Ces cellules, extraites du blastocyte de souris de la souche 129, ont l'avantage de ne pas encore être spécialisées et peuvent par conséquent se transformer en n'importe quel type de cellule selon le milieu dans lequel elles sont introduites.

Un très faible pourcentage de ces cellules incorporera le vecteur au sein de leur génome. Pour sélectionner les cellules positives, l'antibiotique est ajouté au milieu de culture et les cellules n'exprimant pas le gène de résistance meurent (Haut de la Figure 10). Les cellules survivantes sont alors analysées au niveau moléculaire pour s'assurer de l'inactivation d'un des allèles sauvage c'est-à-dire de son remplacement par l'allèle inactivé porté par le vecteur cible. Les cellules sélectionnées sont alors introduites dans des blastocytes provenant d'une souris C57BL/6J puis ceux-ci sont implantés dans une souris porteuse (Milieu de la Figure 10).

La micro injection de cellules souches dans les blastocytes produit un embryon appelé chimère, car il est composé de cellules originaires de deux souches indépendantes. La couleur du pelage du souriceau constitue un indice précoce de la participation des cellules souches à la formation de la souris chimère.

Par la suite, les chimères sont couplées avec des souris normales (C57BL/6J). Leurs progénitures (F1), portant un allèle inactivé, sont ultérieurement accouplées entre elles afin d'obtenir les trois génotypes possibles : les contrôles (wild type, WT), les hétérozygotes, porteurs d'un allèle sauvage et d'un allèle inactivé, et les homozygotes (knock-out, KO), ne comprenant que l'allèle inactif (Bas de la Figure 10). Ces trois génotypes offrent l'avantage de pouvoir étudier l'impact de l'absence totale ou partielle du gène étudié sur le phénotype des animaux mutants, comparés aux animaux contrôles.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons uniquement travaillé avec deux génotypes : un génotype knock-out pour le MCHR1 ainsi qu'un génotype contrôle (WT). Cette technique de croisement nous permet donc de pouvoir comparer l'influence du génotype au niveau des effets comportementaux de différentes drogues d'abus, telles que la cocaïne et l'amphétamine, offrant ainsi la possibilité d'étudier l'implication potentielle de l'axe MCH/MCHR1 dans le phénomène d'addiction.

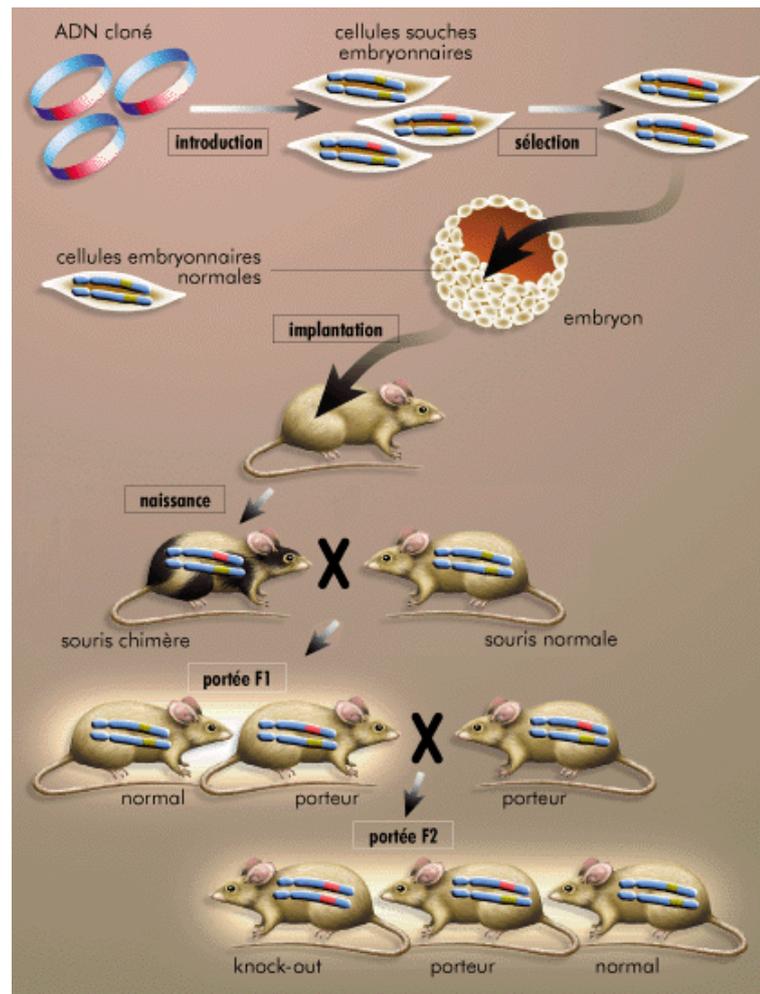


Figure 10. Technique d'inactivation par recombinaison homologe (Cooper, 1999, fig. 3.42, p. 127).

Bien que le modèle génétique knock-out représente une avancée technologique dans la compréhension de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires, il faut cependant souligner le fait qu'il existe certains inconvénients à cette méthode. En effet, plusieurs variables qui entrent en interaction lors de la création d'une mutation génétique sont à prendre en considération, telle que le fond génétique du sujet porteur de la mutation, les facteurs environnementaux et les éventuels phénomènes de compensation de l'organisme durant le développement (Crabbe, Wahlsten & Dudek, 1999; Crusio *et al.*, 2009; Gerlai, 2000).

1.5.1. L'influence du fond génétique

Le fond génétique des souches parentes est connu pour affecter le développement du phénotype chez les animaux génétiquement modifiés (Crusio, 2004; Gerlai, 1996). Cette influence peut s'ajouter à celle de la mutation, dans la mesure où certaines souches de souris diffèrent énormément entre elles au niveau phénotypique. Ainsi, depuis quelques années, plusieurs auteurs insistent sur le fait que la contribution génétique des souches parentes doit être prise en considération et testées via des batteries de tests basiques, avant de tirer des conclusions sur le phénotype de souris knock-out (Crawley, 1996; Crawley & Paylor, 1997; Crusio, 1996; Gerlai, 1996; Lathe, 1996; Rogers *et al.*, 1999; Tarantino *et al.*, 2000).

Le fond génétique 129 est couramment utilisé pour les manipulations génétiques (Gerlai, 1996) et se décline en de nombreuses sous-catégories de souris (Threadgill *et al.*, 1997, voir figure 11 ci-dessous). Ces différentes catégories se différencient entre elles, mais également des autres souches, tant au niveau comportemental (Bothe *et al.*, 2004, 2005; Brooks *et al.*, 2004, 2005; Brown & Wong, 2007; Caldarone *et al.*, 2000; Contet, Rawlins & Deacon, 2001; de Bruin *et al.*, 2006; Koopman *et al.*, 2003; Voikar *et al.*, 2001, 2004) que physiologique (Nguyen *et al.*, 2000a, 2000b, 2006; Schimanski & Nguyen, 2004).

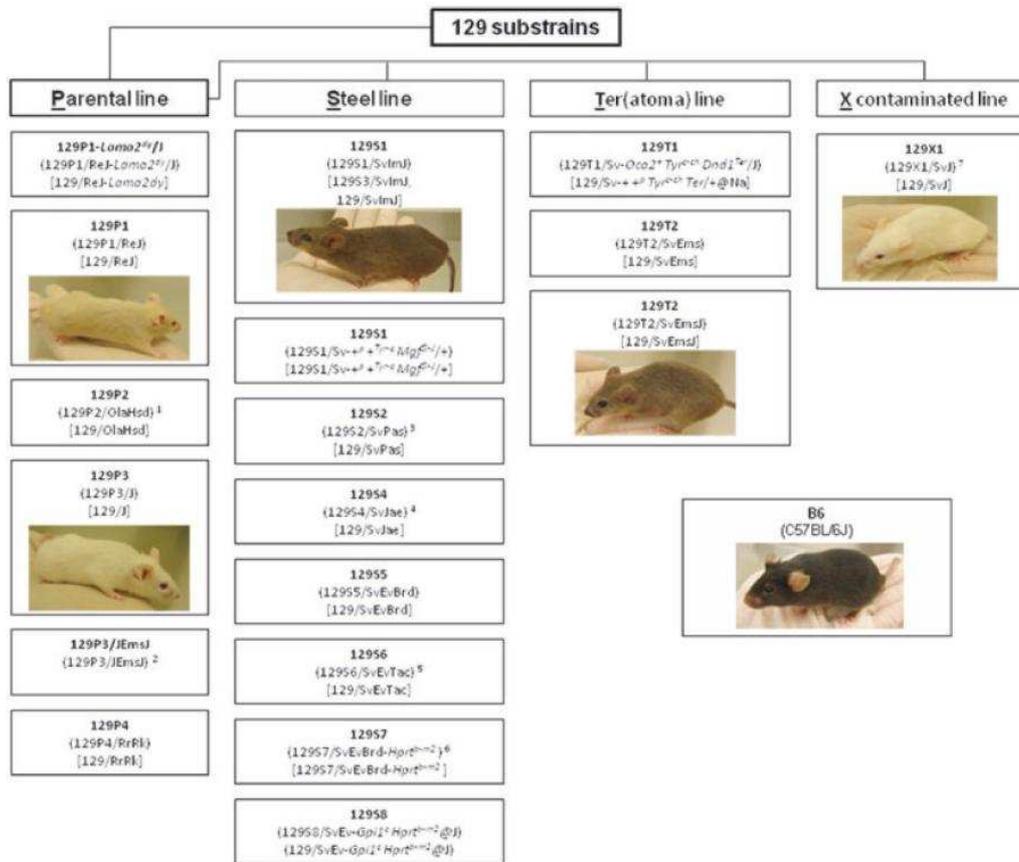


Figure 11. Arborescence des quatre lignées génétiques de souche 129. Les abréviations utilisées dans la littérature sont en gras et l'appellation complète de chaque sous-catégorie est entre parenthèses (Camp *et al.*, 2009, fig. 1, p.2).

De fait, il a été montré que les 129P3 montraient une induction et un maintien de la LTP dans l'aire CA1 moins robuste que ceux de souris C57BL/6J après plusieurs stimulations (Nguyen *et al.*, 2000a, 2000b). Les auteurs mettent donc en garde contre l'interprétation d'un déficit mnésique chez des KO provenant de cette souche de souris.

Plusieurs études ont également montré que les souches de type 129 étaient généralement plus anxieuses que les C57BL/6J dans des tests comme l'EPM, le *light and dark box*¹ test ou encore le *fear conditioning* (Abramov *et al.*, 2008; Bothe *et al.*, 2004, 2005; Brooks *et al.*, 2004; Contet, Rawlins & Deacon, 2001; Crawley, 1999; Hagenbuch, Feldon & Yee, 2006; Holmes *et al.*, 2003; Rodgers *et al.*, 2002; Voikar *et al.*, 2001, 2004).

¹ Ce test est basé sur le conflit entre l'aversion innée des rongeurs pour les endroits illuminés et leur exploration spontanée d'un nouvel environnement. Le dispositif se compose de deux boîtes communicantes, une grande blanche illuminée et une petite noire ($\pm 1/2$ en taille). Les agents anxiolytiques augmentent le temps d'exploration dans la boîte blanche et diminuent la latence avant de pénétrer dans la boîte noire (Bourin & Hascoët, 2003).

De manière plus précise, les récentes expériences portant sur le *fear conditioning* ont montré que plusieurs sous-catégories de 129 (129P1/ReJ, 129P3, 129T2/SvEmsJ et 129X1) présentaient des difficultés à diminuer leur réponse de peur conditionnée malgré une longue période d'extinction, c'est-à-dire une réexposition au contexte répétée sans administration de choc électrique (Camp *et al.*, 2009; Hefner *et al.*, 2008). Le fait que ces animaux émettent un taux élevé et persistant de *freezing* face au contexte d'administration du stimulus aversif proviendrait du fait que leur amygdale reste très active durant les phases d'extinction, alors que son activité est censée être inhibée par le cortex médian préfrontal.

Malheureusement, cette anxiété démesurée chez cette souche de souris peut entacher les résultats dans d'autres études et, par conséquent, fausser les interprétations des résultats. Par exemple, il a été montré que la réponse de renforcement dans le CPP suite à l'administration répétée de morphine se manifeste chez les 129 sous l'influence d'un anxiolytique (ou de morphine) (Dockstader & van der Kooy, 2001). Ainsi, l'absence de renforcement observé chez les 129 testées sous soluté salin le jour du test ne résulte pas d'un déficit de type sensoriel, mnésique ou motivationnel, mais bien d'un taux d'anxiété important.

Au niveau de l'activité locomotrice spontanée et de l'exploration, plusieurs études ont montré que les 129/SvJ (129X1), les 129/SvEvTac (129S6) et les 129/OlaHsd (129P2) présentaient un niveau beaucoup plus faibles par rapport aux C57BL/6J (B6) (Abramov *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2002; Kuzmin & Johansson, 2000; Logue *et al.*, 1997; Miner 1997; Ralph *et al.*, 2001).

En ce qui concerne la réponse locomotrice aux drogues stimulantes, il apparaît que la locomotion chez les 129X1 et les C57BL/6J est stimulée par l'amphétamine et la cocaïne. Par contre, les 129S6 ne sont pas stimulées par l'amphétamine (Paulus *et al.*, 1999; Ralph *et al.*, 2001, voir figure 12 ci-dessous). De très fortes doses sont nécessaires pour faire réagir les 129P2 (Kuzmin *et al.*, 2000) et les 129/J (129P3) ne réagissent pas à la cocaïne (Schlussman *et al.*, 1998, 2003). De fait, suite à l'injection aigue d'une très forte dose de cocaïne (3 injections par jour, séparées d'une heure), les C57BL/6J présentent une augmentation significative de l'activité locomotrice ainsi que des stéréotypies, tandis que chez les 129P3, seule une augmentation des comportements stéréotypés est observée. Néanmoins, cette augmentation reste plus faible que celle rapportée chez les C57BL/6J (Schlussman *et al.*, 1998, 2003).

Des études utilisant des techniques de microdialyse *in vivo* ont révélé que les taux de DA dans le *striatum* de 129/Sv-ter (129T1) étaient plus élevés que ceux des C57BL/6J, suite à l'injection de 5, 10 et 20 mg/kg de cocaïne, parce que le taux de recapture basal de la DA étaient plus faibles chez les 129T1 (He & Shippenberg, 2000). Les mêmes effets sont observés dans le noyau caudé chez la 129P3 (Zhang *et al.*, 2001).

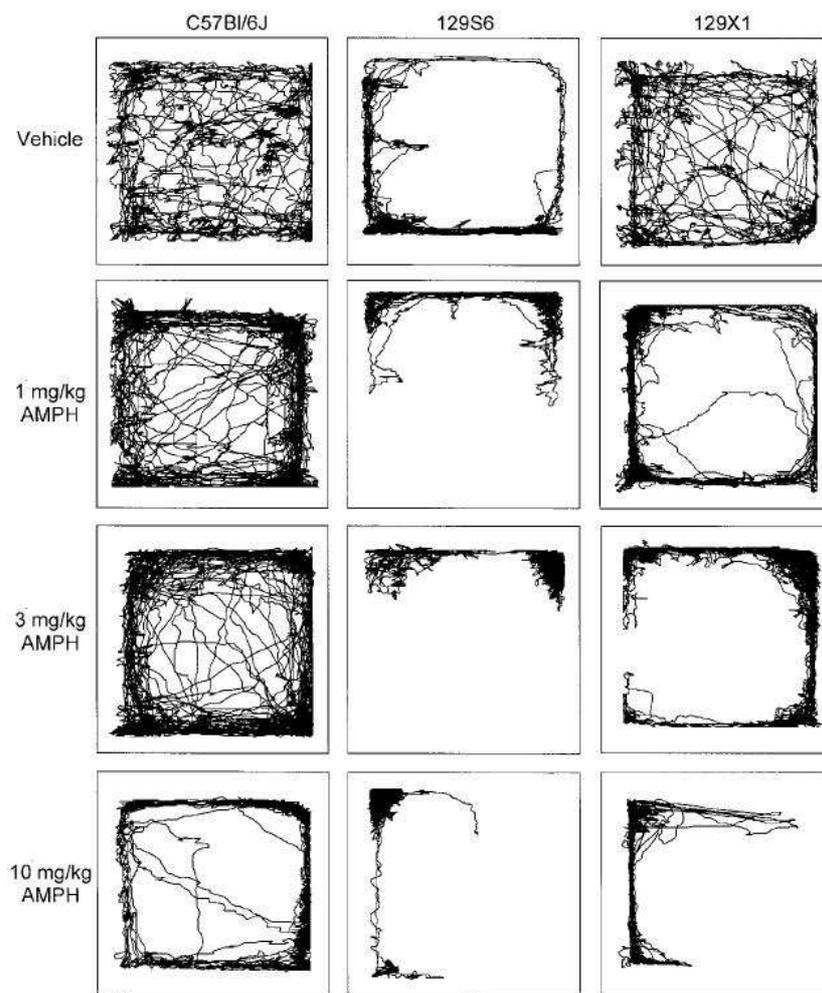


Figure 12. Patterns de l'activité locomotrice individuel d'une souris C57BL/6J, 129S6 et 129X1 à la suite d'une injection d'amphétamine (0, 1, 3 ou 10 mg/kg) dans un *open-field* filmé avec un programme de *vidéo-tracking*, permettant de reconstituer le parcours effectué par chaque souris sur les 10 minutes de session (Ralph, Paulus & Geyer, 2001, fig. 3, p. 152).

Quant à la sensibilité aux effets renforçants des psychostimulants, les C57BL/6J développent une préférence de lieu conditionné à la cocaïne, mais pas les 129X1 ni les 129P3 (Seale & Carney, 1991; Miner, 1997; Cunningham *et al.*, 1999; Schlussman *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002). L'auto-administration chronique de cocaïne est observée chez les C57BL/6J et, à plus hautes doses, chez les 129X1 (Highfield *et al.*, 2002; Thomsen & Caine, 2006), tandis que les 129P2 ne répondent pas du tout aux effets renforçants de la cocaïne (Kuzmin & Johansson, 2000). Quant aux 129S6, une fois l'acquisition établie, les effets renforçants se manifestent. Néanmoins, un nombre plus important de sessions d'entraînement est nécessaire, suggérant que cette sous-catégorie de 129 semble moins sensibles aux effets aussi bien stimulants que renforçants des psychostimulants (Thomsen & Caine, 2006).

1.5.2. Les phénomènes de compensation

Il existe une différence importante entre le fait de bloquer un récepteur par l'injection d'un antagoniste et le fait d'empêcher l'expression d'un récepteur. Une mutation peut donner lieu à des phénomènes de compensation au niveau du développement et produire des changements phénotypiques secondaires. De fait, un organisme mutant pourrait non seulement être privé de l'expression d'un gène, mais également posséder un nombre de processus physiologiques altérés par compensation des effets de la mutation. Une étude très élégante a mis en évidence que l'absence de récepteurs 5-HT1B résultait en une stimulation et un renforcement à la cocaïne marqués, alors que le blocage par un antagoniste tend à diminuer, voire supprimer, ces réponses comportementales (Castanon *et al.*, 2000).

Par conséquent, certains changements phénotypiques pourraient ne pas être reliés au gène étudié (Gerlai, 1996). De plus, vu que le gène n'est pas actif durant le développement, il est possible qu'un autre gène puisse « adopter » la fonction de ce dernier et compenser son absence, masquant de la sorte l'influence imputable à la mutation (Crawley, 1996).

Les différentes études qui ont examiné l'influence du fond génétique sur le comportement des souris mutantes ont mis en évidence une influence majeure de celui-ci (Bowers *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1998; Morice *et al.*, 2004; Wolfer *et al.*, 1997). Par exemple, une étude relative à l'implication de la sérotonine dans l'anxiété n'est pas arrivée à mettre en évidence l'effet anxiogénique de la mutation pour le fond génétique 129S6 par rapport au fond C57BL/6J, car les WT 129S6 présentent un taux d'anxiété de base très important, ce qui masque l'influence de la mutation génétique (Holmes *et al.*, 2003).

Si l'on se réfère aux KO présentés dans le cadre de cette thèse, les différentes études ayant examiné le rôle du récepteur à la MCH à partir de deux fonds génétiques distincts (129 vs C57BL/6J) ont également mis en évidence des patterns de comportement différents chez les WT. Il apparaît que les WT de fond génétique 129S6 et C57BL/6J diffèrent au niveau de l'activité locomotrice spontanée, mais également pour la prise de poids face à différents types de régime (gras vs non-gras) (Kokkotou *et al.*, 2005 pour les WT et KO MCH; Lalonde & Qian, 2007). De plus, le faible taux d'anxiété des souris mutantes MCHR1 se manifeste dans l'EPM pour le fond C57BL/6J, alors que pour le fond 129, une réactivité moins importante des KO MCHR1 est rapportée durant la manipulation des animaux (batterie de test SHIRPA, voir Rogers *et al.*, 1997) (Lalonde & Qian, 2007).

Une influence massive du fond génétique a été mis en évidence dans nos laboratoires lors de l'étude du développement d'une sensibilisation comportementale suite au traitement chronique de cocaïne (12 mg/kg) (Figure 13) (voir Tyhon *et al.*, 2008c dans la partie Annexes, p. 180). En complément des souris KO MCHR1 de fond mixte C57BL/6J x 129/SvJ, des mutantes ont été créés à partir d'un autre fond génétique croisé, 129/SvJ x 129/SvPas.

Lors de l'administration répétée d'une dose stimulante de cocaïne, une tolérance¹ comportementale apparaît clairement dès les premières injections chez les WT 129x129 (figure 13, panel en haut à gauche, ronds blancs). En ce qui concerne les résultats des KO MCHR1, ils ne présentent pas de sensibilisation locomotrice et ce, quel que soit le fond génétique (ronds et carrés noirs). Ces résultats sont corroborés par les pentes de régression moyennes qui mettent en évidence que les WT 129xC57 exhibent une sensibilisation de grande ampleur par rapport aux autres groupes testés (panel en haut à droite, carrés blancs). Ainsi, selon le fond génétique utilisé, le récepteur MCHR1 exerce soit une action inhibitrice sur la locomotion (fond 129x129), soit une action potentialisante (fond 129xC57).

¹ La tolérance est l'inverse d'une sensibilisation, à savoir une diminution progressive de l'activité locomotrice à la suite d'injections répétées de la même dose de psychostimulant (Warburton, 1975).

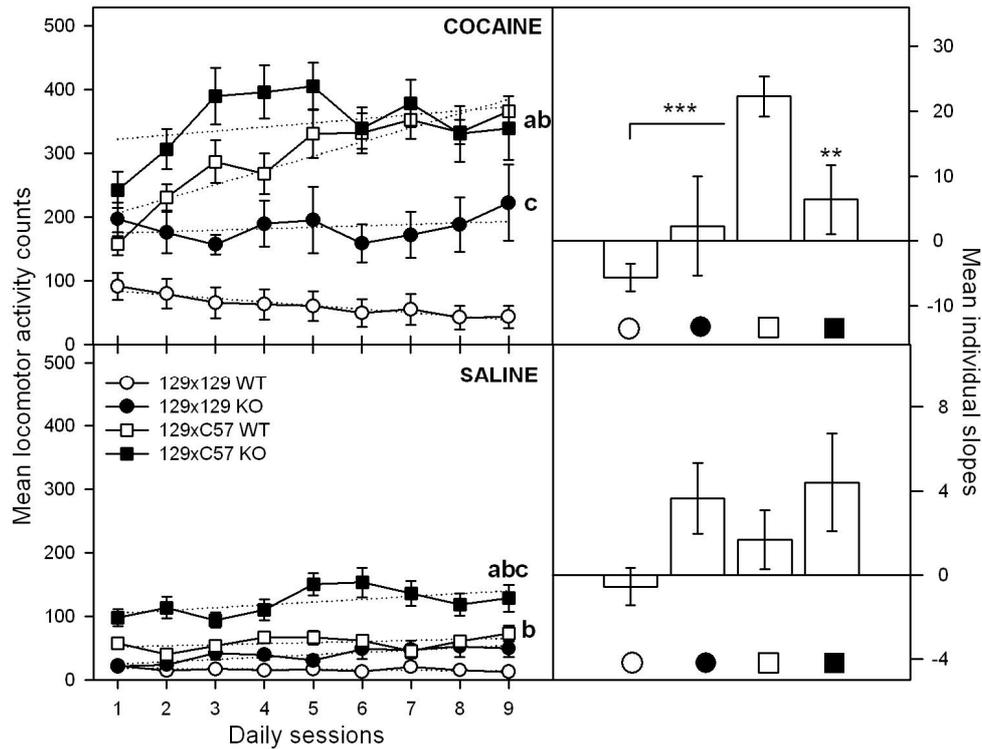


Figure 13. Effet chronique d'injections quotidiennes de cocaïne (12 mg/kg) sur l'activité locomotrice de WT et KO issus d'un fond croisé C57BL/6Jx129X1 (129xC57) ou d'un fond croisé 129/SvJ x 129/SvPas (129x129) (panels de gauche) et les pentes de régression moyennes (panels de droite). Différence statistique significative à $P < 0.01$ (**) ou $P < 0.001$ (***) avec deux Anovas double (2x2). (a) = différence entre la première et la dernière session, (b) = différence entre les fonds génétiques pour un même génotype, (c) = différence significative entre les génotypes d'un même fond génétique avec deux Anovas en mesures répétées (2x2x9) (Tyhon *et al.*, 2008c, fig. 2).

En résumé, il est donc nécessaire de prendre en compte l'influence éventuelle des différentes variables détaillées ci-dessus dans l'analyse de l'influence d'une altération génétique au niveau comportemental et moléculaire.

Le chapitre suivant va détailler les différentes expériences effectuées sous l'influence de psychostimulants chez nos souris WT et KO MCHR1 de fond génétique croisé C57BL/6J x 129/SvJ.