

Chapitre 3 : Impact de la privation de nourriture sur les effets comportementaux de l'amphétamine

Dans ce chapitre, nous détaillerons les expériences effectuées sous privation chronique de nourriture. Les comportements de prise de nourriture ainsi que leur régulation hormonale seront brièvement expliqués. Nous nous attarderons sur les conséquences de la privation chronique de nourriture sur l'action des drogues et sur l'activité de l'axe MCH/MCHR1.

1. La régulation hormonale de l'alimentation

Les comportements de prise de nourriture constituent l'un des piliers dans le maintien de l'homéostasie des fluides et de la balance énergétique. Le fait de boire et de manger sont définis comme des comportements intermittents qui renouvellent et anticipent l'épuisement des ressources énergétiques. Les mécanismes qui les sous-tendent sont à la fois complexes et redondants (Moran & Sakai, 2003).

Chez de nombreuses espèces, dont l'humain, la prise de nourriture s'effectue sur plusieurs repas. L'initiation d'un repas est déterminée par plusieurs facteurs, comme par exemple, la disponibilité de la nourriture. Durant la prise de nourriture, les nutriments vont entrer en contact avec de nombreux récepteurs au sein de la cavité orale et du tractus gastro-intestinal. Cet enchaînement va déclencher une cascade de signaux hormonaux et neuronaux qui vont déterminer la taille du repas. Celle-ci peut fortement varier, notamment grâce au goût. De fait, des substances savoureuses sont consommées plus rapidement et en plus grande quantité que des substances qui ont mauvais goût. D'autres facteurs influencent la prise de nourriture, telle que les normes culturelles et sociales, les facteurs environnementaux ou encore les régulateurs métaboliques (Moran & Sakai, 2003).

L'hypothèse selon laquelle les signaux rendant compte de la disponibilité des stocks énergétiques joueraient un rôle important dans le contrôle de la prise de nourriture est étudiée depuis de nombreuses années (Kennedy, 1953; Mayer, 1953). De cette hypothèse sont nées les souris transgéniques obèses (*ob/ob*) et diabétiques (*db/db*) (voir photo ci-dessous) (Coleman, 1973). Ces souris ont permis de mettre en évidence le rôle prépondérant de la leptine dans la gestion à long terme des stocks énergétiques corporels.



Photo d'une souris transgénique *ob/ob* (à gauche) et d'une souris normale de fond génétique C57BL/6J (tiré du catalogue du laboratoire Jackson).

1.1. La leptine

La leptine et ses récepteurs sont produits respectivement à partir des gènes *ob* et *db* (Chua *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1994). Les récepteurs de la leptine se présentent sous deux formes distinctes, l'un de forme courte (Ob-Ra) et le second, de forme longue (Ob-Rb) (Bjorbaek *et al.*, 1998). L'activation de ce dernier est capable de déclencher une série de signaux de transduction et est essentiellement exprimé dans les noyaux hypothalamiques, lesquels sont connus pour leur rôle dans la balance énergétique. Les concentrations les plus élevées des récepteurs Ob-Rb se situent entre autre au sein de l'hypothalamus latéral (LH) (Elmqvist *et al.*, 1998).

L'administration centrale et périphérique de leptine réduit la consommation d'aliments et cet effet se répercuterait essentiellement sur la quantité ingérée plutôt que sur la fréquence du comportement alimentaire (Eckel *et al.*, 1998; Flynn *et al.*, 1998; Kahler *et al.*, 1998). Le mécanisme d'action sous-tendant cet effet serait lié à la détérioration du goût pour les aliments sucrés (Kawai *et al.*, 2000) ou encore à l'altération des effets renforçants induits par l'ingestion. De fait, l'injection de leptine diminue le potentiel renforçant de la stimulation électrique intracrânienne¹ (Fulton, Woodside & Shizgal, 2000).

¹ Mise en place par Olds & Milner (1954), cette technique consiste à placer des électrodes dans une ou plusieurs zones cérébrales. Les électrodes sont reliées à un système qui peut être actionné par l'animal afin de produire lui-même une stimulation électrique de ces zones (pour des synthèses sur le sujet, voir Liebman (1989) et Wise (1996)).

1.2. L'insuline

Bien que l'étude des mécanismes d'action de la leptine ait été effectuée plus en profondeur, l'insuline agit également au sein de l'hypothalamus en tant de signal d'adiposité. Elle est principalement sécrétée par des cellules situées dans le pancréas, plutôt que dans le tissu adipeux et joue un rôle majeur dans la régulation des substrats énergétiques, dont les principaux sont le glucose et les acides gras (Corp *et al.*, 1986).

L'action de l'insuline est souvent résumée par son effet hypoglycémiant (baisse du taux de glucose dans le sang). Elle est sécrétée en fonction de l'état nutritionnel et de l'activité physique. Ainsi, après un repas, la sécrétion d'insuline est stimulée, ce qui permet le stockage du glucose dans les muscles, le tissu adipeux et le foie. En cas d'abondance alimentaire, les taux d'insuline augmentent de manière proportionnelle à la quantité d'acides gras stockés dans les tissus adipeux. L'insuline agit via ses récepteurs situés dans l'hypothalamus, avec une plus grande concentration dans le noyau arqué (Corp *et al.*, 1986). L'administration centrale d'insuline inhibe la prise de nourriture et diminue l'expression du peptide NPY (Schwartz *et al.*, 1992; Woods *et al.*, 1979).

En résumé, la prise alimentaire et la digestion induisent l'expression de plusieurs hormones, telles que l'insuline, la leptine ou encore la ghréline (sécrétée par l'estomac) qui vont informer les neurones de l'hypothalamus du bilan énergétique du corps. Ces mêmes neurones participent également à la régulation de la prise alimentaire. Certains incitent à la satiété et d'autres, au contraire, invitent à s'alimenter (Figure 39).

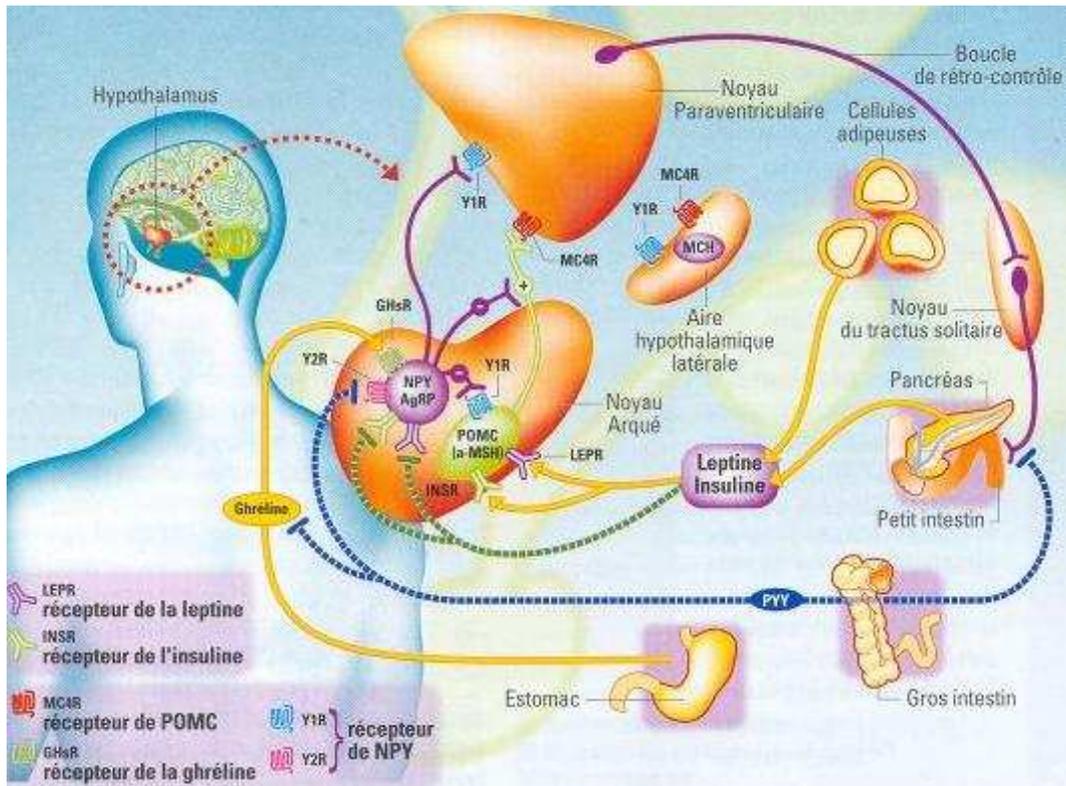


Figure 39. Principales voies de régulation de la prise alimentaire dans l'hypothalamus. Les lignes en pointillés indiquent les principaux effets hormonaux inhibiteurs et les lignes pleines, les effets stimulateurs de la prise alimentaire. Le noyau arqué, le noyau paraventriculaire et aussi l'aire de l'hypothalamus latérale contiennent chacun des neurones capables de stimuler ou d'inhiber la prise alimentaire. Différents neuropeptides (NPY, POMC, MCH, α -MSH) jouent le rôle de neuromédiateur du comportement alimentaire dans l'ensemble des noyaux hypothalamiques impliqués. La sécrétion des neuropeptides est stimulée notamment par l'arrivée dans le sang de peptide/hormone issu du tractus gastro-intestinal (insuline, ghréline) et du tissu adipeux (leptine). Des boucles de rétro-contrôle permettent de transmettre en retour des informations aux organes périphériques (Kalat, 2001, fig. 64, p. 285).

1.3. Les systèmes hypothalamiques

Le rôle de l'hypothalamus dans le contrôle de la prise de nourriture fût découvert à partir d'expériences lésionnelles (Anand & Brobesck, 1951; Heatherington & Ranson, 1940). Des lésions effectuées à divers endroits de l'hypothalamus produisent soit une hyperphagie assortie d'une obésité (partie médiane) ou, à l'inverse, une anorexie marquée associée avec une perte de poids importante (LH). Par contre, la stimulation de ces zones induit l'effet contraire, à savoir une inhibition de la prise de nourriture pour la partie médiane et une incitation à manger pour le LH (Stellar, 1954). Ces résultats ont permis d'identifier deux centres de la régulation alimentaire, d'une part, la région ventromédiane (VMH) considérée comme le centre de la satiété et le LH représentant le centre de l'alimentation.

L'interaction de la leptine avec ses récepteurs provoque l'activation ou l'inactivation des circuits hypothalamiques contenant des peptides à la fois orexigéniques et anorexiques (voir tableau ci-dessous) (Schwartz *et al.*, 1996).

Orexigéniques	Anorexigènes
Neuropeptide Y (NPY)	Alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH)
Agouti-related protein (AgRP)	Corticotrophin-releasing hormone (CRH)
Galanin	Urocortine
Orexine	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript
MCH	(CART)

Tableau 1. Liste non exhaustive des peptides hypothalamiques régulateurs de la prise alimentaire (Moran & Sakai, 2003, p. 300).

Les peptides orexigéniques sont connus pour leur stimulation de la prise alimentaire. Parmi ceux-ci, celui qui a reçu la plus grande attention est le neuropeptide Y (NPY). Il a été démontré que l'injection aiguë i.c.v. ou intra-hypothalamique de NPY stimulait le comportement alimentaire, tandis que le traitement chronique provoque une obésité (Morley *et al.*, 1987; Zarjevski *et al.*, 1993). De plus, l'expression des gènes NPY au sein de l'hypothalamus augmente en réponse à une privation de nourriture (Kalra *et al.*, 1991; White & Kershaw, 1989) et diminue lors de la consommation excessive de nourriture hautement énergétique (Widdowson *et al.*, 1999).

Les corps cellulaires exprimant le NPY sont localisés dans plusieurs noyaux de l'hypothalamus et projettent vers différentes régions de l'hypothalamus latéral (Chornwall *et al.*, 1985; Stanley & Leibowitz, 1985). Néanmoins, l'absence de l'expression du peptide ou de ses récepteurs n'induit pas une absence de prise alimentaire ou un gaspillage de nourriture (Erikson, Clegg & Palmiter, 1996; Marsh *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent l'existence de plusieurs systèmes impliqués dans la régulation de la prise de nourriture et que l'absence d'un de ces systèmes n'est pas suffisante pour bloquer les comportements alimentaires de manière significative.

De fait, d'autres peptides orexigéniques ont été identifiés, tels que le galanin, l'orexine, l'AgRP ou encore la MCH. La galanin, injectée en i.c.v. ou directement dans l'hypothalamus, stimule la prise alimentaire (Crawley *et al.*, 1990). De plus, les taux de galanin et d'expression d'ANRM augmentent lorsque des rats consomment de la nourriture hautement énergétique, mais ne semble pas être affectés par le jeûne (Beck *et al.*, 1993; Mercer, Lawrence & Atkinson, 1996).

En ce qui concerne l'orexine, elle s'exprime sous deux formes issues du même prépro-ARNm, orexine A et orexine B (Sakurai *et al.*, 1998). Les deux formes augmentent la prise de nourriture lorsqu'elles sont administrées au niveau central, même si l'orexine A est plus efficace et les taux d'ARNm du peptide s'élèvent durant le jeûne (Sakurai *et al.*, 1998; Sweet *et al.*, 1999). Les neurones contenant l'orexine sont localisés dans l'aire périfornicale de l'hypothalamus et projettent à travers celui-ci (Peyron *et al.*, 1998). En réponse à une privation de nourriture, l'expression de la prépro-orexine augmente et l'administration d'orexine A inhibe la prise de nourriture, suggérant une influence de l'orexine endogène sur le contrôle de l'alimentation (Haynes *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2000).

Comme expliqué dans le premier chapitre, la MCH est également impliquée dans la régulation de l'alimentation. Brièvement, l'i.c.v. aigüe de MCH augmente la prise alimentaire de manière dose-dépendante à court terme (Rossi *et al.*, 1997). L'injection i.c.v. chronique de MCH augmente la prise de nourriture, le poids corporel et la masse de tissu adipeux chez des souris nourries avec de la nourriture hautement énergétiques (Della-Zuana *et al.*, 2002 ; Ito *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 1996). L'expression de MCH est augmentée chez les animaux obèses et est modulée par le jeûne (Qu *et al.*, 1996). Les neurones à MCH situés dans le LH forment une population distincte de celle des neurones à orexine. Néanmoins, ces deux populations reçoivent toutes les deux des projections du noyau arqué contenant des fibres NPY (Broberger *et al.*, 1998; Chaffer & Morris, 2002).

Un autre peptide orexigénique est la protéine reliée à l'agouti (*agouti-related protein*, AgRP). Cette dernière est localisée au sein du noyau arqué et son expression est régulée par le jeûne (Hahn *et al.*, 1998). L'administration centrale d'antagonistes AgRP augmente la prise de nourriture et ce, de manière durable (Fan *et al.*, 1997). L'AgRP est synthétisée à partir de pro-opiomélanocortine (POMC), dont l'expression diminue lors d'une privation de nourriture et augmente lors d'un gavage excessif (Hagan *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1996).

La POMC est également à l'origine de la synthèse d'un autre peptide, anorexigène cette fois, l'hormone de stimulation de la production d'alpha-mélanocyte (*alpha-melanocyte stimulating hormone*, α -MSH). L'administration centrale d' α -MSH inhibe la prise de nourriture et cet effet est sous-tendu par l'interaction avec les récepteurs à la mélanocortine de type 4 (MC-4) (Benoit *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 1997).

La catégorie de peptides anorexigènes comprend également l'hormone de libération de l'hormone corticotrope¹ (*corticotrophin-releasing hormone*, CRH), l'urocortine et le CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*). L'administration centrale de chacun de ces peptides ou hormones diminue la prise de nourriture. De plus, l'expression de ces derniers est diminuée par un état de privation, alors qu'elle est augmentée par un état de balance énergétique positive (Moran & Sakai, 2003).

Comme expliqué plus haut, la leptine joue un rôle essentiel dans la régulation de la prise de nourriture et il apparaît qu'elle interagit avec les différents peptides orexigéniques et anorexigènes qui viennent d'être décrits (Figure 40). De fait, la leptine augmente l'activité des neurones POMC, CRH et CART au sein du noyau arqué via l'activation de ses récepteurs Ob-Rb (Kristensen *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 1997; van Dijk *et al.*, 1999). Elle interagit également avec les neurones NPY, AgRP et orexine en diminuant leur activité, induisant ainsi une action anorexigène plus importante (Beck & Richy, 1999; Murray *et al.*, 2000b; Sahu, 1998; Schwartz *et al.*, 1996). Ces neurones projettent vers le LH qui contient les neurones à la MCH. Ceux-ci sont inhibés par les projections de POMC et de CART, alors que les projections de NPY et d'AgRP exercent l'effet opposé. Ce circuit peut être bloqué par l'administration de divers antagonistes MCHR1 (Borowski *et al.*, 2002; Georgescu *et al.*, 2005; Handlon & Zhou, 2006; Kowalski *et al.*, 2004; Takekawa *et al.*, 2002).

¹ L'hormone corticotrope est également appelée ACTH (*Adreno CorticoTropic Hormone*).

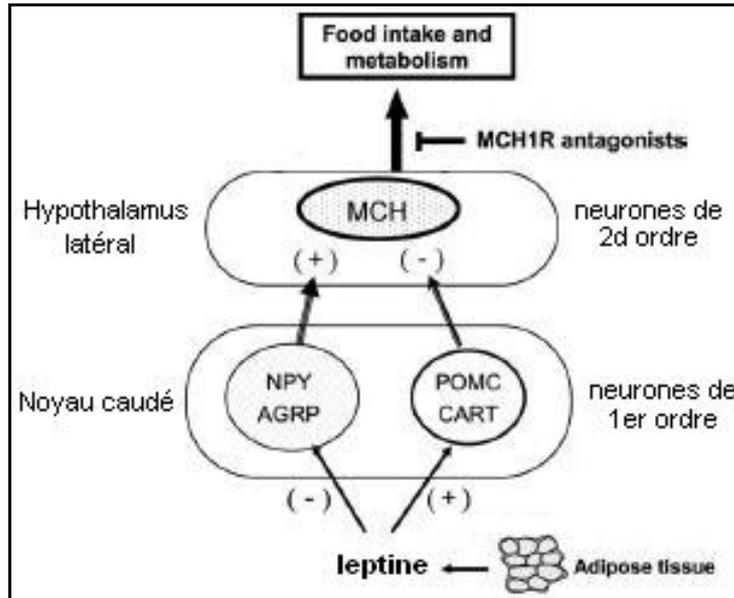


Figure 40. Représentation schématique du circuit MCH au sein de l'hypothalamus (adapté de Saito & Nagasaki, 2008, fig. 2, p. 163).

1.4. Le système dopaminergique

Plusieurs études ont mis en évidence que le système dopaminergique (DA) participe également aux aspects renforçants de la nourriture, en plus de ceux des drogues (Di Chiara *et al.*, 2004). De fait, l'injection de faibles doses d'agonistes DA stimule la prise alimentaire (Silss & Vaccarino, 1996) et l'administration d'antagonistes DA la diminue (Schneider *et al.*, 1990). Les animaux porteurs d'une mutation génétique altérant la production de dopamine sont aphagiques (Zhou & Palmiter, 1995). De plus, le fait de manger provoque une élévation de DA extracellulaire au sein du NAc, et cette augmentation est d'autant plus forte si la nourriture consommée est considérée comme savoureuse (Martel & Fantino, 1996).

Ces résultats confèrent un rôle particulier à la dopamine du système mésolimbique dans la médiation du renforcement de la nourriture.

2. Effets de la restriction alimentaire sur l'action des drogues

Le pouvoir renforçant des drogues d'abus est sous-tendu par l'activation du circuit neuronal qui régule également les effets motivants saillants de la nourriture (Carr, 1996; Piazza & Le Moal, 1996). Par exemple, la stimulation locomotrice induite par l'amphétamine ainsi que l'auto-administration de morphine peuvent être prédites par la tendance des animaux à ingérer une solution sucrée sucrées (Gosnell *et al.*, 1996; Stills & Crawley, 1996). Il existe également une importante co-morbidité entre les désordres alimentaires et la consommation de drogues d'abus (Holderness, Brooks-Gunn & Warren, 1993).

Il est établi que la restriction alimentaire augmente le potentiel renforçant des drogues d'abus. De fait, l'auto-administration d'une majorité de drogues d'abus s'effectue en plus grande proportion lorsque les animaux sont privés de nourriture (Campbell & Figbier, 1971; Carroll & Meisch, 1984). L'effet renforçant mesuré par la préférence locale conditionnée (CPP) est également augmenté par une restriction alimentaire dans le cas de doses modérées de cocaïne (5 mg/kg) et d'amphétamine (Figure 41) (Bell *et al.*, 1997; Stuber *et al.*, 2002). Les effets stimulants de certaines drogues d'abus, telles que la cocaïne et l'amphétamine, sont également plus marqués lorsque les animaux sont sous restriction alimentaire (Cabeza de Vaca & Carr, 1998; Cabib & Bonaventura, 1997; Carr, Kim & Cabeza de Vaca, 2000; Deroche *et al.*, 1993).

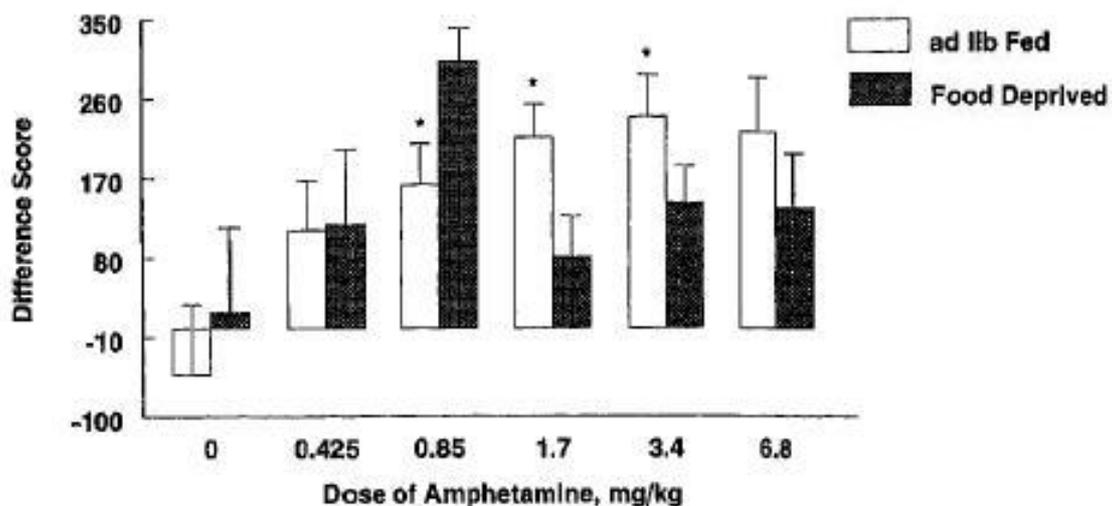


Figure 41. Effet de la restriction alimentaire (15 g/jour) sur la préférence de lieu conditionné à l'amphétamine chez le rat. Les données sont représentées en termes de différence entre le temps passé dans le compartiment associé à la drogue et celui associé au soluté salin. (*) représente une différence significative entre le groupe nourri *ad libitum* et celui mis au régime à $P < 0.05$ (Stuber *et al.*, 2002, fig. 1, p. 86).

Cet effet potentialisant de la privation alimentaire sur l'action des drogues d'abus serait dû à l'augmentation de la sensibilité aux drogues plutôt qu'à des changements au niveau de l'efficacité de celles-ci (Cabeza de Vaca & Carr, 1998). En effet, la potentialisation induite par la privation alimentaire ne perdure pas dans le temps, comme le phénomène de sensibilisation (Pierce & Kalivas, 1997). Une fois que la nourriture est à nouveau *ad libitum*, les effets de la privation alimentaire disparaissent endéans une semaine avec la récupération de la perte de poids corporel (Carr, 2002).

L'implication de certaines hormones endocrines et/ou de neuropeptides dont l'activité pourrait être altérée par une balance énergétique négative a été hypothétisée. Ainsi, un rôle de la leptine a été proposé à la suite de recherches montrant que l'injection i.c.v. de celle-ci augmente les effets renforçants et stimulants de l'amphétamine (Cabeza de Vaca, Kim & Carr, 2002; Hao *et al.*, 2004, 2006). L'injection de leptine bloque également l'expression d'un CPP pour de la nourriture hautement énergétique (Figlewicz *et al.*, 2004) et empêche la rechute à l'héroïne suite à une privation de nourriture (Shalev *et al.*, 2001).

La plus grande sensibilité aux drogues d'abus suite à une restriction alimentaire pourrait également être expliquée par une interaction avec l'activité dopaminergique (DA). De fait, les effets renforçants d'agonistes DA, tels que le quinpirole, sont augmentés par une restriction alimentaire chronique (Carr, 2001). De plus, il a été montré qu'une restriction sévère de nourriture (perte de 30 % du poids corporel) diminue le taux de base de DA dans le NAc et augmente la libération de DA dans la même région à la suite d'injection de cocaïne et d'amphétamine (Rouge-Pont *et al.*, 1995; Pothos *et al.*, 1995) et plus particulièrement dans la partie dorsale du NAc (Cadoni *et al.*, 2003). Cet effet ne semble pas être sous-tendu par une interaction plus importante entre les drogues et le DAT (Zhen *et al.*, 2006). Néanmoins, l'activité de seconds messagers impliqués dans les mécanismes d'action des drogues d'abus est augmentée lors d'une restriction alimentaire (Carr *et al.*, 2009; Haberny *et al.*, 2004). Par exemple, une injection i.c.v. d'amphétamine produit une réponse *c-Fos* plus importante dans plusieurs aires cérébrales contenant des terminaisons DA (NAc, *caudate putamen*, complexe de l'amygdale, pallidum ventral) chez des animaux soumis à un régime (Carr & Kutchukhidze, 2000).

La restriction alimentaire peut également être considérée comme un stress, car il a été montré qu'elle activait l'axe HPA (Adam & Epel, 2007; Nieuwenhuizen & Rutters, 2008; Piazza & Le Moal, 1996). Un rôle de la corticostérone a été mis en évidence dans la régulation des effets renforçants des drogues d'abus par la privation alimentaire (Deroche *et al.*, 1995; Rouge-Pont *et al.*, 1995). Il a été montré que la potentialisation des effets locomoteurs de l'amphétamine, la cocaïne ou de la morphine induite par la restriction alimentaire est bloquée par une adrénalectomie (Deroche *et al.*, 1993; Piazza *et al.*, 1991) ou l'injection d'un inhibiteur de la synthèse de corticostérone (métyrapone) (Marinelli *et al.*, 1996).

En utilisant la restriction alimentaire comme un stress, Cabib et collègues (2000) ont montré que l'aversion observée dans le CPP chez des souris de souche DBA pour de faibles doses d'amphétamine se transformait en renforcement (Figure 42, panel A). Les résultats locomoteurs montrent également un changement de sensibilité chez les DBA, dans la mesure où, après une période de régime, elles sont stimulées par une faible dose d'amphétamine (panel B). Le protocole consistait à soumettre les animaux à un régime prolongé (12 jours) et ensuite les re-nourrir durant quelques jours avant de les tester.

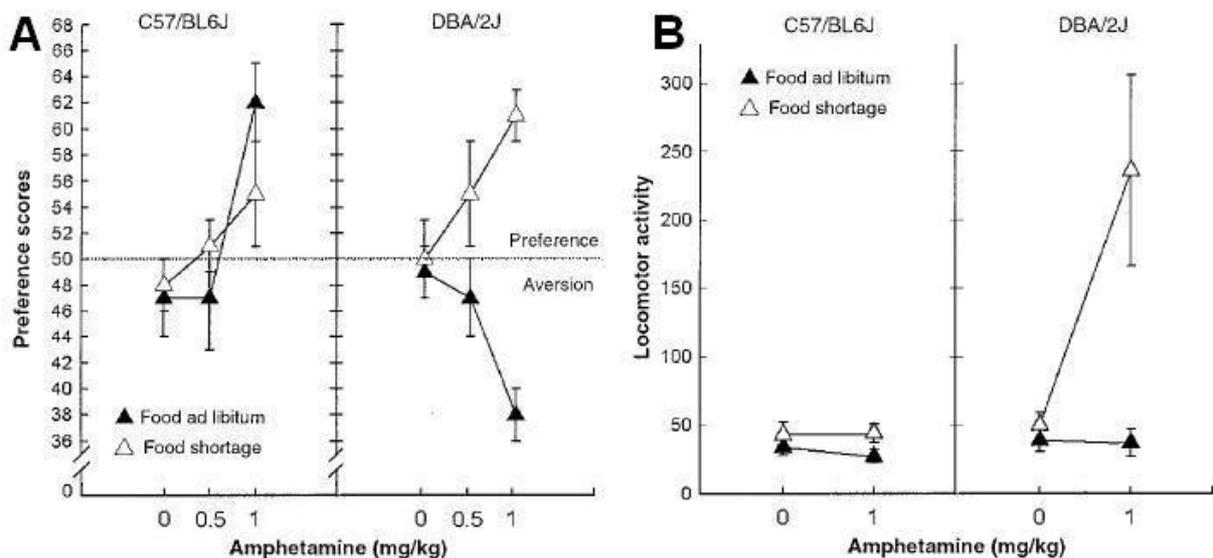


Figure 42. Effet du stress induit par une restriction alimentaire sur la préférence de lieu conditionné (A) et la locomotion (B) sous amphétamine chez des souris de souche DBA/2J et C57BL/6J ayant subi au préalable (*Food shortage*) ou non (*Food ad libitum*). Les données sont représentées en termes de pourcentage de temps passé dans le compartiment associé à la drogue par rapport au temps total de la session (Cabib *et al.*, 2000, fig. 3, p. 465).

3. Régulation de l'axe MCH/MCHR1 lors de privation de nourriture

Comme expliqué précédemment, la MCH joue un rôle modulateur important dans l'alimentation. Il est donc logique que la privation de nourriture ait un impact majeur sur l'activité des neurones MCH et de ses récepteurs.

Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de l'expression d'ARNm de MCH après une courte période de jeûne. Chez le rat, cette augmentation se produit durant une privation totale de nourriture de 24, 48 ou 60h (Presse *et al.*, 1996; Tritos *et al.*, 2001). Au-delà (72h), l'élévation du taux d'ARNm est plus faible (Figure 43). Une fois que la nourriture est à nouveau *ad libitum*, les taux d'ARNm de MCH reviennent au niveau exprimé par le groupe contrôle et cela, dès le premier jour (Presse *et al.*, 1996).

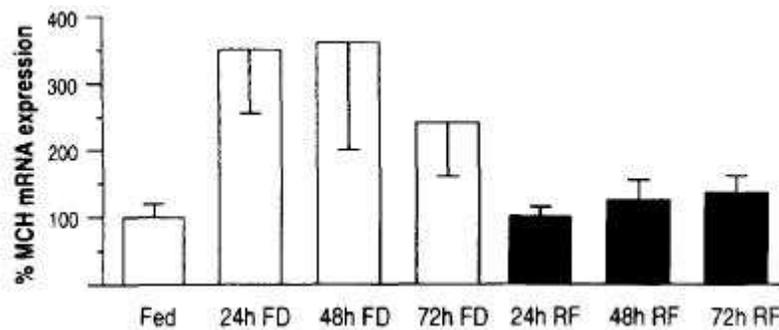


Figure 43. Décours temporel de l'expression d'ARNm de MCH (+ ESM) après une période de privation de nourriture (*food deprivation*, FD) et de réalimentation (*refeeding*, RF). Le groupe contrôle (Fed) n'est pas soumis à un régime (Presse *et al.*, 1996, fig. 6, p. 740).

Néanmoins, les auteurs soulignent une importante variation dans l'expression des taux d'ARNm de MCH entre les individus soumis à la privation de nourriture, suggérant une éventuelle influence des facteurs environnementaux ou génétiques qui pourraient altérer la réponse de l'activité des gènes à MCH après une période de jeûne (Presse *et al.*, 1996). De fait, une autre étude ne met pas en évidence une élévation significative du taux d'ARNm de MCH après une privation de nourriture sur 24h ou 48h chez le rat (Hervé & Fellman, 1997).

Une étude plus récente a montré que, lorsque des rats sont soumis à un régime hautement calorique pendant 10 jours, une augmentation des taux d'expression d'ARNm de MCH (49%) et de MCHR1 (118%) est observée. Cependant, une restriction alimentaire de 10 jours consistant à donner 60% de la ration de nourriture journalière à des rats, n'induit pas de changement au niveau de l'axe MCH/MCHR1 (Elliott *et al.*, 2004). De manière similaire, des rats présentent une altération de l'expression d'ARNm de MCH uniquement lorsque le régime est accompagné d'exercice accru, via le placement d'une roue dans la cage (de Rijke *et al.*, 2005). Enfin, *in vitro*, l'injection de glucose à une concentration proche de celle induisant une hyperglycémie (trop de sucre dans le sang) augmente l'excitabilité des neurones MCH, engendrant une dépolarisation de ces derniers (Burdakov *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'expression de la MCH est accrue en réaction à une situation sévère de balance énergétique négative. En complément, il apparaît que l'activité des neurones à MCH soit également dépendante du rythme circadien. Comme présenté à la figure 44, une étude a montré qu'après 48h de privation de nourriture, les rats euthanasiés au début de la période claire (*Zeitgeber time 2*, ZT 2) présentent une activation des neurones à MCH, mais pas s'ils sont décapités au début de la période sombre (ZT 14) (Harthoorn *et al.*, 2005).

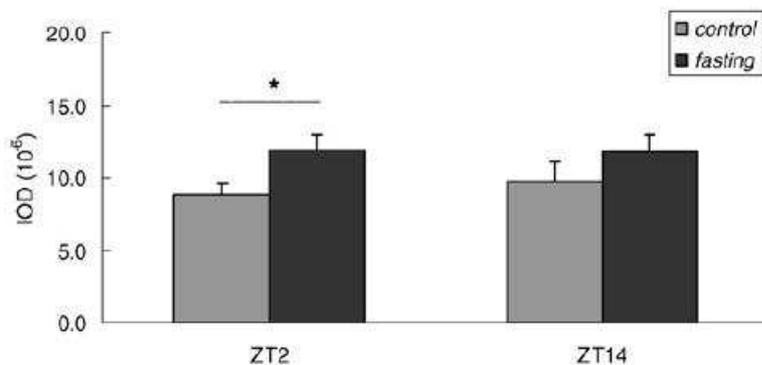


Figure 44. Effet du jeûne sur l'expression moyenne (+ ESM) d'ARNm de MCH à deux moments différents du cycle circadien (Harthoorn *et al.*, 2005, fig. 2, p. 1216).

Chez la souris, plusieurs études ont montré une élévation de l'expression des taux d'ARNm de MCH après un jeûne de 24h (Georgescu *et al.*, 2005) et ce, avec la même ampleur chez des sujets obèses et sains (Qu *et al.*, 1996). Une autre étude montre une augmentation marquée des taux d'ARNm de MCH après une privation complète de nourriture durant 48h (Kokkotou *et al.*, 2001).

4. Expériences de privation/restriction alimentaire

A partir des différentes études présentées ci-dessus, nous avons soumis nos WT et KO MCHR1 à une privation alimentaire aiguë de 24h ainsi qu'à une restriction prolongée de 15 jours. Dans les deux types d'expérience, les animaux ont reçu de l'amphétamine et l'activité locomotrice a été mesurée. Pour les expériences de restriction alimentaire chronique, les WT et KO MCHR1 ont été testés dans le paradigme de préférence de lieu conditionné (CPP) afin de mesurer l'impact du régime sur les effets renforçants de la drogue.

4.1. Expérience n°1 : privation aiguë de nourriture¹

1. Matériel et protocole

Le but de cette expérience est de déterminer si une privation totale de nourriture pendant 24h agit sur la réponse locomotrice suivant l'administration aiguë d'amphétamine (3 mg/kg). Pour ce faire, la moitié des animaux ont été privés de nourriture la veille de l'expérience. L'autre moitié continuait à avoir accès à la nourriture *ad libitum* (au total N=160). Une fois injectés, les animaux étaient placés dans des activomètres durant 100 minutes (pour plus de détails concernant l'appareil, voir Tyhon *et al.*, 2006).

Ce protocole expérimental a été répété deux fois supplémentaires avec un délai d'une semaine entre les sessions de test afin de mesurer l'expression éventuelle d'une sensibilisation comportementale à l'amphétamine.

2. Hypothèses de travail

La dose d'amphétamine de 3 mg/kg a été choisie car, en aigu, elle produit une stimulation plus importante chez les KO MCHR1 (Smith *et al.*, 2005, 2008; Tyhon *et al.*, 2008a). Nous nous attendons donc à répliquer ce résultat chez les groupes n'ayant pas subi la privation alimentaire. Néanmoins, en ce qui concerne le traitement chronique, aucune différence significative entre les génotypes ne devrait apparaître au niveau du développement d'une éventuelle sensibilisation comportementale (Tyhon *et al.*, 2008a).

¹ Données acquises dans le cadre du mémoire de Mlle Annabelle Geuzaine.

Chez les groupes privés de nourriture, nous devrions observer une différence entre les génotypes dans la mesure où l'activité des neurones à MCH augmente à la suite d'un changement de régime (Georgescu *et al.*, 2005; Kokkotou *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 1996). Ainsi, les WT devraient être plus affectées par la privation et présenter des scores locomoteurs plus élevés suite à l'injection d'amphétamine.

3. Analyses statistiques

Lors de l'injection aiguë d'amphétamine, les données locomotrices de chaque génotype séparément ont été représentées sous deux formes. D'une part, le décours temporel de l'activité sur les 100 minutes de session (5 tranches de 20 minutes) a été analysé avec une ANOVA en mesures répétées (2 traitements x 2 régimes x 5 décours temporel). D'autre part, les scores locomoteurs totaux ont été analysés avec une ANOVA double toujours par génotype (2 traitements x 2 régimes).

Les données comportementales relatives à la répétition des injections d'amphétamine à une semaine d'intervalle ont été analysées avec une ANOVA à mesures répétées (2 traitements x 2 régimes x 3 sessions) sur les trois sessions en séparant les génotypes.

4. Résultats

L'expérience de privation aiguë de nourriture (24h) chez les souris WT et KO MCHR1 n'a pas mis en évidence une augmentation de la locomotion suite à l'injection de 3 mg/kg d'amphétamine. A contrario, les analyses mettent en évidence une diminution significative des scores locomoteurs chez les KO soumises au jeûne en comparaison à celles nourries normalement (Figure 45).

Les analyses statistiques mettent en évidence chez les WT un effet principal du traitement ($F_{(1,76)} = 102,66$; $P < 0,0001$), du temps ($F_{(4,304)} = 23,28$; $P < 0,0001$) et un effet d'interaction temps x traitement ($F_{(4,304)} = 23,56$; $P < 0,0001$). Chez les KO, les résultats indiquent comme étant significatif l'effet principal du traitement ($F_{(1,76)} = 174,50$; $P < 0,0001$), du temps ($F_{(4,304)} = 30,27$; $P < 0,0001$), et les effets d'interaction traitement x régime ($F_{(1,76)} = 6,08$; $P = 0,01$), temps x traitement ($F_{(4,304)} = 30,27$; $P < 0,0001$) et temps x régime ($F_{(4,304)} = 3,78$; $P = 0,005$).

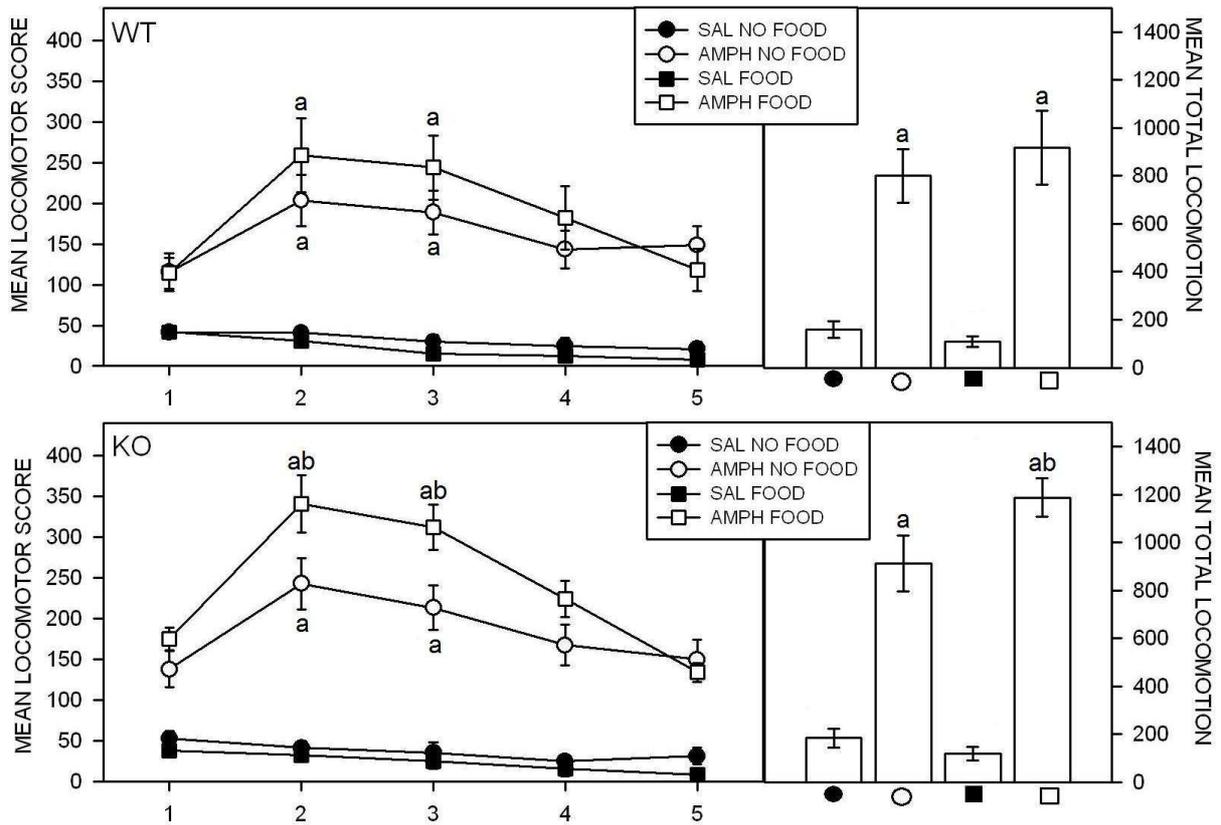


Figure 45. Décours temporel des scores locomoteurs moyens (\pm ESM) (panels de gauche, tranches de 20 min) et scores locomoteurs totaux (\pm ESM) (panels de droite) mesurés sur 100 minutes chez les WT et les KO MCHR1 ($n=20$ /groupe) lors de l’injection aigüe d’amphétamine (3 mg/kg). Différence significative à $P<0.05$. (a) différence significative avec le groupe salin correspondant, (b) différence significative avec le groupe « Food » ayant reçu l’amphétamine (données non publiées)¹.

Néanmoins, la répétition de la privation de nourriture la veille de l’expérience n’a pas potentialisé les scores locomoteurs chez aucun des génotypes, malgré le développement d’une sensibilisation comportementale pour l’amphétamine (Figure 46).

Les analyses statistiques effectuées sur les trois sessions par génotype montre chez les WT un effet principal du traitement ($F_{(1,76)}=164,71$; $P<0,0001$), de la session ($F_{(2,152)}=4,29$; $P=0,015$) et un effet d’interaction session x traitement ($F_{(2,52)}=13,94$; $P<0,0001$). Chez les KO, un effet principal du traitement ($F_{(1,76)}=147,43$; $P<0,0001$), de la session ($F_{(2,152)}=251$; $P<0,0001$), et des effets d’interaction traitement x régime ($F_{(1,76)}=5,18$; $P<0,0001$), session x traitement ($F_{(2,152)}=141,66$; $P<0,0001$) et session x traitement x régime ($F_{(2,152)}=5,20$; $P=0,006$) sont observés.

¹ Données acquises dans le cadre du mémoire de Mlle Annabelle Geuzaine.

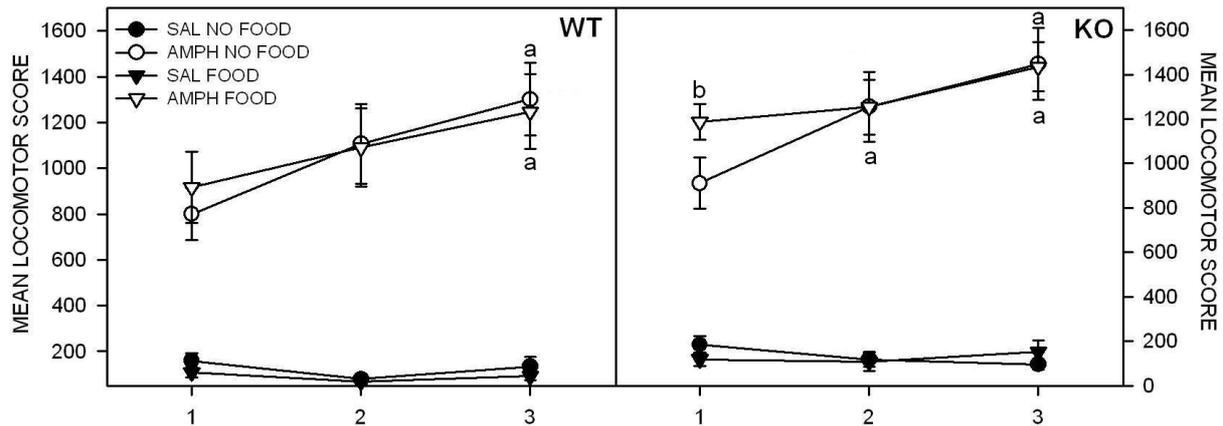


Figure 46. Scores locomoteurs moyens (\pm ESM) des trois sessions espacées d'une semaine chez les WT (panel gauche) et les KO MCHR1 (panel droit) testés sous salin (SAL) ou sous amphétamine (AMPH, 3 mg/kg) et privés ou non de nourriture (NO FOOD et FOOD respectivement) (n=20/groupe). Différence significative à $P < 0.05$. (a) différence significative avec les valeurs de la première session et (b) différence significative avec les valeurs de l'autre groupe ayant reçu l'amphétamine pour la première session (données non publiées)¹.

5. Discussion

En résumé, il apparaît donc qu'une privation de nourriture de courte durée (24h) ne produise pas l'effet potentialisant escompté sur les scores locomoteurs des animaux testés sous amphétamine, même à plusieurs reprises. Chez les KO, un effet délétère sur l'activité locomotrice est même remarqué pour la première session. Cet effet pourrait être expliqué en partie par le fait que la privation totale de nourriture ait provoqué un affaiblissement des capacités locomotrices plus marqué chez les KO MCHR1 qui sont hyperphagiques et brûlent en moyenne plus de calories que leurs comparses WT (Chen *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 2002).

Le fait qu'aucune potentialisation, même légère, de la locomotion ne soit observée après une (courte) période de jeûne rejoint le manque d'homogénéité des expériences *in vitro* sur l'activité de la MCH. Les études démontrant une potentialisation des effets des drogues d'abus portent sur une privation plus longue de nourriture (Carr, 2002, 2007).

6. Conclusions

L'activation de la MCH par une privation aiguë de nourriture ne semble pas être suffisante pour produire une différence de comportement entre les deux génotypes étudiés ici. Une privation/restriction plus longue de nourriture entraînant une perte de poids significative pourrait déclencher une activité neuronale plus importante.

¹ Données acquises dans le cadre du mémoire de Mlle Annabelle Geuzaine.

4.2. Expérience n°2 : restriction chronique de nourriture

1. Matériel et protocole

Afin d'étudier l'impact d'un régime entraînant une perte de poids significative sur les effets stimulants et renforçants de l'amphétamine, les WT et KO MCHR1 ont été soumis à une restriction alimentaire de 15 jours et ont été testés dans l'appareil de préférence de lieu conditionné (CPP). Les doses de 0.75 et 2.25 mg/kg ont été choisies en fonction de l'étude détaillée dans le chapitre précédent (Tyhon *et al.*, 2008b).

Les différents groupes expérimentaux se répartissent en deux groupes principaux (cf. tableau ci-dessous). Le premier est soumis à un régime débutant cinq jours avant le début de l'expérience et ce, afin que les animaux aient perdu du poids de manière significative par rapport au second groupe, pour lequel la nourriture reste *ad libitum* tout au long de l'expérience. Les animaux sont pesés tous les jours et la ration de nourriture accordée quotidiennement est calculée de manière à ce que le poids de chaque animal se situe entre 80 et 85% du poids initial enregistré la veille du régime. Chaque groupe principal, appelé « Food » et « No Food », se divise en six sous-groupes, comprenant les deux génotypes ainsi que la dose d'amphétamine injectée en i.p. (salin, 0.75 et 2.25 mg/kg).

Régime	Génotype	Dose
Food	WT	0 mg/kg
		0.75 mg/kg
		2.25 mg/kg
	KO	0 mg/kg
		0.75 mg/kg
		2.25 mg/kg
No Food	WT	0 mg/kg
		0.75 mg/kg
		2.25 mg/kg
	KO	0 mg/kg
		0.75 mg/kg
		2.25 mg/kg

Le protocole expérimental est identique à celui utilisé pour l'expérience présentée dans le chapitre précédent (Tyhon *et al.*, 2008b), excepté le fait que nous avons effectué six pairages (au lieu de quatre) avec les différentes doses d'amphétamine un jour sur deux afin d'étudier le développement d'une sensibilisation comportementale.

Nous avons également effectué un test de préférence sous soluté salin le jour suivant le dernier pairing. Sur base de l'étude de Dockstader & van der Kooy (2001), nous avons aussi testé la préférence conditionnée sous amphétamine. Cette étude montre que les souris de souche 129/SvJ expriment une réponse de renforcement plus efficacement si elles sont injectées préalablement avec la même dose de drogue que celle de la phase de conditionnement. L'ordre de passage entre les deux tests est contrebalancé entre les animaux.

2. Hypothèses de travail

Pour les groupes qui ne seront pas soumis au régime, nous nous attendons à répliquer les résultats concernant le développement d'une légère sensibilisation comportementale chez les KO MCHR1 à 0.75 mg/kg, ainsi qu'une absence de différence entre les génotypes pour les réponses de renforcement pour le compartiment associé avec l'administration de l'amphétamine.

Pour les groupes soumis à la restriction alimentaire, il serait logique que les WT présentent une activité locomotrice de base plus importante dans la mesure où l'activation de la MCH induite par la diminution des stocks adipeux motive le comportement de recherche de nourriture (Bear, Connors & Paradisio, 2002). De plus, cette activité éventuellement plus élevée chez les WT devrait également être potentialisée chez les groupes recevant l'amphétamine.

En ce qui concerne les réponses de renforcement, il a été montré que la privation de nourriture renforçait l'aspect hédonique de certaines doses d'amphétamine dans le CPP (Stuber *et al.*, 2002). De plus, une étude a montré que des souris 129X1 recommençaient à consommer de la cocaïne après une période de sevrage à la suite d'une privation alimentaire (1 et 22h) (Highfield *et al.*, 2002). En résumé, vu que la MCH ne semble pas intervenir dans les réponses de renforcement évaluées dans le CPP (Tyhon *et al.*, 2008b), nous devrions néanmoins observer une différence entre les groupes selon qu'ils aient été soumis à un régime chronique ou non.

3. Analyses statistiques

Avant le début de l'expérience, la moitié des animaux ont été soumis à une restriction alimentaire (groupe NO FOOD). Les données relatives au poids des animaux durant les cinq premiers jours de régime ont été analysées avec une ANOVA en mesures répétées (2 génotypes x 2 régimes x 5 jours). Une fois l'expérience commencée, les poids des animaux étaient toujours mesurés quotidiennement et les données ont à nouveau été traitées avec une ANOVA en mesures répétées (2 génotypes x 2 régimes x 15 jours).

Le premier jour d'expérience (phase de pré-exposition), les animaux ont accès l'entièreté de l'appareil. Les données relatives au temps passé dans les deux compartiments principaux ont été analysées avec une ANOVA en mesures répétées (2 génotypes x 2 compartiments), en séparant les types de régime (FOOD versus NO FOOD). Les données de l'activité locomotrice le premier jour d'expérience ont également été enregistrées et analysées avec une ANOVA double (2 génotypes x 2 régimes).

Le lendemain de la phase de pré-exposition, la phase de conditionnement avec l'amphétamine débute. Les données brutes ont été analysées via des ANOVAs en mesures répétées par groupe séparément (3 doses x 6 sessions). Les pentes de régression relatives à l'ampleur de la courbe de sensibilisation (*slopes*) sont représentées graphiquement dans les inserts de chaque graphique et ont été analysées avec des ANOVAs simples.

A la fin du traitement chronique à l'amphétamine, la session test est réalisée durant laquelle les animaux ont de nouveau libre accès à l'entièreté de l'appareil. Dans cette expérience, deux tests ont été effectués, l'un sous soluté salin et l'autre, sous amphétamine. Les données brutes de temps passé dans le compartiment associé à la drogue des deux tests ont été analysées avec le même type de statistiques, à savoir des ANOVAs doubles (3 doses x 2 régimes). D'autres indices ont été calculés, tels que le score delta (temps passé dans le compartiment associé à la drogue le jour du test moins le temps passé dans le même compartiment le jour de pré-exposition) et le score ratio (pourcentage de temps passé le jour du test dans le compartiment associé à la drogue par rapport au temps passé dans les deux compartiments principaux ($A/A+B$)). Ces deux indices ne seront pas présentés graphiquement car, les analyses statistiques n'indiquaient pas des résultats différents de celles effectuées sur les données brutes.

4. Résultats

La figure ci-dessous représente les poids moyens des différents groupes testés. L'impact de la restriction alimentaire se remarque dès les premiers jours au niveau du poids des animaux. Cette différence se stabilise au bout du cinquième jour et perdure de manière relativement constante durant la durée de l'expérience dans le CPP. La perte de poids s'effectue de manière similaire chez les deux génotypes.

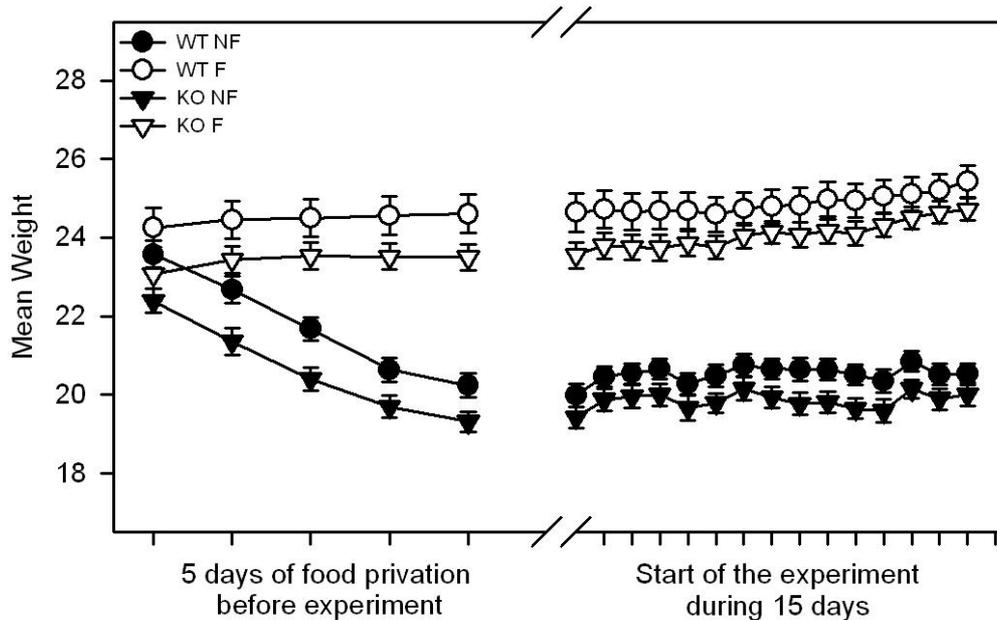


Figure 47. Poids moyens (\pm SEM) des différents groupes WT et KO MCHR1 soumis à un régime (« NF » pour No Food) ou pas (« F » pour Food) ($n=48/\text{groupe}$). La partie gauche de la figure représente le début de la restriction alimentaire cinq jours avant le début de l'expérience. La partie droite représente les poids moyens durant les 15 jours d'expérience dans le CPP.

Les analyses statistiques effectuées sur les données des cinq premiers jours de régime met en évidence un effet principal du génotype ($F_{(1,188)}=9.48$; $P=0.002$), du régime ($F_{(1,188)}=11.74$; $P<0.001$) et de la session ($F_{(4,188)}=77.6$; $P<0.0001$), ainsi qu'une interaction régime x session ($F_{(4,188)}=260,1$; $P<0.0001$). Les analyses statistiques effectuées sur les jours d'expérience montrent les mêmes effets significatifs (principal du génotype ($F_{(1,188)}=5.2$; $P=0.023$), du régime ($F_{(1,188)}=176.4$; $P<0.0001$) et de la session ($F_{(14,188)}=28.9$; $P<0.0001$) et une interaction régime x session ($F_{(14,188)}=14.77$; $P<0.0001$).

Le premier jour de test, l'exposition à l'appareil avec un libre accès aux trois compartiments met en évidence une préférence spontanée pour le compartiment strié chez l'ensemble des animaux nourris *ad libitum* (Figure 48, partie droite). L'ANOVA en mesures répétées effectuée sur le temps passé dans les deux compartiments principaux montre un effet principal de la session significatif ($F_{(1,94)}=36.5$; $P<0.0001$).

Chez les animaux mis au régime depuis quelques jours, seuls les KO présentent une préférence spontanée pour le compartiment plus sombre (partie gauche de la figure 48). L'ANOVA indique un effet principal de la session significatif ($F_{(1,94)}=7.66$; $P=0.006$). Néanmoins, d'un point de vue qualitatif, la différence de temps passé entre les deux compartiments apparaît être moins grande lorsque les animaux sont sous régime.

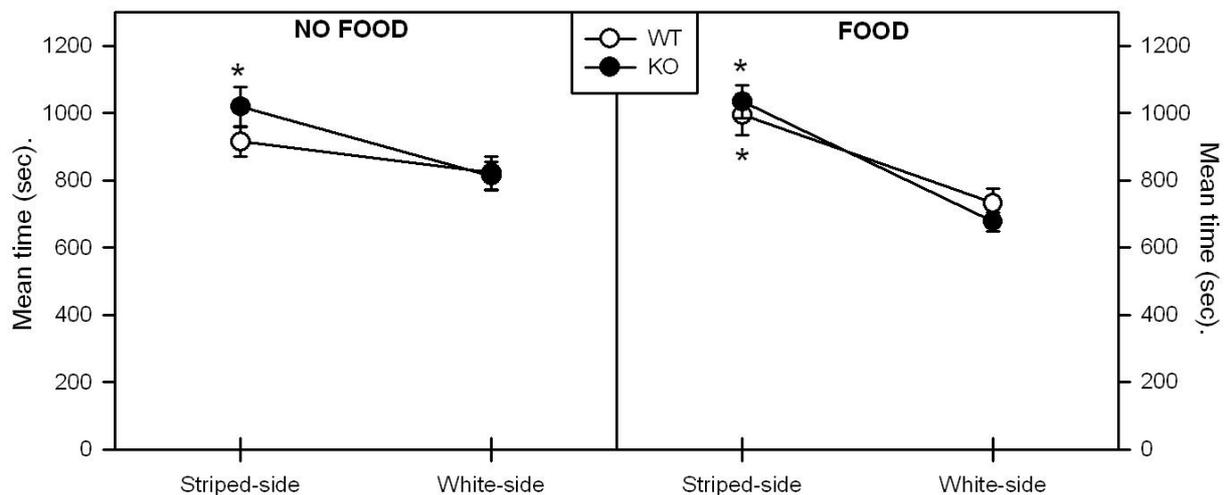


Figure 48. Session de pré-exposition sous soluté salin durant laquelle la préférence relative (\pm ESM) pour chacun des deux compartiments principaux de l'appareil est évalué chez les WT et KO MCHR1 soumis au régime (panel gauche) ou pas (panel droit) ($n=48$ /groupe). (*) : différence sign. entre les valeurs du compartiment strié (Striped side) et du compartiment blanc (White side) à minimum $P<0.05$.

En ce qui concerne l'activité locomotrice, les KO sont plus actives que les WT chez les groupes nourris normalement, ce qui a déjà été observés dans d'autres études. Par contre, lorsque les animaux sont mis au régime, cette différence de génotype disparaît (effet principal du génotype : $F_{(1,188)}=5.9$; $P=0.015$). Un effet du régime est observé entre les groupes KO, le groupe *food* étant plus actif que le groupe *no food* (Figure 49).

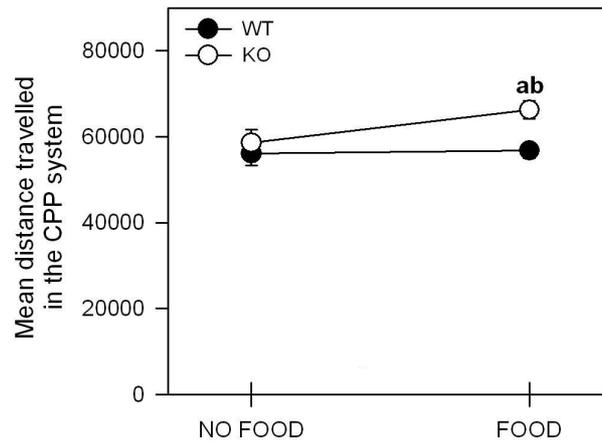


Figure 49. Activité locomotrice moyenne (\pm ESM) induite par l'exposition à un nouvel environnement chez les WT et KO MCHR1 durant 40 minutes sous soluté salin ($n=48$ /groupe). Différence statistique significative à $P<0.05$. (a) : différence entre les génotypes recevant le même régime, (b) : différence entre les types de régime pour un même génotype (données non publiées).

Le lendemain de la phase de pré-exposition, la phase de conditionnement avec l'amphétamine débute (Figure 50). Pour les groupes qui n'ont pas été mis au régime (*ad libitum* groups), une sensibilisation comportementale est observée pour la dose de 2.25 mg/kg chez les deux génotypes. Chez les KO, une légère sensibilisation se développe également pour la dose plus faible de 0.75 mg/kg, corroborant ainsi les résultats des expériences précédentes avec ces doses (Tyhon *et al.*, 2008a, 2008b).

Pour les WT *ad libitum*, les statistiques indiquent un effet principal du traitement ($F_{(2,45)}=40,11$; $P<0,0001$), de la session ($F_{(1,45)}=30,1$; $P<0,0001$) et un effet d'interaction session x traitement ($F_{(2,45)}=20,31$; $P<0,0001$). Chez les KO *ad libitum*, les mêmes effets significatifs sont observés, à savoir un effet principal du traitement ($F_{(2,45)}=30,44$; $P<0,0001$), de la session ($F_{(1,45)}=56,63$; $P<0,0001$), et un effet d'interaction session x traitement ($F_{(2,45)}=28,76$; $P<0,0001$). En ce qui concerne les *slopes*, les analyses statistiques ont mis en évidence un effet principal du traitement chez les deux génotypes (WT : $F_{(2,45)}=20,22$; $P<0,0001$ et KO : $F_{(2,45)}=26,28$; $P<0,0001$).

En ce qui concerne les groupes mis au régime (*food shortage groups*), il apparaît clairement que les deux doses d'amphétamine produisent une sensibilisation comportementale et ce, chez les deux génotypes. Néanmoins, l'ampleur de la sensibilisation à 0.75 mg/kg est plus marquée chez les KO, car les *slopes* de ces derniers pour cette dose diffèrent de celles du groupe salin, ce qui n'est pas le cas chez les WT.

Il apparaît également que les KO MCHR1 du groupe salin présentent également une sensibilisation de leurs scores locomoteurs au bout du sixième pairage, reflétant une sorte d'« anorexie nerveuse » (*activity-based anorexia*) qui se développe lors de privation chronique (et sévère) de nourriture sans administration de substance stimulante (de Rijke *et al.*, 2005; Routtenberg & Kuznesof, 1967).

Chez les WT mises au régime, les statistiques montrent un effet principal du traitement ($F_{(2,45)}=10,52$; $P<0,0001$), de la session ($F_{(1,45)}=46,2$; $P<0,0001$) et un effet d'interaction session x traitement ($F_{(2,45)}=5,74$; $P<0,0001$). Chez les KO MCHR1, les mêmes effets significatifs sont observés, à savoir un effet principal du traitement ($F_{(2,45)}=15,08$; $P<0,0001$), de la session ($F_{(1,45)}=104$; $P<0,0001$), et un effet d'interaction session x traitement ($F_{(2,45)}=10,58$; $P<0,0001$). En ce qui concerne les *slopes*, les ANOVAs simples ont mis en évidence un effet principal du traitement à la fois chez les WT ($F_{(2,45)}=7,25$; $P<0,0001$) et chez les KO ($F_{(2,45)}=8,94$; $P<0,0001$).

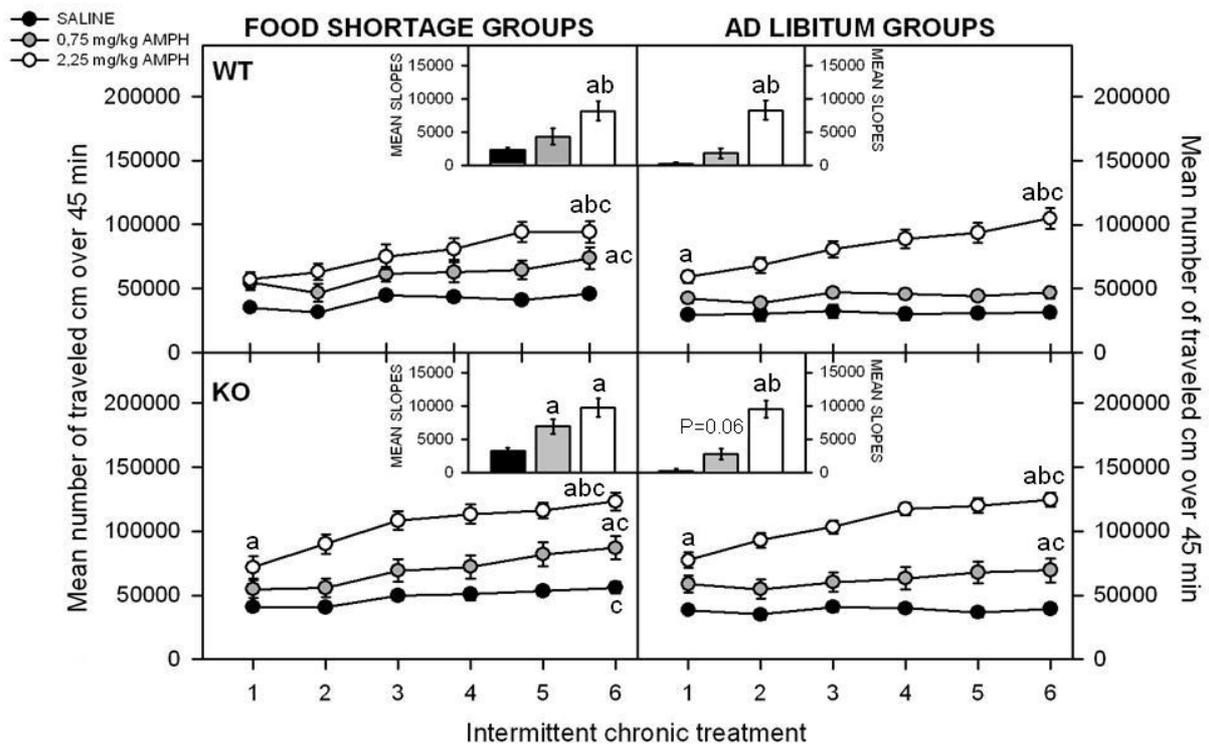


Figure 50. Effets psychomoteurs (\pm ESM) induits par six injections de différentes doses d'amphétamine effectuées un jour sur deux chez les WT (panels du haut) et les KO MCHR1 (panels du bas). Les groupes soumis au régime chronique sont représentés dans les panels de gauche (*Food shortage*) et ceux dont l'alimentation n'a pas été modifiée se trouvent dans les panels de droite (*Ad libitum*) ($n=16$ /groupe). Différence statistique significative à $P<0.05$. (a) : différence significative avec les valeurs du groupe salin, (b) différence significative avec les valeurs de l'autre groupe recevant l'amphétamine et (c) différence significative avec les valeurs de la première session (données non publiées).

Le lendemain et le surlendemain, les deux tests de préférence sont effectués, sous salin et sous amphétamine, respectivement. Les données sont présentées ici en termes de temps passé dans le compartiment associé à l'administration de la drogue.

Lors du test de préférence réalisé sous soluté salin, il ressort que la privation de nourriture potentialise légèrement, mais de manière significative, l'effet renforçant exprimé par les WT (panel gauche de la figure 51). En effet, les WT au régime passent significativement plus de temps dans le compartiment précédemment associé à l'amphétamine par rapport aux WT qui n'ont pas été mises au régime. De plus, cette légère potentialisation se marque plus pour la dose de 0.75 mg/kg en comparaison à la dose de 2.25 mg/kg.

Chez les KO par contre, les deux doses d'amphétamine induisent une préférence de lieu, mais pas de manière différente selon le type de régime ou la dose reçus. En effet, aucune différence n'est observée entre les groupes *Food shortage* et *Food ad libitum*, ni entre les doses administrées durant la phase de conditionnement (panel droit).

Les résultats montrent chez les WT un effet principal significatif de la dose ($F_{(2,90)}=51,35$; $P<0,0001$) et une interaction dose x régime significative également ($F_{(2,90)}=8,07$; $P<0,0001$). A contrario, l'analyse des données relatives aux KO ne montre qu'un effet principal significatif de la dose ($F_{(2,90)}=19,8$; $P<0,0001$).

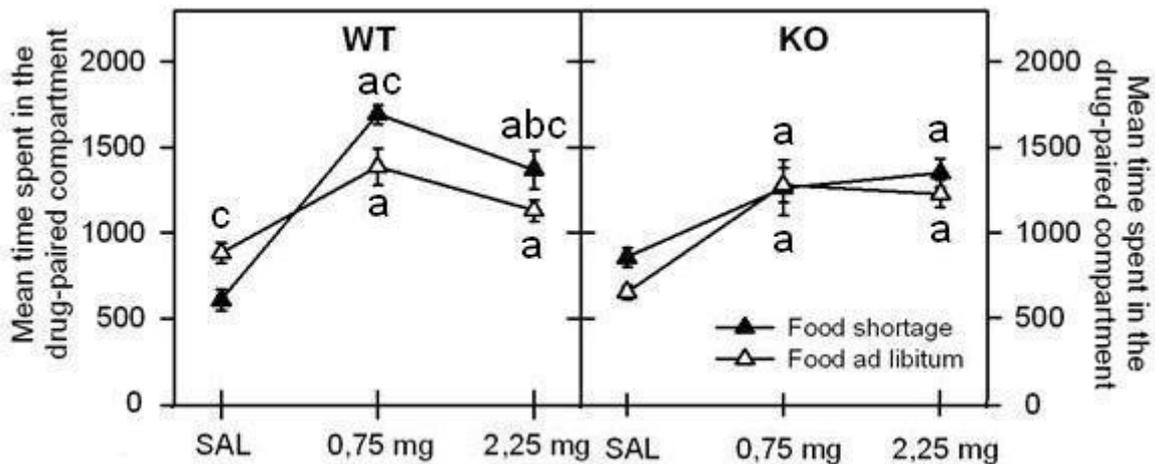


Figure 51. Préférence de lieu conditionnée mesurée sous soluté salin induite par différentes doses d'amphétamine chez les WT et les KO MCHR1 soumis au régime (*Food shortage*) ou non (*Food ad libitum*) (n=16/groupe). La préférence est exprimée en termes de temps moyen (\pm ESM) passé dans le compartiment associé à la drogue durant la session de test. Différence statistique significative à $P<0,05$. (a) : différence significative avec les valeurs du groupe salin, (b) différence significative avec les valeurs de l'autre groupe recevant l'amphétamine pour le même type de régime et (c) différence significative avec les valeurs du groupe soumis à l'autre type de régime pour la même dose d'amphétamine (données non publiées).

Lors du test de préférence effectué sous amphétamine, les différents groupes reçoivent la même dose que lors des sessions de pairages, à l'exception des groupes contrôles auxquels du soluté salin est toujours administré.

Au niveau de la réponse de renforcement exprimée par les WT, il apparaît qu'elles présentent un renforcement plus marqué pour la dose de 0.75 mg/kg lorsqu'elles sont soumises à un régime (Figure 52, panel de gauche). Chez les KO MCHR1, la privation chronique de nourriture n'induit toujours pas une réponse de renforcement plus forte, même sous l'effet de l'amphétamine (panel de droite).

Les statistiques indiquent chez les WT un effet principal significatif du régime ($F_{(1,90)}=7,36$; $P<0,0001$), de la dose ($F_{(2,90)}=30,87$; $P<0,0001$) et une interaction dose x régime significative également ($F_{(2,90)}=3,89$; $P<0,0001$). Concernent les données comportementales des KO, seul l'effet principal de la dose est significatif ($F_{(2,90)}=11,89$; $P<0,0001$).

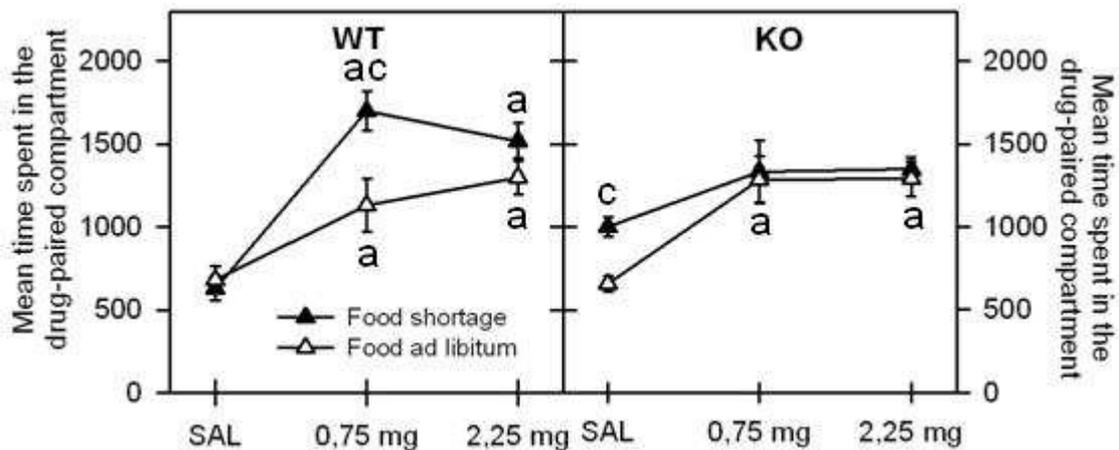


Figure 52. Préférence de lieu conditionnée mesurée sous amphétamine chez les WT et les KO MCHR1 soumis au régime (*Food shortage*) ou non (*Food ad libitum*) (n=16/groupe). La préférence est exprimée en termes de temps moyen (\pm ESM) passé dans le compartiment associé à la drogue durant la session de test. Différence statistique significative à $P<0,05$. (a) : différence significative avec les valeurs du groupe salin, (b) différence significative avec les valeurs de l'autre groupe recevant l'amphétamine pour le même type de régime et (c) différence significative avec les valeurs du groupe soumis à l'autre type de régime pour la même dose d'amphétamine (données non publiées).

5. Discussion

Lors de la phase d'habituation, l'activité locomotrice basale observée chez les KO est moins élevée si les animaux sont sous régime, mais pas chez les WT. Il se peut qu'après quelques jours de régime, les souris KO soient plus affectées physiquement par la privation, vu qu'elles dépensent plus d'énergie à la base (Chen *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 2002). De plus, on observe que les souris mises au régime passent globalement moins de temps dans le compartiment strié par rapport à l'autre compartiment principal, même si la différence entre les deux est significative pour les KO. Il semble donc que la restriction atténue cette préférence spontanée, reflétant un niveau d'anxiété moins marqué. D'autres tests d'anxiété plus pertinents sont nécessaires afin de confirmer cette tendance.

Au vu des résultats des groupes *Food ad libitum* de cette expérience de CPP sous amphétamine, nous pouvons dire que les effets obtenus dans l'étude précédente sont répliqués (Tyhon *et al.*, 2008b). En effet, les doses d'amphétamine induisent une sensibilisation comportementale chez les deux génotypes, avec un effet légèrement plus marqué pour 0.75 mg/kg chez les KO MCHR1. De plus, les deux génotypes passent significativement plus de temps dans le compartiment associés avec les deux doses testées, reflétant l'expression d'un renforcement.

En ce qui concerne l'impact de la restriction alimentaire chronique, il apparaît qu'il n'affecte pas les effets produits par la dose d'amphétamine 2.25 mg/kg. En effet, tous les groupes présentent une sensibilisation comportementale pour cette dose, quel que soit le régime (ou le génotype). Par contre, une légère potentialisation des effets locomoteurs induits par l'injection répétée de 0.75 mg/kg est observée, et ce, de façon légèrement plus marquée chez les KO MCHR1, comme en témoignent les analyses statistiques effectuées sur les pentes de régression individuelles.

Pour ce qui est de l'effet renforçant de l'amphétamine, seules les WT semblent être sensibles à l'effet d'un régime chronique. De fait, lorsqu'elles sont testées sous soluté salin, les WT présentent une préférence conditionnée plus marquée si elles sont au régime, et ce, quelle que soit la dose employée. Une fois testées sous l'effet de l'amphétamine, cette potentialisation des effets renforçants n'apparaît plus que pour la dose de 0.75 mg/kg. Chez les KO, par contre, aucun effet de ce genre n'est observé. Les KO présentent une réponse de renforcement, mais sans distinction quant au régime reçu les jours précédents.

6. Conclusions

Les différents résultats de cette étude permettent de dire que l'axe MCH/MCHR1 est activé par la restriction chronique de nourriture, étant donné que seules les WT sont renforcées par l'amphétamine de manière plus importante. Néanmoins, l'absence du récepteur induit des effets locomoteurs plus importants pour les faibles doses d'amphétamine et ce, surtout lors du régime. Ces résultats reflètent probablement l'inhibition spécifique que la MCH exerce sur les mécanismes de la locomotion induite par les faibles doses d'amphétamine (Smith *et al.*, 2005, 2008, Tyhon *et al.*, 2008b). Ces effets seraient donc légèrement exacerbés durant une longue période de restriction alimentaire.

Il est également possible que le phénotype hyperphagique des KO MCHR1 produise, sous un régime de longue durée, une augmentation de l'activité de base (en l'absence de drogue). De fait, durant les phases de pairage, le groupe contrôle KO mis au régime ne s'habitue pas et présente même une sensibilisation comportementale envers le contexte de testing à la fin des sessions alors qu'il ne reçoit que du soluté salin. Ainsi, cette sorte d'« anorexie nerveuse » pourrait être à la base d'une locomotion plus importante chez les KO traités sous de faibles doses d'amphétamine.

En résumé, ces résultats suggèrent une implication de l'hormone MCH et de son récepteur dans l'augmentation des effets comportementaux des drogues d'abus par la restriction prolongée de nourriture.

4.3. Expérience n°3 : restriction chronique de nourriture avant l'expérience

La restriction de nourriture peut également être considérée comme un stress (Adam & Epel, 2007; Nieuwenhuizen & Rutters, 2008; Piazza & Le Moal, 1996). Dans une étude évaluant différentes formes de stress, Georgescu et collègues (2005) ont montré que seule la privation de nourriture augmentait l'activité des neurones à MCH au sein de l'hypothalamus (Figure 53).

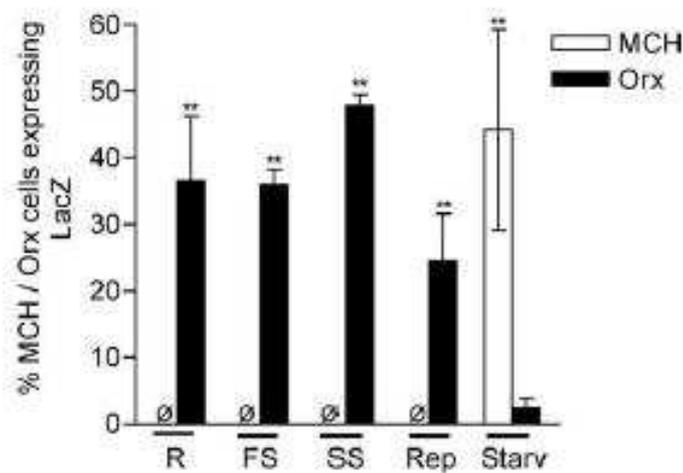


Figure 53. Activité moyenne (\pm SEM) des neurones à MCH ou orexine (Orx) après différentes formes de stress : la rétention pendant 1h (R), des chocs électriques (FS, footshock stress), le stress social (SS), des stress répétés imprédictibles (Rep) et la privation de nourriture pendant 24h (Starv). (Georgescu *et al.*, 2005, fig. 7, p. 2938).

1. Matériel et protocole

En nous basant sur cette observation et en utilisant le protocole de l'étude de Cabib et collègues (2000), nous avons soumis les WT et KO MCHR1 à une phase prolongée de restriction alimentaire (12 jours avec 80% du poids corporel). Nous avons ensuite rendu l'accès à la nourriture *ad libitum* durant 3 jours avant de tester les animaux dans le CPP sous amphétamine (0.75 et 2.25 mg/kg). Le protocole expérimental ainsi que les analyses statistiques utilisés sont identiques à ceux de l'expérience décrite ci-dessous. Ainsi, la seule différence entre les deux études réside dans la phase de régime (avant ou durant l'expérience).

2. Hypothèse de travail

Etant donné que l'activité des neurones à MCH augmente face à certains stress et qu'une restriction alimentaire de longue durée est considérée comme expérience anxiogène, il est possible qu'une différence comportementale apparaisse entre les deux génotypes suite à l'injection d'amphétamine. De plus, dans d'autres tests comportementaux plus valide pour mesurer l'anxiété, les KO apparaissent être moins anxieuses en général (Roy *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). Ainsi, pour les groupes ayant été mis au régime avant l'expérience, les WT pourraient présenter des réponses locomotrices et/ou de renforcement exacerbées suite au stress subi durant cette phase de régime préalable.

3. Résultats

Lors du traitement chronique avec les différentes doses d'amphétamine, une sensibilisation comportementale se développe au fur et à mesure des jours de traitement, mais de manière similaire chez tous les groupes (Figure 54).

Chez les WT, les analyses statistiques mettent en évidence des effets principaux de la dose et de la session, ainsi que l'interaction dose x session, quelque soit le régime (NO FOOD : $F_{(2,45)}=25,03$; $P<0,0001$, $F_{(1,45)}=26,6$; $P<0,0001$, $F_{(2,45)}=38,8$; $P<0,0001$ et FOOD : $F_{(2,45)}=48,7$; $P<0,0001$, $F_{(1,45)}=23,03$; $P<0,0001$, $F_{(2,45)}=32,5$; $P<0,0001$). Au niveau des pentes de régression individuelles (*slopes*), l'ANOVA simple met en évidence un effet principal de la dose (NO FOOD : $F_{(2,45)}=33,01$; $P<0,0001$ et FOOD : $F_{(2,45)}=27,59$; $P<0,0001$).

De manière similaire, l'analyse des données locomotrice durant le conditionnement avec l'amphétamine chez les KO montre un effet principal de la dose (NO FOOD : $F_{(2,45)}=39,5$; $P<0,0001$ et FOOD : $F_{(2,45)}=29,01$; $P<0,0001$), de la session (NO FOOD : $F_{(1,45)}=57,4$; $P<0,0001$ et FOOD : $F_{(1,45)}=56,8$; $P<0,0001$) et une interaction dose x session significative (NO FOOD : $F_{(2,45)}=30,1$; $P<0,0001$ et FOOD : $F_{(2,45)}=40,3$; $P<0,0001$). En ce qui concerne les *slopes*, l'effet principal de la dose est significatif pour les deux groupes (NO FOOD : $F_{(2,45)}=32,3$; $P<0,0001$ et FOOD : $F_{(2,45)}=38,7$; $P<0,0001$).

Ainsi, pour la dose de 2.25 mg/kg, le développement d'une sensibilisation est observée de manière similaire chez les deux génotypes et ce, quelque soit le régime reçu avant l'expérience. Néanmoins, pour la dose de 0.75 mg/kg, il apparaît que seuls les KO NO FOOD présentent une légère sensibilisation à la fin du traitement. L'ampleur de cette sensibilisation n'est pas marquée dans la mesure où la pente de régression moyenne (*slope*) de ce groupe ne diffère pas de celle du groupe salin ($P=0.12$ dans l'insert) et n'apparaît pas être différente de zéro (comparaison à un standard : $t_{(15)}=1,99$; $P=0.064$).

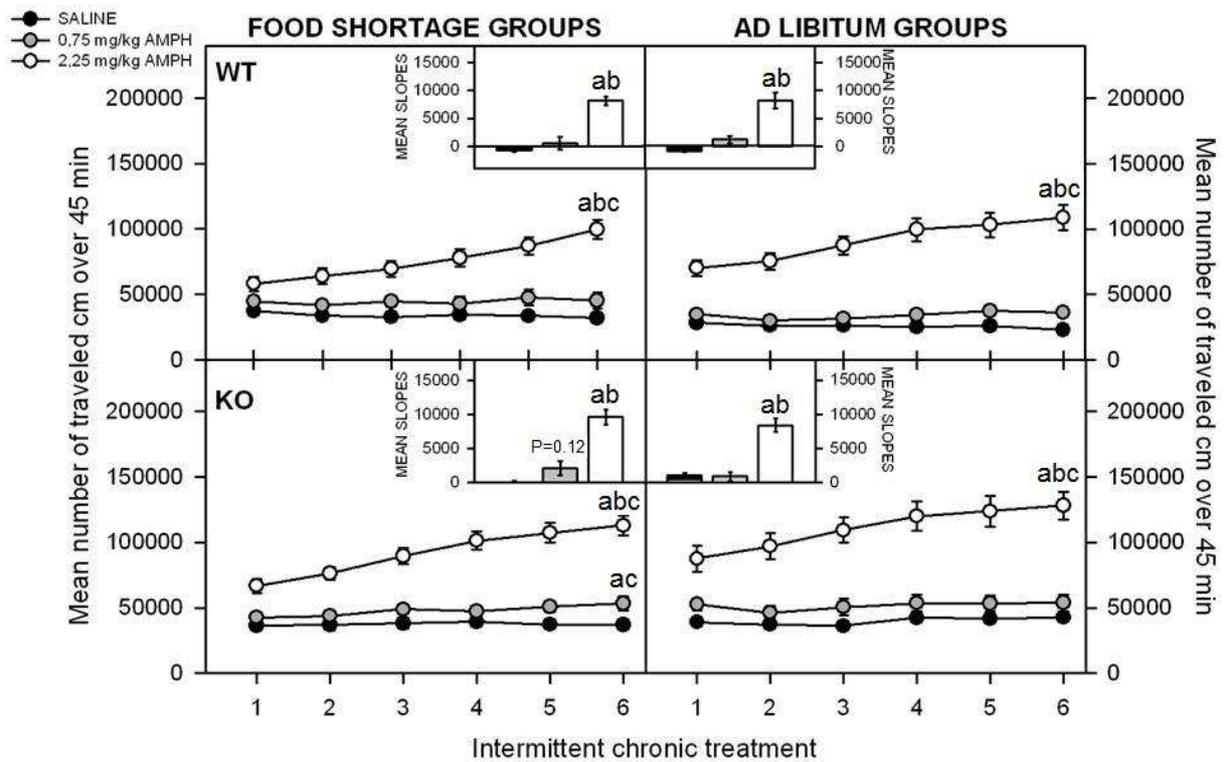


Figure 54. Effets psychomoteurs (\pm ESM) induits par six injections de différentes doses d'amphétamine effectuées un jour sur deux chez les WT (panels du haut) et les KO MCHR1 (panels du bas). Les groupes soumis au régime avant l'expérience sont représentés dans les panels de gauche (*Food shortage*) et ceux dont l'alimentation n'a pas été modifiée se trouvent dans les panels de droite (*Ad libitum*) ($n=16$ /groupe). Différence statistique significative à $P<0.05$. (a) : différence significative avec les valeurs du groupe salin, (b) différence significative avec les valeurs de l'autre groupe recevant l'amphétamine et (c) différence significative avec les valeurs de la première session (données non publiées).

Le lendemain et le surlendemain, les deux sessions de test ont été réalisées. Les résultats du test sous soluté salin ne permettent pas de mettre en évidence une influence du régime préalable à l'expérience (Figure 55). Les analyses statistiques effectuées par génotype montrent un effet principal de la dose (WT : $F_{(2,90)}=30,5$; $P<0,0001$ et KO : $F_{(2,90)}=26,6$; $P<0,0001$). En effet, pour les deux génotypes, quelque soit le régime, les groupes conditionnés avec l'amphétamine diffèrent de leur groupe salin respectif. Chez les WT FOOD, la dose de 0.75 mg/kg semble cependant être plus renforçante que celle de 2.25 mg/kg dans la mesure où les animaux passent en moyenne plus de temps dans le compartiment associé avec la dose de 0.75 mg/kg.

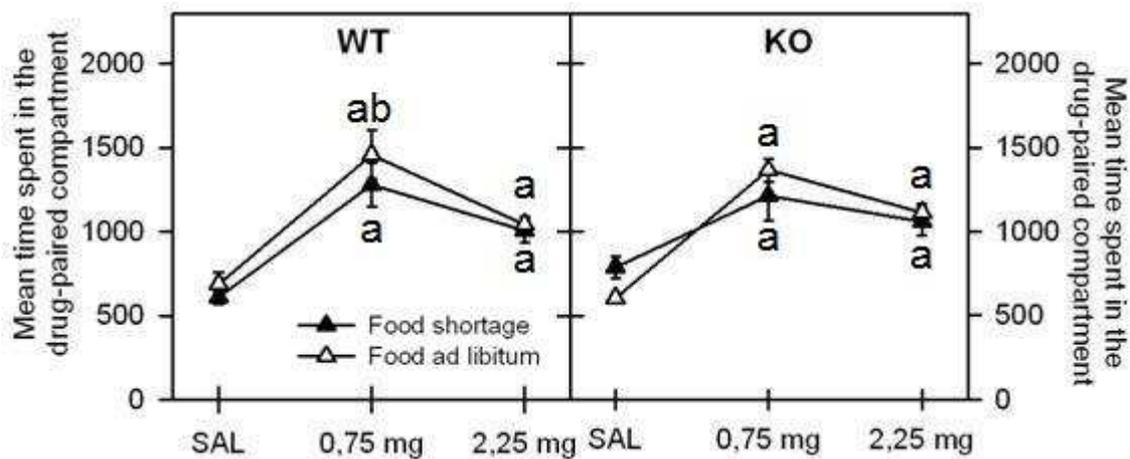


Figure 55. Préférence de lieu conditionnée mesurée sous soluté salin induite par différentes doses d'amphétamine chez les WT et les KO MCHR1 soumis au régime avant l'expérience (*Food shortage*) ou non (*Food ad libitum*) ($n=16$ /groupe). La préférence est exprimée en termes de temps moyen (\pm ESM) passé dans le compartiment associé à la drogue durant la session de test. Différence statistique significative à $P<0.05$. (a) : différence significative avec les valeurs du groupe salin, (b) différence significative avec les valeurs de l'autre groupe recevant l'amphétamine pour le même type de régime et (c) différence significative avec les valeurs du groupe soumis à l'autre type de régime pour la même dose d'amphétamine (données non publiées).

Enfin, les résultats du test réalisé sous amphétamine ne permettent pas de mettre en évidence un effet du régime préalable chez les WT (effet principal de la dose : $F_{(2,90)}=26,6$; $P<0,0001$) (Figure 56). De fait, les différentes doses testées ne sont pas plus renforçantes l'une que l'autre et diffèrent toutes du groupe salin, quelque soit le régime employé avant l'expérience.

Chez les KO, un effet du régime préalable est observé pour la dose de 0.75 mg.kg (effet principal de la dose : $F_{(2,90)}=21,6$; $P<0,0001$ et du régime : $F_{(1,90)}=7,07$; $P=0,009$). En effet, les deux doses employées diffèrent du groupe contrôle salin avec, en complément, une différence entre les groupes soumis au régime ou non (valeur P de la comparaison post hoc : $P=0,047$). Une tendance est également observée chez le groupe salin ($P=0,08$ sur le graphique).

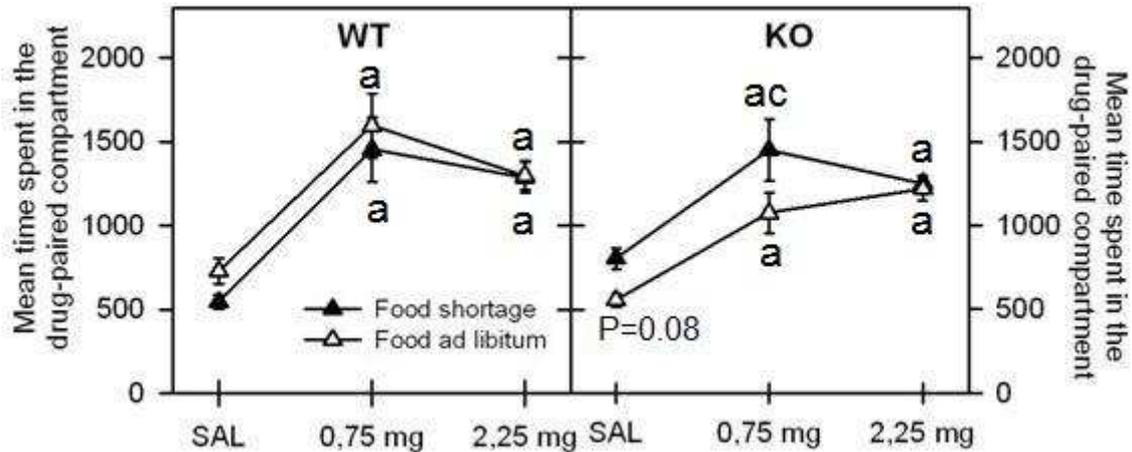


Figure 56. Préférence de lieu conditionnée mesurée sous amphétamine chez les WT et les KO MCHR1 soumis au régime (*Food shortage*) ou non (*Food ad libitum*) ($n=16$ /groupe). La préférence est exprimée en termes de temps moyen (\pm ESM) passé dans le compartiment associé à la drogue durant la session de test. Différence statistique significative à $P<0,05$. (a) : différence significative avec les valeurs du groupe salin, (b) différence significative avec les valeurs de l'autre groupe recevant l'amphétamine pour le même type de régime et (c) différence significative avec les valeurs du groupe soumis à l'autre type de régime pour la même dose d'amphétamine (données non publiées).

4. Discussion

Les résultats de cette expérience mettent en évidence une légère sensibilité locomotrice pour la dose intermédiaire d'amphétamine chez les KO soumises au régime, ainsi qu'une réponse de renforcement plus marquée uniquement lorsque le test est effectué sous amphétamine.

Le fait que seul le génotype KO présente des différences comportementales selon le régime reçu est intéressant. Néanmoins, ces effets apparaissent dans des conditions particulières (test sous amphétamine) ou sont peu marqués (*slopes* non significatives). Ainsi, l'interprétation de l'implication éventuelle du récepteur à la MCH reste délicate. Un examen plus direct du régime en tant que stress sur le comportement serait nécessaire, comme par exemple, à l'aide d'un test plus adapté pour mesurer l'anxiété.

Cependant, l'absence d'effet marqué du régime pourrait s'expliquer par le fait qu'une fois la perte de poids compensée, les neurones à MCH ne seraient plus aussi actifs. En effet, avant le début de l'expérience, les animaux soumis au régime ont à nouveau accès à la nourriture durant trois jours afin qu'ils compensent leur perte de poids. D'ailleurs, dans l'étude dont nous avons répliqué le protocole, la phase de régime préalable à l'expérience produit un impact sur la locomotion et la réponse de renforcement que chez une des deux souche de souris testées (DBA) et aucun effet chez la seconde (C57) (Cabib *et al.*, 2000).

5. Conclusions

Malgré une perte de poids significative durant la période de régime, les résultats locomoteurs et de renforcement obtenus par la suite avec l'amphétamine ne permettent pas de conclure à un impact clair du stress induit par la restriction alimentaire chez les génotypes étudiés. Cette recherche devrait s'inscrire dans un cadre plus général d'étude de l'anxiété et nécessite des mesures supplémentaires, tant comportementales que physiologiques.

5. Discussion générale

Au vu des différentes expériences présentées dans le cadre de ce chapitre, il semblerait que l'activation de l'axe MCH/MCHR1 (aboutissant à des différences comportementales entre les génotypes) ne s'effectue que lors d'un état de balance énergétique négatif. En effet, une privation aigüe de 24h ou une restriction prolongée préalable à l'expérience ne constituent pas des conditions nécessaires pour qu'une différence comportementale apparaisse entre les génotypes étudiés. Seule la condition d'une restriction alimentaire durant la phase expérimentale permet de mettre en évidence une légère action potentialisante du récepteur à la MCH sur les effets comportementaux de l'amphétamine.

Ainsi, comme pour les expériences du chapitre précédent avec la cocaïne et l'amphétamine, il semble nécessaire que le système MCH/MCHR1 soit suffisamment stimulé pour que son influence sur le comportement se manifeste. De fait, dans les expériences sans phase de régime, les différences comportementales entre les génotypes ne sont observées que dans certaines conditions très précises (faibles doses d'amphétamine ou voie d'administration sous-cutanée pour la cocaïne) qui entraîneraient une forte stimulation du système dopaminergique.

Pour conclure, il apparaît donc que l'influence de l'axe MCH/MCHR1 sur les comportements inhérents à l'addiction aux psychostimulants, telle que la sensibilisation et le renforcement, ne soit pas systématique et requiert des conditions particulières pour pouvoir s'exprimer.