



**HAL**  
open science

**Caractérisation de la balance énergétique et de son  
contrôle monoaminergique central et périphérique chez  
un modèle de rat ne développant pas d'obésité, le rat  
Lou/C**  
David Perrin

► **To cite this version:**

David Perrin. Caractérisation de la balance énergétique et de son contrôle monoaminergique central et périphérique chez un modèle de rat ne développant pas d'obésité, le rat Lou/C. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2003. Français. NNT: . tel-00069319

**HAL Id: tel-00069319**

**<https://theses.hal.science/tel-00069319v1>**

Submitted on 17 May 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE  
présentée  
devant L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1  
pour l'obtention  
du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 30 mars 1992)

présentée et soutenue publiquement le 10 Juillet 2003

par  
David PERRIN

TITRE :

CARACTERISATION DE LA BALANCE ENERGETIQUE ET DE SON CONTROLE  
MONOAMINERGIQUE CENTRAL ET PERIPHERIQUE CHEZ UN MODELE DE RAT  
NE DEVELOPPANT PAS D'OBESITE, LE RAT LOU/C.

Directeur de Thèse :  
Jean-Marc PEQUIGNOT

JURY : Mr le Professeur Hervé BARRE  
Mme le Professeur Josiane SEYDOUX  
Mr le Docteur Claude ATGIE  
Mr le Docteur Alain GELOEN  
Mr le Professeur Jean-Marc PEQUIGNOT  
Mr le Docteur Nicolas WIERNSPERGER

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Examineur

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tout d'abord l'ensemble du jury, Madame le Professeur Josiane Seydoux, Monsieur le Docteur Claude Atgié, Monsieur le Professeur Hervé Barré, Monsieur le Docteur Alain Géloën, Monsieur le Professeur Jean-Marc Pequignot et Monsieur le Docteur Nicolas Wiernsperger pour avoir accepté d'assister à la soutenance de ma thèse.

Je remercie Madame le Professeur Josiane Seydoux et Monsieur le Docteur Claude Atgié pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Hervé Barré, pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer une équipe de son laboratoire et avoir accepté d'être le Président du Jury.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse Monsieur le Professeur Jean-Marc Pequignot pour m'avoir soutenu, accompagné scientifiquement et pour toute la confiance qu'il m'a témoignée durant ces années de thèse.

Je remercie le Docteur Yvette Dalmaz pour son aide scientifique et pour m'avoir donné l'opportunité de m'impliquer dans d'autres thématiques.

Je remercie le Docteur Gérard Morel, initiateur de ce projet.

Je remercie le Docteur Jean-Marie Cottet-Emard pour son aide technique apportée à l'HPLC.

Je remercie Rose-Marie Cottet-Emard, Jacqueline Pequignot et Annick Vouillarmet, pour tous les petits coups de mains, aussi bien sur le plan moral que scientifique, qu'elles m'ont apportés durant ces années.

Je remercie Christiane, Françoise et Josette pour toute l'attention portée aux rats du 4<sup>ème</sup> étage.

Je remercie M<sup>me</sup> Gallet pour les conversations passionnantes sur la botanique.

Je remercie Le Professeur Max Recassens pour m'avoir accueilli dans son unité et donné l'opportunité d'aborder de nouvelles techniques tout en me permettant de terminer la rédaction de ce travail.

Je remercie Marie, Sylvie et Malou, la dream team de la capture du glutamate à Montpellier.

Je remercie Françoise et Edmond pour m'avoir supporté dans leur bureau.

Je remercie Christophe pour sa motivation, son entrain et son aide scientifique.

Je remercie Stéphane pour l'organisation des nombreuses activités extra scientifiques et sportives.

Je remercie également tous les étudiants du 4<sup>ème</sup> étage de la Faculté de Médecine à Rockefeller : Agnès, Eric, Jean-Christophe, Jorge, Julie, Karine, Laurent, Natacha, Sophie, Stéphanie et Vincent tout particulièrement et tous les autres pour leur collaboration et pour les bonnes soirées réconfortantes.

Bien entendu, je remercie celle qui partage ma vie et toute ma famille présente, disparue et à venir, car ils ont tous à leur façon participé à l'élaboration de ce travail.

Ce travail a été en partie subventionné par la Région Rhône-Alpes.

## PUBLICATIONS

D Perrin, J Mamet, A Gélœn, G Morel, Y Dalmaz and JM Pequignot. **Central monoaminergic regulation of energy balance and sympathetic activity in Lou/C rats.** *Autonomic Neuroscience* 28, 109, 1-9, 2003.

D Perrin, C Soulage, JM Pequignot and A Gélœn. **Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing associated metabolic alterations.** *Diabetologia* 46 : 1489-1496, 2003.

D Perrin, J Mamet, JC Roux, H Scarna, A Bérode, Y Dalmaz. **Maturation of catecholaminergic system and behavioural alterations after long-term prenatal hypoxia in rats** (soumis à *Synapse*).

C Soulage, D Perrin, JM Cottet-Emard and Pequignot JM. **A6 noradrenergic cell group modulates the hypoxic ventilatory response.** *Adv Exp Med Biol* 536, 481-487, 2003.

C Soulage, D Perrin, P Berenger and JM Pequignot. **Chronic exposure to toluene at 40-ppm alters the monoamines biosynthesis rate in discrete brain areas.** (sous presse dans *Toxicology*).

C Soulage, D Perrin, JM Cottet-Emard and Pequignot JM. **6-Hydroxydopamine-induced unilateral lesion of the locus coeruleus alters the hypoxic ventilatory response of conscious rats.** (soumis à *Journal of Physiology*).

J Peyronnet, JC Roux, D Perrin, JM Pequignot, H Lagercrantz, Y Dalmaz. **Prenatal hypoxia and early postnatal maturation of the chemoafferent pathway.** *Adv Exp Med Biol* 536 : 525-533, 2003.

JC Roux, J Mamet, D Perrin, J Peyronnet, C Royer, JM Cottet-Emard, Y Dalmaz and JM Pequignot. **Neurochemical development of the brainstem catecholaminergic cell groups in rat.** *Journal of Neural Transmission* 110, 51-65, 2003.

P Berenguer, C Soulage, D Perrin, JM Pequignot and JH Abraini. **Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 74, 997-1003, 2003.

J Mamet, J Peyronnet, JC Roux, D Perrin, JM Cottet-Emard, JM Pequignot, H Lagercrantz and Y Dalmaz. **Long-term prenatal hypoxia alters maturation of the adrenal medulla in the rat.** *Pediatric Research* 51, 207-214, 2002.

JC Roux, J Mamet, J Peyronnet, D Perrin, J Lachuer, Y Dalmaz and JM Pequignot. **Gestational hypoxia impaired the postnatal ontogenesis of the chemoafferent pathway.** (soumis à *Journal of Physiology*).

## COMMUNICATIONS ORALES OU AFFICHEES

Mamet J, Perrin D, Peyronnet J Roux JC, Pequignot JM et Dalmaz Y. **Influence de l'hypoxie prénatale sur la maturation du locus coeruleus et de la medullo-surrénale chez le rat.** 2<sup>ème</sup> journée de l'EDISS, Mai 1998, Lyon.

Mamet J, Roux JC, Peyronnet J., Perrin D, Pequignot JM et Dalmaz Y. **L'hypoxie prénatale altère le développement postnatal de la glande médullo-surrénale chez le rat.** 3<sup>ème</sup> journée scientifique de l'EDISS, Mai, 2000, Lyon.

D Perrin, J Mamet, J Pequignot , Y Dalmaz, G Morel, JM Pequignot. **Régulations monoaminergiques périphériques et centrales du métabolisme énergétique chez le rat Lou/C.** 5<sup>ème</sup> Colloque de la Société Française des Neurosciences, Mai, 2001, Toulouse.

J Mamet, D Perrin, JC Roux, H Scarna, Y Dalmaz. **L'hypoxie périnatale altère la maturation des systèmes catécholaminergiques et le comportement chez le rat.** 5<sup>ème</sup> Colloque de la Société Française des Neurosciences, Mai, 2001, Toulouse.

S Mahlière, D Perrin, J Mamet, JC Roux, J Peyronnet, JM Pequignot, Y Dalmaz et JP Viale. **Effets de la nicotine prénatale sur le développement respiratoire du rat.** Congrès national de la Société Française de Pédiatrie, Mai 2001, Paris. Résumé publié dans : *Archives de Pédiatrie.* 8 (2) : 533-534s, 2001.

J Mamet, JC Roux, D Perrin, S Malhière, C Soulage, C Royer, H Scarna et Y Dalmaz. **L'hypoxie gestationnelle altère le contrôle catécholaminergique du comportement : étude neurochimique et fonctionnelle.** 4<sup>ème</sup> journée scientifique de l'EDISS, Mai, 2001, Lyon.

S Malhière, D Perrin, J Mamet, JC Roux, J Peyronnet, JM Pequignot, Y Dalmaz et JP Viale. **Effets de la nicotine prénatale sur le développement respiratoire du rat.** 43<sup>ème</sup> congrès de la Société Française d'Anesthésie-Réanimation, Septembre, 2001, Paris.

D Perrin, J Mamet, A Géloën, G Morel, Y Dalmaz, JM Pequignot. **Selective changes in sympathetic outflow and brain monoamine activity in a model of anti-obese rat strain, the Lou/C rat.** 69<sup>ème</sup> congrès de la Société de Physiologie, Septembre 2001, Montpellier.

Perrin D, Mamet J, Roux JC, Scarna H, Pequignot JM and Dalmaz Y. **Altered maturation of central catecholaminergic areas and impaired behaviour following prenatal hypoxia in rat.** V World congress on mountain medicine and high altitude physiology, April 2002, Barcelona.

D Perrin, J Mamet, A Géloën, G Morel, Y Dalmaz, JM Pequignot. **Contrôle monoaminergique central et périphérique de la balance énergétique chez un rat ne développant pas d'obésité, le rat Lou/C.** 5<sup>ème</sup> journée scientifique de l'EDISS, Mai, 2002, Lyon.

Perrin D, Mamet J, Roux JC, Scarna H, Pequignot JM and Dalmaz Y. **Altered maturation of central catecholaminergic areas and impaired behaviour following prenatal hypoxia in rat.** Federation of European Neurosciences Society Forum, July 2002, Paris.

C Soulage, D Perrin, JM Cottet-Emard and JM Pequignot. **6-Hydroxydopamine-induced lesion of locus coeruleus alters the hypoxic ventilatory response in conscious rats.** *Federation of European Neurosciences Society Forum*, July 2002, Paris.

Malhière S., Perrin D., Peyronnet J., Viale J.P., Dalmaz Y. **Prenatal nicotine delays the resetting of the chemoreflex.** *XVth ISAC Meeting*, November 2002, Lyon.

Soulage C., Perrin D., Cottet-Emard J.M., Pequignot J.M. **Locus coeruleus modulation of the hypoxic ventilatory response in adult rat.** *XVth ISAC Meeting*, November 2002, Lyon.

Berenguer P., Soulage C., Perrin D., Pequignot J.M. et Abraini J.H. **Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats.** 12<sup>th</sup> annual meeting of the International Behavioral Neuroscience Society, April 2003, Puerto Rico.

C. Soulage, D. Perrin, P. Berenguer, JH. Abraini et JM. Pequignot. **Neurotoxicité du toluène en faible concentration: étude neurochimique et comportementale.** 7<sup>ème</sup> *Journée Scientifique de l'EDISS*, Avril 2003, Lyon.

D. Perrin, C. Soulage, A. Géloën and J.M. Pequignot. **Metabolic features in a new obesity-resistant rats (Lou/C) during ageing.** *Federation of Physiology Society Forum*, July 2003, Nice.

# SOMMAIRE

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>I. L'obésité, un symptôme, une pandémie</b> .....	<b>3</b>
I. 1. Définition clinique de l'obésité.....	3
I. 2. Prévalence et évolution de la pandémie d'obésité dans le monde.....	4
I. 3. Facteurs de développements de l'obésité.....	6
I. 4. Les complications de l'obésité.....	6
I. 5. Conséquences économiques de l'obésité.....	8
<b>II. Modèles animaux utilisés pour l'étude de l'obésité : des modèles d'obésité au rat Lou/C ne développant pas d'obésité</b> .....	<b>9</b>
II. 1. Exemples d'obésités monogéniques.....	9
II. 2. Modèles d'obésité obtenus par altérations du système nerveux.....	10
II. 3. Modèles de non-développement d'obésité.....	11
<b>III. La dépense énergétique</b> .....	<b>12</b>
III. 1. Le métabolisme basal.....	12
III. 2. Dépense énergétique liée au travail musculaire.....	14
III. 3. La thermogenèse.....	14
<b>IV. Rétrocontrôle périphérique de la balance énergétique</b> .....	<b>16</b>
IV. 1. La leptine.....	16
IV. 2. L'insuline.....	23
<b>V. Principales structures du système nerveux central impliquées dans la régulation de la balance énergétique</b> .....	<b>28</b>

<b>VI. Importance des monoamines dans la régulation de la balance énergétique</b> .....	<b>34</b>
VI. 1. Les monoamines.....	34
VI. 2. Rôle des monoamines du système nerveux central dans la régulation métabolisme énergétique.....	43
VI. 3. Rôle des monoamines du système nerveux central dans la régulation de la prise alimentaire.....	44
<b>VII. Le système nerveux sympathique et la régulation du métabolisme énergétique</b>	<b>46</b>
VII.1. Organisation générale du système nerveux sympathique.....	46
VII. 2. Le système nerveux sympathique et le métabolisme du glucose.....	47
VII. 3. Le système nerveux sympathique et le tissu adipeux blanc.....	48
VII. 4. Le système nerveux sympathique et le tissu adipeux brun.....	49
<b>Objectif général</b> .....	<b>51</b>

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

<b>I. Les animaux</b> .....	<b>52</b>
<b>II. Mesure de la prise alimentaire et de la dépense énergétique</b> .....	<b>52</b>
<b>III. Evaluation de l'activité locomotrice des rats</b> .....	<b>54</b>
III. 1. Principe.....	54
III. 2. Mesures.....	56
<b>IV. Activité cytochrome oxydase</b> .....	<b>57</b>
IV. 1. Principe.....	57
IV. 2. Préparation des tissus.....	57
IV. 3. Dosages.....	58
<b>V. Neurochimie</b> .....	<b>59</b>
V. 1. Traitement pharmacologie pour l'étude de l'activité tyrosine hydroxylase in vivo	59

V. 2. Technique de chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électrochimique (HPLC-ED) .....	61
<b>VI. Technique de dosage radio immunologique de l'insuline et de la leptine plasmatique</b> .....	<b>67</b>
VI. 1. Prélèvement sanguin .....	67
VI. 2. Principe du dosage .....	67
VI. 3. Dosages .....	69
VI. 4. Quantification .....	71
<b>VII. Détermination de la glycémie</b> .....	<b>72</b>
<b>VIII. Détermination de la résistance périphérique à l'insuline</b> .....	<b>72</b>
VIII. 1. Principe du clamp euclycémique-hyperinsulinique .....	72
VIII. 2. Protocole .....	72
<b>IX. Statistiques</b> .....	<b>73</b>

## RÉSULTATS

<b>I. Etude des différences morphométriques entre les rats Lou/C et les rats Wistar</b> .....	<b>74</b>
I. 1. Evolution du poids des rats .....	75
I. 2. Evolution du poids des organes .....	77
I. 3. Marqueur d'adiposité : index de Lee .....	80
<b>II. Etude de la balance énergétique au cours du vieillissement chez le rat Lou/C et le rat Wistar</b> .....	<b>82</b>
II. 1. Prise alimentaire .....	82
II. 2. Dépense énergétique .....	84
II. 3. Température des rats .....	85
II. 4. Activité locomotrice spontanée des rats Wistar et Lou/C à 6 mois .....	85
II. 5. Activité cytochrome oxydase au niveau tissulaire .....	88

<b>III. Activite catecholaminergique peripherique chez les rats Lou/c et les rats Wistar</b>	<b>89</b>
.....	
III. 1. Activité catécholaminergique et contenu en noradrénaline dans les organes périphériques.....	90
III. 2. Contenu en catécholamines de la glande surrénale.....	93
<b>IV. Profil monoaminergique des structures centrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique.....</b>	<b>94</b>
IV. 1. Comparaison des contenues en monoamines et des activité des enzymes entre structures.....	94
IV. 2. Profil catécholaminergique central des deux souches.....	95
IV. 3. Profil sérotoninergique central des deux souches.....	95
<b>V. Concentrations plasmatiques d’hormones impliquées dans le contrôle de la balance énergétique chez des rats Lou/C et des rats Wistar au cours du vieillissement.....</b>	<b>100</b>
V. 1. Insulinémie.....	100
V. 2. Concentration en leptine plasmatique.....	101
V. 3. Glycémie.....	102
<b>VI. Détermination de la sensibilité périphérique à l’insuline des rats Wistar et Lou/C</b>	<b>75</b>
.....	

## DISCUSSION

<b>I. Les rats Lou/C régulent leurs balance énergétique au cours du vieillissement.....</b>	<b>108</b>
<b>II. Les rats Lou/C présentent une activité catécholaminergique augmentée spécifiquement dans les tissus adipeux et diminuée dans le foie par rapport aux rats Wistar.....</b>	<b>111</b>
<b>III. Le profil monoaminergique central particulier des rats Lou/C pourrait être à l’origine du non-développement de l’obésité chez cette souche.....</b>	<b>116</b>
<b>IV. Les rats Lou/C ne développent pas de résistance à l’insuline en vieillissant contrairement aux rats Wistar.....</b>	<b>120</b>

**V. Les rats Lou/C développent une résistance à la leptine mais plus tardivement au cours du vieillissement par rapport aux rats Wistar.....123**

**VI. Le rat Lou/C pourrait servir de modèle afin de déterminer les interrelations Insulinémie/Leptinémie.....127**

**VII. Le rat Lou/C est un modèle de vieillissement sain au regard de sa masse adipeuse, de son insulinémie et de sa leptinémie.....129**

**CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....130**

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ABSTRACT**

**RESUME, MOTS CLES**

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le poids d'un individu peut être considéré comme une variable physiologique régulée. Un déséquilibre dans cette régulation avec une diminution de la dépense énergétique ou une augmentation des entrées conduit à une accumulation de réserves énergétiques et à l'obésité.

L'obésité, dans tous les pays développés est un véritable problème de santé publique: un adulte sur cinq en France présente un surpoids; aux Etats-Unis, un adulte sur trois. La population concernée est de plus en plus jeune et importante. En plus d'être une source d'inconfort physique et un facteur de rejet social, l'obésité et la surcharge pondérale diminuent l'espérance de vie. L'obésité est associée à de nombreuses pathologies (troubles cardiovasculaires, hypertension artérielle, diabète, cancers du sein, de la prostate et du côlon, problèmes articulaires...). Ainsi, bien qu'une des causes majeures du développement de l'obésité soit liée à de mauvaises habitudes alimentaires et au mode de vie, il est important de comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu lors de l'installation de l'obésité.

L'une des voies explorées est de déterminer les causes de l'installation d'une surcharge pondérale chez des modèles animaux d'obésité. Mais une alternative peut se révéler intéressante : c'est l'étude de modèles animaux qui au contraire, ne développent pas d'obésité en vieillissant. En comprenant pourquoi certains rats ne grossissent pas, on pourrait mettre en évidence de nouveaux mécanismes physiologiques sous-tendant le non-développement de l'obésité et des pathologies associées.

La souche de rat Lou/C a été isolée dans les années 70 à partir de la souche de rat Wistar. Cette souche présente un poids plus faible par rapport au rat Wistar, essentiellement en raison d'une moindre accumulation de réserves lipidiques. Au début des années 90, le rat Lou/C a commencé à être étudié comme modèle de vieillissement sain, mais ce n'est que récemment que l'on s'est intéressé au non-développement d'obésité présenté par cette souche.

Au cours de cette étude, nous avons tout d'abord caractérisé la balance énergétique (adiposité, prise alimentaire et dépense énergétique) du rat Lou/C au cours du vieillissement. Ensuite, nous avons essayé de déterminer l'origine des modifications de la balance énergétique du rat Lou/C responsables de sa résistance à l'obésité.

Une des boucles de régulation de la balance énergétique est constituée :

1) du système nerveux sympathique qui est une voie activatrice de la dépense énergétique

2) d'une voie de rétrocontrôle endocrine. L'insuline et la leptine informent les centres du statut énergétique de l'organisme.

3) au niveau des centres intégrateurs de cette boucle de régulation que sont les noyaux hypothalamiques, les monoamines (catécholamines et sérotonine) jouent un rôle important à la fois dans la régulation de la prise alimentaire et dans la régulation de la dépense énergétique.

Dans ce contexte, nous avons mesuré l'activité sympathique dans les organes périphériques impliqués dans la mise en réserve et dans la dépense énergétique chez le rat Lou/C comparé au rat Wistar. Une étude longitudinale de l'insulinémie et de la leptinémie a été réalisée chez les deux souches et nous avons évalué l'implication des monoamines du système nerveux central dans le déterminisme énergétique du rat Lou/C.

# RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

*« Only the man who is familiar with the art and science of the past is competent to aid in its progress in the future »*

*Theodore Billroth (chirurgien, 19<sup>ième</sup> siècle)*

## I. L'OBÉSITÉ : UN SYMPTOME, UNE PANDÉMIE

Cet article paru dans l'Herald Tribune le 3 Mai 2003, peut paraître anecdotique, mais en fait, il reflète de manière indirecte le développement important de la pandémie d'obésité.

### ■ WASHINGTON

#### **Heavier Americans in the air**

The U.S. government may add 10 pounds to its estimates of how much air travelers weigh to determine if planes are too heavy to fly safely. Regional carriers say they might have to eliminate seats to comply.

An adult passenger flying in winter is now estimated to weigh 185 pounds, including clothing and carry-ons. In summer, he or she is calculated at 180 pounds.

Some believe those estimates, put in place in 1995, may be too low because Americans are larger. Adult men averaged 180.7 pounds in 1994, the most recent year for which statistics from the Centers for Disease Control and Prevention are available. (AP)

### I. 1. Définition clinique de l'obésité

L'obésité est un excès de poids dû à une inflation des réserves énergétiques, c'est à dire un excès de masse grasse. Diagnostiquer l'obésité chez l'homme exige en toute rigueur de connaître la masse grasse de l'individu, ce qui nécessite des techniques non disponibles en routine (mesure de densité corporelle, absorptiométrie, tomodensitométrie, résonance magnétique...). En pratique clinique comme en épidémiologie, l'obésité est définie à partir de **l'Indice de Masse Corporelle** (IMC, traduction de Body Masse Index, BMI). L'IMC est calculé selon la formule suivante: poids (en Kg)/taille<sup>2</sup> (en mètres). Le surpoids est atteint quand l'IMC se situe entre 25 et 30 et on parle d'obésité avec un IMC supérieur à 30 (Tableaux 1 et 2). Pour un IMC normal, la masse grasse représente 20 à 25% chez la femme et 10 à 15% chez l'homme, de la masse totale,. Certaines tables proposent ainsi des valeurs différentes d'IMC en fonction du sexe et les valeurs considérées comme optimales sont pour l'homme 22,7 kg/m<sup>2</sup> et pour la femme 22,4 kg/m<sup>2</sup> (Gallagher et al, 1996).

Limites proposées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour définir le statut pondéral chez l'adulte en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC)			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Classification de l'OMS	Dénomination usuelle	Correspondance en kg pour une taille de 1,70 m
< 18,5	Déficit pondéral	Maigreur	< 53
18,5-24,9	-	Poids « souhaitable »	53-72
25-29,9	Degré 1 d'excès de poids	Surpoids	73-86
30-39,9	Degré 2 d'excès de poids	Obésité	87-115
> 40	Degré 3 d'excès de poids	Obésité massive	> 116

Classification des obésités en fonction de l'indice de masse corporelle selon l'International Obesity Task Force (IOTF)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Classification
< 18,5	Insuffisance pondérale
18,5-24,9	Valeurs normales
25-29,9	Excès de poids
30-34,9	Obésité I (modérée)
35-39,9	Obésité II (Sévère)
> 40	Obésité III (Très sévère)

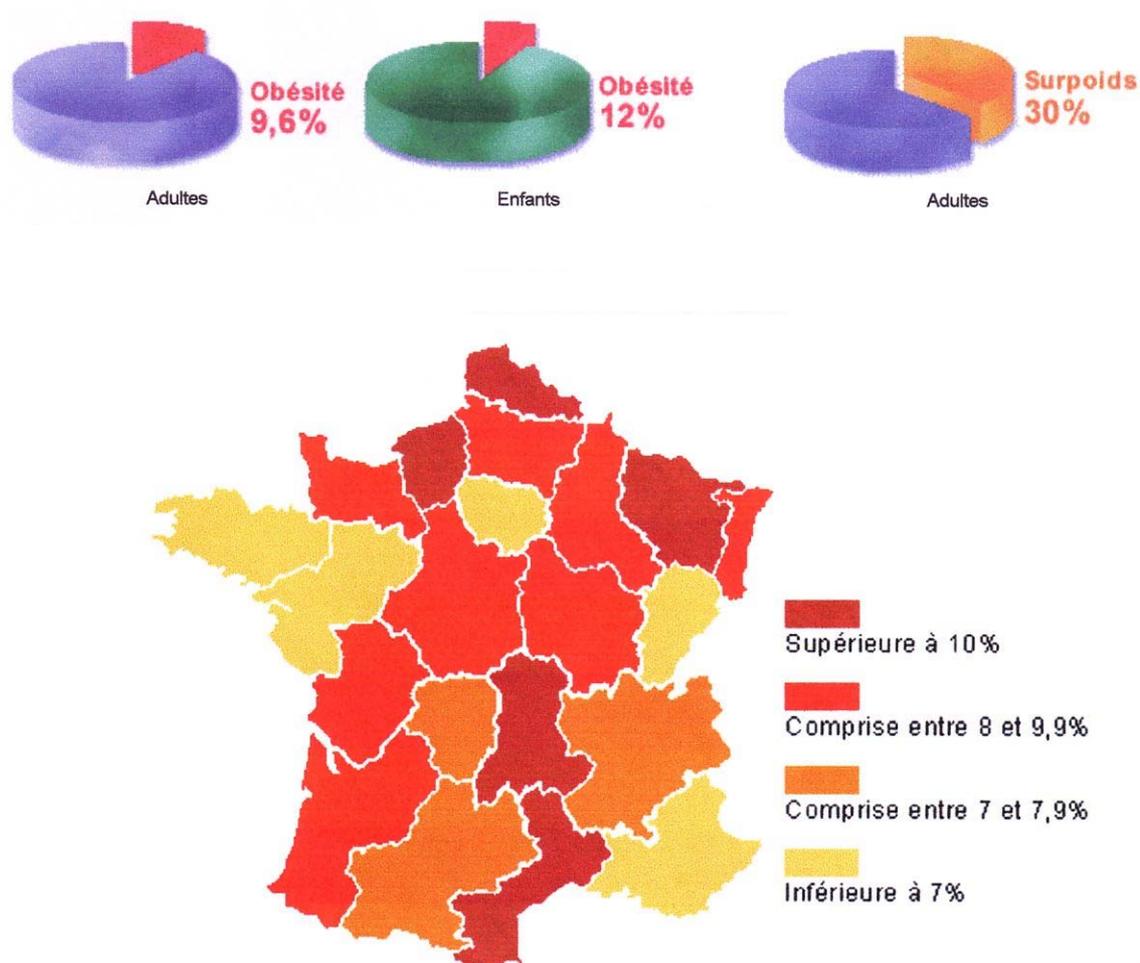
**Tableaux 1 et 2. Deux classifications des degrés d'obésité en fonction de l'indice de masse corporelle proposées par deux organismes internationaux.** Le tableau donné par l'IOTF permet de distinguer obésité modérée et obésité sévère.

## I. 2. Prévalence et évolution de la pandémie d'obésité dans le monde

Au cours des dernières décennies, la prévalence de l'obésité dans nos sociétés a fortement augmenté et cette augmentation s'accélère au niveau mondial. Ainsi, aux Etats Unis, le nombre de personnes obèses a progressé de 75% en 14 ans entre 1980 et 1994 (Flegal et al, 1998), de 50% en 7 ans entre 1991 et 1998 (Mokdad et al, 1999) ou de 61% en 9 ans entre 1991 et 2000 (Mokdad et al, 2001). Actuellement, 19,8% (Mokdad et al, 2001) à 27% (Yanovski et Yanovski, 2002) des Américains seraient obèses. L'augmentation du nombre d'obèses était de 10% entre 1987 et 1997 au Royaume Uni, de 5% entre 1987 et 1991 aux Pays-Bas et également de 5% entre 1980 et 1989 en Australie (Bianchini et al, 2002). Le pourcentage d'obèses dans les pays d'Europe de l'Est atteint 30 à 35% de la population. La France n'est pas épargnée par le fléau que représente l'obésité. Entre 1997 et 2000, le nombre d'obèses a progressé de 17% et représente 4 millions de personnes. Les populations jeunes

(avant 25 ans) sont de plus en plus touchées (12% des enfants en France sont considérés comme obèses) (figure 1).

**Les zones urbaines sont plus touchées que les zones rurales.** L'obésité est plus répandue dans les pays développés mais le nombre d'obèses dans certaines zones urbaines de pays en voie de développement (Namibie, Zimbabwe, Turquie, Guatemala, Honduras, Mexique, Pérou...) atteint déjà 10 à 15% de la population (Martorell et al, 2000). L'Organisation Mondiale de la Santé a estimé en 1997, qu'approximativement 300 millions d'adultes et d'enfants souffriraient d'obésité en 2035.



**Figure 1. L'obésité en France** (d'après le site internet [www.obesite.fr](http://www.obesite.fr), consulté en mai 2003)

### I. 3. Facteurs de développements de l'obésité

Un **déséquilibre de la balance énergétique** va engendrer le développement de l'obésité. Ce sont essentiellement des **problèmes comportementaux et environnementaux** qui vont s'associer pour surpasser les systèmes neuroendocriniens de contrôle de la balance énergétique et aboutir à une mise en réserve excessive de lipides. En effet, le confort de la vie moderne dans les sociétés des pays développés conduit à une diminution de la dépense énergétique alors que les modes alimentaires sont modifiés avec une mise à disposition permanente des aliments et une augmentation des apports lipidiques.

Des études font ressortir qu'un enfant dont les deux parents sont obèses a un risque d'obésité trois fois supérieur à celui d'un enfant ayant deux parents minces. Ce **déterminisme génétique** serait lié à une meilleure « efficacité » générale de l'organisme pour stocker des lipides à partir des aliments ingérés. Dans certains cas d'obésités, en petit nombre, des facteurs génétiques précis ont été mis en avant, notamment une altération de la production de leptine (hormone sécrétée par les adipocytes en proportion de leur nombre, et qui va diminuer la prise alimentaire et augmenter la dépense énergétique par son action centrale) ou de son récepteur. Il a été également trouvé chez certains obèses des mutations du gène codant pour la pré-pro-opiomélanocortine (POMC), un peptide impliqué au niveau du système nerveux central dans le contrôle de la prise alimentaire (Krude et al, 1998).

### I. 4. Les complications de l'obésité

En plus d'être un facteur de rejet social et source d'inconfort physique, l'obésité est surtout associée à un grand nombre de pathologies. Ceci se traduit par une **diminution de l'espérance de vie chez les personnes obèses** (Thompson et al, 1999, Tableau 3). Le nombre de morts attribuées à l'obésité est d'environ 300 000 personnes par ans aux Etats-Unis (Allison et al, 1999).

		Espérance de vie en fonction de l'IMC			
Classes d'âge		22,5	27,5	32,5	37,5
Hommes	35-44	36,2	35,7	35,1	34,4
	45-54	27,5	27,0	26,5	25,8
	55-64	19,5	19,2	18,8	18,3
Femmes	35-44	41,4	41,1	40,6	40,1
	45-54	32,2	31,9	31,4	30,9
	55-64	23,8	23,5	23,1	22,7

**Tableau 3. Espérance de vie en année en fonction de la classe d'âge, du sexe et de l'Indice de Masse Corporelle dans la population américaine (d'après Thompson et al, 1999).**

L'obésité engendre des pathologies ayant pour origine des problèmes mécaniques, métaboliques, endocrines, cardiovasculaires.

La surcharge pondérale va avoir un effet direct, mécanique sur la ventilation avec une réduction de certains volumes pulmonaires du fait de la présence de quantité importante de masse adipeuse abdominale. L'excès d'adiposité au niveau thoracique engendre des diminutions de la compliance thoracique et pulmonaire se traduisant par des **insuffisances respiratoires et le syndrome d'apnée du sommeil** qui concerne 20 à 30% des obèses (Jenkins et Moxham, 1991, Collins et al, 1995, Laaban et al, 1996, Basdevant, 1998, Koenig, 2001).

Il existe d'autres complications liées aux contraintes mécaniques chez le sujet obèse. Ainsi, **les atteintes rhumatologiques** augmentent l'évolutivité de l'arthrose, notamment au niveau de la hanche et du genou.

**Le diabète de type 2** ou diabète non-insulino dépendant est la conséquence d'une résistance à l'insuline en premier lieu et secondairement d'une altération de la sécrétion d'insuline par le pancréas. La résistance à l'insuline dans le diabète de type 2 se manifeste par une diminution de la stimulation par l'insuline du transport et du métabolisme du glucose dans les adipocytes et dans les muscles squelettiques ainsi qu'une altération de la suppression par l'insuline de la libération de glucose par le foie (Kahn et Flier, 2000). L'association entre l'obésité et le développement d'un diabète de type 2 est bien établie et on estime que 60 à 90% des personnes développant un diabète de type 2 sont ou ont été obèses, le diabète de type 2 pouvant être la cause ou la conséquence d'une surcharge pondérale. Etant donné que tous les obèses ne développent pas forcément de diabète de type 2, le facteur génétique est à prendre en compte (Felber et Golay, 2002).

L'obésité est également un risque majeur de développement de **l'hypertension** (Stamler et al, 1978). Dans la population nord-américaine, le risque d'hypertension est multiplié par 3 à 4 chez les sujets obèses (Thompson et al, 1999). Une activation du système nerveux sympathique serait en partie à l'origine du développement de cette pathologie. La leptine, hormone sécrétée par les adipocytes, provoque une activation sympathique par son action sur l'hypothalamus (Haynes, 2000). L'hyperlipidémie (hypercholestérolémie) est un autre facteur intervenant dans le développement de l'hypertension chez l'obèse.

L'augmentation de la masse grasse chez un individu provoque au **niveau cardiaque** une hypertrophie ventriculaire, des insuffisances coronaires, des insuffisances cardiaques gauche et droite qui associées à des altérations vasculaires peuvent conduire à des attaques cardiaques ou cérébrales (Basdevant, 1998).

Les risques de maladies cardiovasculaires et de diabète pourraient être réduits suite à une perte de 5 à 10% de poids chez les individus obèses (Goodpaster et al, 1999, Williamson et al, 1999, Kopelman, 2000).

Des études épidémiologiques ont montré que l'obésité est associée à une augmentation des risques dans l'apparition des **cancers du colon, du sein, du rein de l'œsophage et de l'estomac** (Bianchini et al, 2002).

## **I. 5. Conséquences économiques de l'obésité**

Au niveau individuel, les études sociologiques ont révélé que le revenu moyen des personnes obèses était inférieur au revenu moyen des personnes ayant un IMC normal. Quant aux coûts médicaux, on estime que la prise en charge des pathologies liées à l'obésité **double les dépenses de santé** chez les personnes entre 45 et 54 ans (Thompson et al, 1999). Le coût économique de l'obésité représente **2 à 5,5% des dépenses de santé** dans les pays développés (11,9 milliards de francs en France en 1992)(Oppert et Rolland-Cachera, 1998).

## II. MODÈLES ANIMAUX UTILISÉS POUR L'ÉTUDE DE L'OBÉSITÉ : DES MODELES D'OBÉSITÉ AU RAT LOU/C QUI NE DÉVELOPPE PAS D'OBESITÉ

Afin de comprendre les mécanismes sous-tendant le développement de l'obésité et des maladies métaboliques associées, différents modèles animaux ont été développés. Depuis plus de 30 ans, de nombreux modèles de rongeurs génétiquement obèses ont été étudiés sans que l'on s'intéresse à la fonction de la protéine déficiente. Parallèlement, les déséquilibres métaboliques résultant de lésions du système nerveux ont permis de déterminer l'implication des structures centrales dans la régulation de la dépense énergétique.

### II. 1. Exemples d'obésités monogéniques

#### *Modèles dus à une déficience du système leptinergique*

La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes en proportion de leur nombre et de leur taille. Cette hormone agit au niveau des noyaux hypothalamiques pour diminuer la prise alimentaire et augmenter la dépense énergétique.

-Mutation *fa* : Les rats de la souche Zucker homozygotes pour le gène récessif *fa* développent très tôt une obésité. L'implication de la mutation *fa* dans la transmission du signal leptinique chez le rat Zucker a été montrée en 1996 (Phillips et al, 1996). Entre temps, de nombreuses études physiologiques ont permis de caractériser cette souche et de déterminer les mécanismes d'installation de l'obésité et l'implication du système nerveux central.

-Mutation *ob* : Le gène *ob* code pour la leptine et a été cloné en 1994 (Zhang et al, 1994). Les souris *ob/ob* déficientes pour ce gène, sont étudiées depuis les années 70 pour leur obésité.

-Mutation *db* : La souris homozygote pour le gène récessif *db* (pour *diabetes*) sont diabétiques et obèses. Le gène *diabetes* code pour le récepteur à la leptine. On retrouve une mutation d'un gène codant pour un récepteur à la leptine chez le rat Koletsky, un autre modèle d'obésité (Wu-Peng et al, 1997).

#### *Autres mutations monogéniques conduisant à l'obésité*

Le produit du gène *agouti* est un antagoniste du récepteur à la mélanocortine (MC4-R) impliqué dans le contrôle de la balance énergétique. Les souris *yellow agouti* exprime ce peptide agoniste au niveau central ce qui empêche l'action de la mélanocortine et provoque une augmentation de la prise alimentaire et l'obésité (Miller et al, 1993). De nombreux

modèles de souris obèses sont obtenus par manipulation génétique (Robinson et al, 2000). Par exemple des souris knock out pour des molécules d'adhésion intercellulaire développent une obésité en vieillissant (Levine et Billington, 1998), d'autres souris obèses sont obtenues par surexpression des transporteurs au glucose (GLUT-4) (Shepherd et al, 1993). Le rat OLETF possède dans hypothalamique des récepteurs à la cholécystokinine (hormone d'origine intestinale) non fonctionnels (Moran et al, 1998).

Le rat Fischer 344 x Brown Norway est un modèle d'étude de l'obésité humaine couramment utilisé car il présente une augmentation progressive de sa masse adipeuse avec l'âge (Li et al, 1997). Cependant, à notre connaissance aucune mutation monogénique n'a été trouvée chez cette souche.

## II. 2. Modèles d'obésité obtenus par altérations du système nerveux

La neurophysiologie a permis de développer des modèles expérimentaux d'obésité. En 1940, Hetherington et Ranson montrent qu'une **lésion de l'hypothalamus ventromédian** par électrocoagulation produit une hyperphagie et l'obésité chez le rat. On retrouve une hyperphagie chez les patients humains atteints de tumeurs hypothalamiques (Guerre-Millo, 1998). Les résultats obtenus à partir de lésions par électrocoagulation du noyau hypothalamique ventromédian (faisant partie de l'hypothalamus ventromédian avec le noyau arqué) sont discutés du fait de problèmes de spécificité de ces lésions (Bamshad et al, 1998).

L'administration de **glutamate monosodique** chez la souris pendant la période néonatale induit une destruction du noyau arqué et du noyaux ventromédian de l'hypothalamus et le développement de l'obésité (Poon et Cameron, 1978, Tanaka et al, 1978, Meister et al, 1989).

De la même manière une administration parentérale de **gold thioglucose** chez la souris engendre une hyperphagie et le développement de l'obésité suite à une destruction de la partie ventromédiane de l'hypothalamus (Debons et al, 1977, Bergen et al, 1998).

Des modèles d'obésité sont également obtenus à l'aide d'**alimentations hyperlipidiques** données aux rats (Schemmel et al, 1970, Barzilai et Rossetti, 1995). Le rat Wistar, souche utilisée comme référence dans de nombreuses études, nourrit *ad libitum* et dans les conditions standards d'élevage présentent en vieillissant, les caractéristiques des rats obèses notamment au niveau de la masse grasse (Newby et al, 1990).

### II. 3. Modèles de non-développement d'obésité

On peut chercher chez les rats obèses les raisons de l'installation d'un surpoids mais une autre alternative peut se révéler intéressante dans l'étude des déséquilibres métaboliques : c'est **l'étude de rats qui au contraire, ne développent pas d'obésité** dans les conditions standards d'élevage. Un grand nombre d'effets métaboliques bénéfiques se traduisant par une augmentation de l'espérance de vie sont montrés chez des modèles animaux de restriction alimentaire (Barzilai et Gabriely, 2001). De nombreuses études ont donc été menées sur la caractérisation métabolique des animaux en restrictions alimentaires. Cependant il existe peu de modèle de rat ne développant pas d'obésité. Les **rats lésés au niveau de l'hypothalamus latéral** diminuent leur prise alimentaire et adaptent leur dépense énergétique aux apports énergétiques ce qui conduit à une diminution de leur poids (Powley et Keeseey, 1970, De Luca et al, 1987).

**La souche de rat Lou/C** est issue de la souche de rat Wistar et a été isolée entre 1937 et 1941, cependant l'origine exact de cette souche c'est perdue (Alliot et al, 2002). Dans les années 70, 28 lignées différentes de rats Lou (comme Louvain, Belgique) sont développées chez lesquelles est étudiée l'incidence de différentes tumeurs par l'équipe de Bazin. La lignée présentant le développement du plus grand nombre de tumeurs dans le tractus digestif a été appelée Lou/C (Moriame et al, 1977, Bazin, 1990). En 1991, Dodane et al. utilisent le rat Lou/C comme modèle de vieillissement sain dans une étude sur la fonction rénale. L'équipe de Josette Alliot (Laboratoire de Neuroendocrinologie du Vieillissement, Aubière, 63, France) possède un élevage de rat Lou/C depuis le début des années 90. Cette colonie appelée Lou/C/jall, a dévié de la souche initiale de rat Lou/C. En utilisant le rat Lou/C, l'équipe de Josette Alliot montre un changement de la préférence alimentaire au cours du vieillissement en fonction du sexe (Veyrat-Durebex et Alliot, 1997, Veyrat-Durebex et al, 1998, Boghossian et Alliot, 2000, Alliot et al, 2002, Boghossian et al, 2002). 50% des rats Wistar sont morts dès 24 mois alors que les rats Lou/C présentent une durée de vie médiane de 28 à 30 mois (Alliot et al, 2002, Zimmerman et al, 2003). Plus récemment, Couturier et al (2002) ont déterminé certains caractères métaboliques du rat Lou/C, commercialisé par Harlan (Gannat, France). Le rat Lou/C présente une prise alimentaire diminuée de 40% par rapport au rat Wistar à 3 mois. Les rats Wistar ingérant la même quantité de nourriture que les rats Lou/C, n'atteignent pas la réduction d'adiposité des rats Lou/C et ont une masse musculaire plus faible. Ainsi les rats Lou/C présentent un métabolisme adapté à une restriction alimentaire spontanée.

### III. LA DÉPENSE ÉNERGÉTIQUE

La dépense énergétique est principalement composée des dépenses liées :

- au métabolisme de base, c'est la composante principale (60-70%) de la dépense énergétique
- à la thermogénèse c'est le second poste de dépense énergétique
- à l'activité physique

#### III. 1. Le métabolisme basal

Il constitue la dépense énergétique mesurée le matin, au repos dans une ambiance thermique agréable (neutralité thermique, 20-22 °C), 12 à 14 heures après le repas de la veille et au calme psychique (c'est-à-dire sans activité intellectuelle importante, une préoccupation cérébrale excessive induit, entre autre, une tension musculaire, qui accroît les dépenses énergétiques). Le métabolisme basal correspond à la dépense énergétique nécessaire à la vie des cellules, au maintien des gradients électrochimiques, au fonctionnement des appareils assurant les grandes fonctions (circulation, respiration, excrétion, tonus musculaire) et au maintien de la température corporelle.

Il convient de distinguer métabolisme basal et métabolisme de repos. Le métabolisme de repos est mesuré sur un sujet sédentaire et debout (ni à jeun, ni le matin au réveil).

La valeur du métabolisme basal est estimée chez l'adulte à 1650 kcal chez l'homme et à 1300 kcal chez la femme pour 24 heures.

Il est important de noter qu'environ 60% du métabolisme basale est dû à la dépense énergétique d'organes comme le foie, les reins, le cerveau et le cœur qui ne représentent que 5 à 6% de la masse corporelle. Le tissu adipeux ainsi que les os, la peau, n'interviennent que très peu dans le métabolisme basal. Ainsi, la composition corporelle influence le métabolisme basal qui va dépendre essentiellement de la masse maigre (Figure 2). Par exemple, une personne ayant une proportion de muscle importante aura un métabolisme basal supérieur à une personne présentant une forte adiposité. Ceci explique les différences de métabolisme basal observées en fonction du sexe : un homme présente un métabolisme basal de 5 à 8% plus élevé que celui d'une femme de taille, de poids et d'âge égaux. La femme possède une proportion de masse maigre plus faible. Il en est de même pour l'effet de l'âge : en

vieillissant, la masse maigre diminue et le métabolisme basal est diminué en conséquence. On remarque une diminution du métabolisme basal de 2 à 3% par décennie après l'âge adulte.

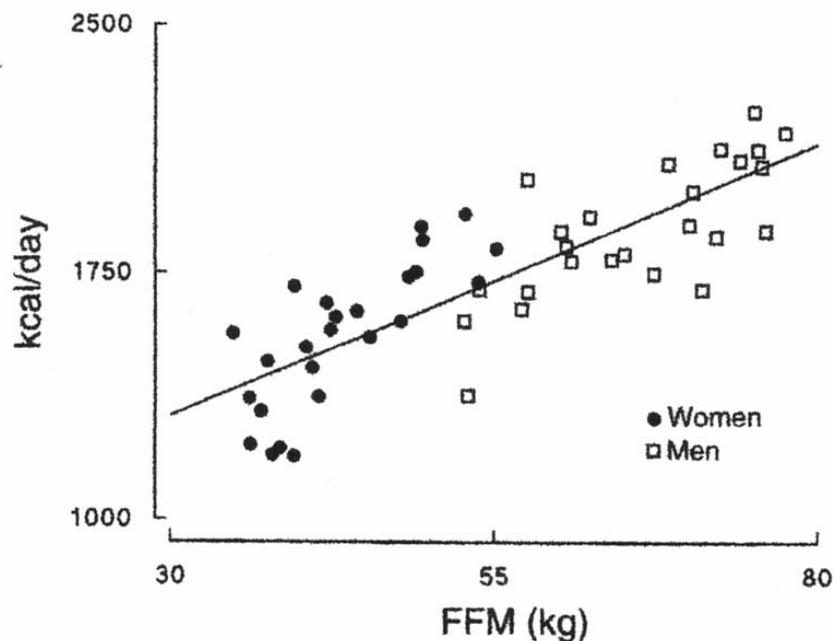
Une étude récente reprenant un très grand nombre de données métaboliques obtenues chez différentes espèces de mammifères a montré que le métabolisme basal était proportionnel à la masse corporelle à la puissance 2/3 (White et Seymour, 2003).

Certaines hormones stimulent le métabolisme basal. La thyroxine et la norépinéphrine sont les principaux régulateurs du métabolisme. L'hypothyroïdie provoque une diminution du métabolisme basal (de 30 à 50%) alors que l'hyperthyroïdie se traduit notamment par une augmentation du métabolisme basal.

Le stress affecte aussi le métabolisme basal. Le stress stimule le système nerveux sympathique; il y a alors libération d'adrénaline et le métabolisme basal est augmenté.

Une sous-alimentation va engendrer une diminution, pouvant aller jusqu'à 20%, du métabolisme basal (Shibata et Buckowiecki, 1987).

Au cours de la phase de croissance, on observe une plus forte dépense énergétique toutes proportions gardées (par rapport au poids et à la taille). Ceci est dû à la valeur énergétique des tissus gagnés et au coût énergétique de la synthèse des constituants de ces tissus. Par exemple la synthèse d'une liaison peptidique nécessite un apport énergétique de 3 Kcal.



**Figure 2. Dépense énergétique au repos chez la femme et chez l'homme en fonction de leur masse maigre (FFM) (d'après Nielsen et al, 2003).**

### **III. 2. Dépense énergétique liée au travail musculaire**

L'activité physique spontanée représente 8 à 20% de la dépense énergétique quotidienne totale chez une personne sédentaire (Ravussin et al, 1986), mais cette part est très variable et elle peut atteindre jusqu'à 60% de la dépense énergétique totale lors d'efforts prolongés.

Le rendement du travail musculaire est de l'ordre de 20 à 25%, le reste de l'énergie est «gaspillé» sous forme de chaleur.

### **III. 3. La thermogénèse**

Dans des conditions de thermoneutralité et au repos, le maintien de la température de l'organisme dans des valeurs compatibles avec son fonctionnement fait partie de la thermogénèse associée au métabolisme de base.

On distingue également une thermogénèse associée à l'alimentation. La digestion des aliments et la mise en réserve des nutriments sont des activités qui nécessitent de l'énergie. Cette dépense énergétique représente en moyenne 200 kcal journaliers, soit environ 10% à 14% de la prise alimentaire. Le stockage du glucose sous forme de glycogène demande 3% à 5% de l'énergie contenue dans le glucose, la lipogénèse à partir de glucose représente 25% de l'énergie contenue dans les glucides. Le stockage des lipides alimentaires dans le tissu adipeux ne représente qu'environ 2% et celui des protéines est le plus élevé, de l'ordre de 24% de l'énergie contenue dans les nutriments.

Une autre source de thermogénèse liée à l'alimentation est la thermogénèse posprandiale. Suite à un repas, surtout s'il est riche en glucide, il va y avoir activation du système nerveux sympathique et stimulation de l'activité thermogène du tissu adipeux brun, essentiellement. Une mauvaise efficacité de la thermogénèse postprandiale peut être à l'origine du développement de l'obésité chez le rat et dans une moindre mesure chez l'homme (Glick et al, 1984).

Bien sûr, le froid va provoquer une augmentation de la thermogénèse par différents mécanismes :

le frisson thermique qui est une contraction rythmique involontaire des muscles et qui peut augmenter la thermogénèse d'un facteur 3 à 5 chez l'homme.

La thermogénèse sans frisson qui se fait essentiellement au niveau du tissu adipeux brun. Les membranes internes des mitochondries des adipocytes possèdent des protéines découplantes (UCP) qui vont permettre le passage des protons. Ce passage de protons à travers les UCP se fait avec production de chaleur. Les UCP vont utiliser le gradient de proton de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale pour produire de la chaleur au lieu de produire de l'ATP.

## IV. RÉTROCONTROLE PÉRIPHÉRIQUE DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE

En raison de la relative stabilité des réserves énergétiques et en dépit de la quantité phénoménale d'énergie qui transite dans l'organisme, on admet que le bilan énergétique et les réserves de graisse et le poids du corps constituent des variables extrêmement régulées. Cependant pour assurer cette régulation, le cerveau a besoin d'informations sur les fluctuations des réserves énergétiques.

La cholecystokinine, la bombésine, l'enterostatine et le glucagon-like peptide 1 sont des hormones sécrétées au niveau de l'intestin. Elles ont des effets inhibiteurs sur la prise alimentaire. Il en est de même pour les informations sensorielles en provenance des récepteurs du goût et des mécanorécepteurs du tractus digestif (Berthoud, 2002). Cependant ces informations provenant au système nerveux central n'interviennent que dans une régulation de la prise alimentaire à court terme. Deux hormones, l'insuline et la leptine, sécrétées en fonction de la quantité des réserves énergétiques de l'organisme, vont avoir des effets à long terme sur la régulation de la balance énergétique, aussi bien au niveau des entrées que des dépenses énergétiques.

### IV. 1. La leptine

On a longtemps considéré le tissu adipeux blanc comme un simple tissu de mise en réserve lipidique, d'isolant thermique ou mécanique. Mais dans les années 90, on a montré la capacité sécrétrice et endocrine des adipocytes. Parmi les facteurs libérés par les adipocytes, la leptine joue un rôle important dans le contrôle de la balance énergétique en informant les centres régulateurs de la quantité de réserves lipidiques disponible.

#### IV. 1. A. Découverte

Le concept selon lequel la masse adipeuse peut être régulée *via* des facteurs circulants sécrétés par le tissu adipeux (« théorie du lipostat ») résulte d'expériences de parabiose entre rats normopondéraux et des rats rendus obèses suite à une lésion de l'hypothalamus (Kennedy, 1953, Hervey, 1958) ainsi qu'entre souris obèses de génotypes *ob/ob* et *db/db* (Coleman, 1978). Cette hypothèse a été validée en 1994, lorsque l'équipe de Friedman a réussi à cloner le gène *ob* chez la souris et chez l'homme et montrer son implication dans les dérèglements du contrôle de la masse adipeuse (Zhang et al, 1994, Halaas et al, 1995, Maffei et al, 1995).

#### *IV. 1. B. La protéine*

Le gène *ob* est à l'origine de la synthèse de la leptine, une protéine de 146 acides aminés. Après traduction, cette protéine de 18 kDa perd un peptide signal de 2kDa et se retrouve dans la circulation sous une forme de 16 kDa n'ayant pas subi de modifications post-traductionnelles. Il existe une forte homologie de l'ARNm *ob* entre diverses espèces de mammifères (Zhang et al, 1994) et la structure de la protéine leptine présente une bonne conservation phylogénique (84% d'homologie entre la protéine de souris et la protéine humaine) (Ahima et Flier, 2000). Cette protéine est principalement synthétisée par les adipocytes mais pas par les préadipocytes (Leroy et al, 1996). La leptine est également sécrétée en moindre mesure par le placenta (Gavrilosa et al, 1997, Masuzaki et al, 1997, Hoggard et al, 1997), par l'estomac (Bado et al, 1998), les glandes mammaires, les cellules endothéliales, les glandes surrénales, les muscles squelettiques (Wang et al, 1998) et l'expression du gène codant pour la leptine a été observée également dans le cerveau, au niveau de l'hypothalamus, du cervelet, du cortex et de l'hypophyse (Morash et al, 1999).

#### *IV. 1. C. Les récepteurs à la leptine*

La mutation du gène codant pour le récepteur à la leptine est responsable du développement de l'obésité consécutive au développement d'une résistance à la leptine (souris *db/db*). Le récepteur à la leptine correspond à une longue protéine transmembranaire de la famille gp130 des récepteurs aux cytokines. Il existe plusieurs isoformes de cette protéine se distinguant par la longueur de leur domaine intracellulaire : 4 formes courtes, Ob-Ra (domaine intracellulaire de 34 acides aminés) quasiment ubiquitaire, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re (qui est une forme circulante) (Huang et al, 2001) et une forme longue Ob-Rb (domaine intracellulaire de 303 acides aminés) qui est la plus impliquée dans la régulation de la balance énergétique par la leptine (Ahima, 2000). Au niveau central, ce récepteur est principalement localisé dans plusieurs **noyaux hypothalamiques** tels que le noyau arqué, l'hypothalamus ventromédian, le noyau paraventriculaire et l'hypothalamus dorsomédian (Mercer et al, 1996, Fei et al, 1997). Cependant, le récepteur Ob-Rb a été trouvé également dans le noyau du tractus solitaire, les noyaux parabrachial, cochleair, trigeminal, le locus coeruleus et l'olive inférieure, (Williams et al, 1999, Grill et al, 2002). En périphérie, des isoformes du récepteur à la leptine ont été localisées au niveau des adipocytes (Kielar et al, 1998), des muscles squelettiques (Liu Y et al, 1997), dans le foie et la glande surrénale (Glasow et Bornstein, 2000).

#### IV. 1. D. Régulation de l'expression et de la libération de la leptine

Chez les rongeurs, la sécrétion de leptine par les adipocytes semble être doublement régulée.

La première régulation de cette sécrétion est directement en relation avec la **quantité de masse adipeuse**. L'expression du gène de la leptine varie avec le pourcentage de masse adipeuse corporelle (Maffei et al, 1995, Caprio et al, 1996, Considine et al, 1996, Frederich et al, 1995, Lonqvist et al, 1997, Shimizu et al, 1997). Le taux de leptine plasmatique augmente avec la masse corporelle (et la masse adipeuse) et baisse lors d'une perte de poids chez un animal donné. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues *in vitro* suggérant que la sécrétion de leptine reflète l'hypertrophie adipocytaire.

Une seconde voie de régulation de la sécrétion de la leptine non dépendante de la masse adipeuse existe également. **La prise alimentaire** stimule la sécrétion de leptine pendant 3 à 4 heures (Thompson 1996, Levy et al, 1997). Cependant, le type d'alimentation ne semble pas avoir d'effet à court terme (Ainslie et al, 2000). Des résultats obtenus *in vitro*, montrent que la diminution de l'expression du gène *ob* après le jeûne et son augmentation après réalimentation sont liées à un effet transcriptionnel direct de l'insuline (Saladin et al, 1995, Trayhurn et al, 1995, Hardie et al, 1996, Leroy et al, 1996, Zheng et al, 1996, Koopmans et al, 1998). A l'inverse de l'insuline, une **exposition au froid** (4°C) de 24H engendre une diminution de la leptine circulante (Hardie et al, 1996). Cette diminution est liée à la stimulation du système sympathique. En effet, l'administration de **noradrénaline** à des animaux laissés à température ambiante engendre une diminution rapide et importante de la sécrétion de leptine (Trayhurn et al, 1995). Ceci est en accord avec les résultats obtenus *in vitro* sur la diminution de leptine par les adipocytes murins en réponse aux agonistes  $\beta$ 3-adrénergiques (Getty, 1996). On retrouve cette suppression de l'expression du gène *ob* chez l'homme suite à un traitement à base d'adrénaline (Carulli et al, 1999). Par ailleurs, les **œstrogènes** jouent un rôle stimulateur alors que les androgènes jouent un rôle inhibiteur sur les concentrations de leptine circulante (Elbers et al, 1997). Le traitement par des **glucocorticoïdes** entraîne une augmentation rapide et dose-dépendante des ARNm codant pour la leptine dans le tissu adipeux blanc (De Vos et al, 1995). Les **cytokines** (TNF- $\alpha$ , Tumor-Necrosis-Factor ; IL-1, InterLeukine-1) modulent positivement la sécrétion de leptine par les adipocytes (Kirchgessner et al, 1997).

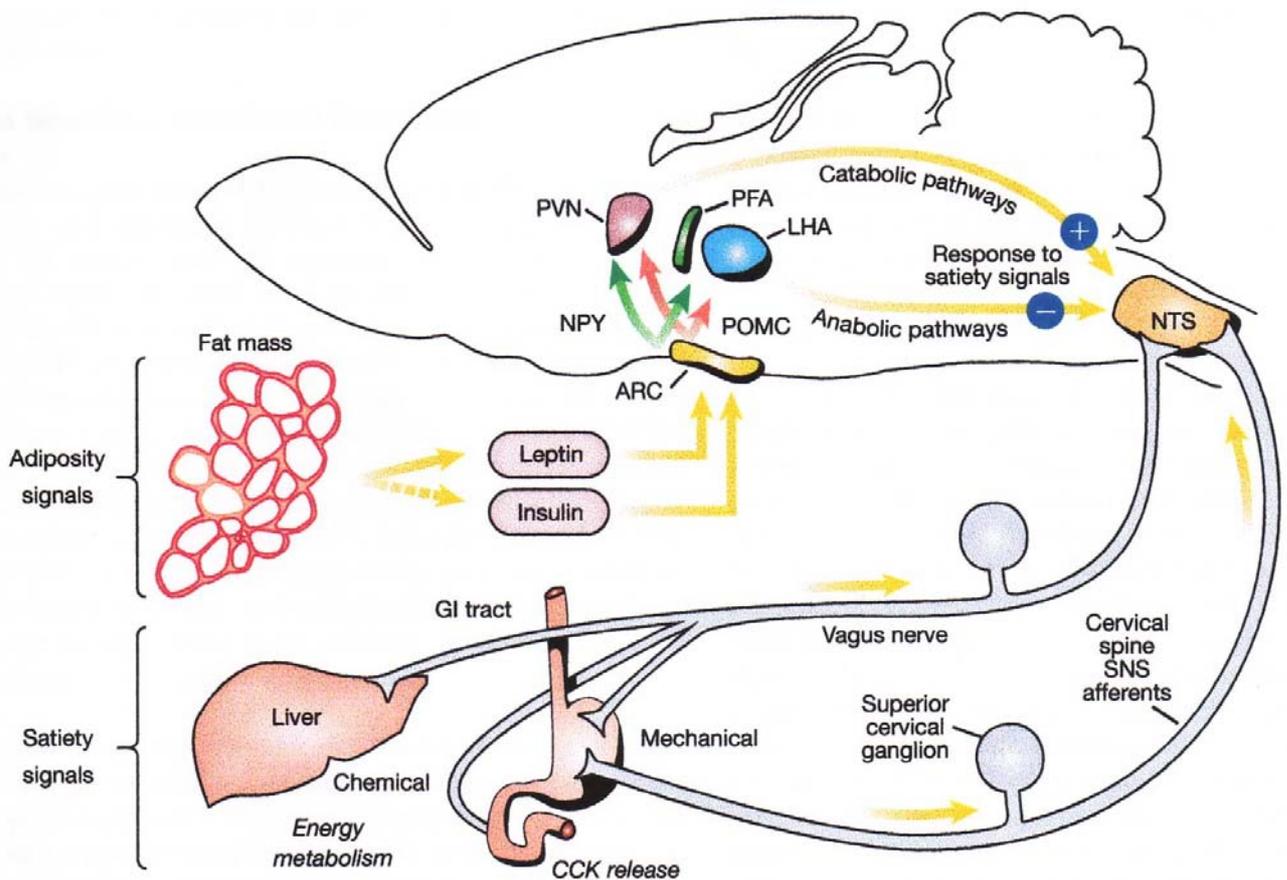
#### *IV. 1. E. Rôles de la leptine*

Bien que rares chez l'homme, des mutations du gène codant pour la leptine (Montague et al, 1997, Strobel et al, 1998) ou pour son récepteur (Clément et al, 1998) ont été découvertes chez des patients souffrant d'obésité. Ces patients ont un comportement hyperphagique, mais ne développent pas de résistance sévère à l'insuline. Leur puberté est généralement retardée de façon importante, suggérant que le rôle de la leptine n'est pas limité au contrôle de la balance énergétique chez l'homme.

La leptine est fréquemment considérée comme une hormone permettant de diminuer la masse du tissu adipeux. Elle agit sur la prise alimentaire grâce à ses **propriétés anorexigènes** et **elle augmente la dépense énergétique** (Figure 3). Cependant, il est possible que l'action principale de la leptine ne soit pas de diminuer la masse adipeuse. Elle représenterait plutôt un signal permettant de préserver un stock suffisant d'énergie sous forme de graisse (Rosenbaum et Leibel, 1999). La quantité de leptine circulante, corrélée à la masse de tissu adipeux, est le reflet de l'état de ce stock. Or la variation de la quantité relative de leptine produite par les adipocytes est beaucoup plus sensible à la baisse qu'à l'augmentation de poids. Une diminution de la lipémie lors d'une perte de poids signifierait donc une réduction des réserves d'énergie, et aurait pour conséquence une adaptation de l'organisme, en vue d'un retour à des quantités suffisantes de réserves : hyperphagie, stockage préférentiel de calories sous forme de graisse et, chez la souris, baisse de la dépense énergétique (Michalik et al, 2000). L'administration intracérébro-ventriculaire de leptine se traduit par une inhibition de la prise alimentaire. Cet effet anorexigène est accompagnée d'une situation métabolique au cours de laquelle l'organisme utilise de plus en plus de glucose (Kamohara et al, 1997). L'effet anorexigène de la leptine se fait par son action sur la régulation de la disponibilité du NPY et de la protéine Agouti, deux molécules augmentant la prise alimentaire, au niveau des neurones AgRP /NPY du noyau arqué (Morton et Schwartz, 2001). En effet, les récepteurs à la leptine Ob-Rb sont coexprimés dans le noyau arqué qui est un noyau hypothalamique très riche en cellules exprimant le NPY. La leptine inhibe l'expression du NPY dans le noyau arqué de souris obèses (*ob/ob*) (Stephens et al, 1995). De plus, la leptine active les neurones hypothalamiques exprimant la pro-opiomelanocortine (POMC) (Thornton et al, 1997), un neuropeptide anorexigène.

**La leptine stimule l'utilisation du glucose** au niveau des muscles, du tissu adipeux brun mais pas dans le tissu adipeux blanc (Wang et al, 1999). Cette action spécifique sur le métabolisme du glucose s'effectue via **le système nerveux sympathique** (Haque et al, 1999).

La leptine est un modulateur positif de l'activité catécholaminergique du tissu adipeux et en retour cette activation catécholaminergique module la sécrétion de la leptine. Une injection intraveineuse de leptine augmente l'activité de nerfs sympathiques, notamment au niveau des fibres innervant le tissu adipeux brun (impliqué dans la thermogenèse), les reins et la glande surrénale (Haynes et al 1998, Dunbar et al, 1997). Par ailleurs, une injection intracerebroventriculaire de leptine augmente l'activité sympathique dans le tissu adipeux brun (Haynes et al, 1998). La libération de catécholamines suite à une injection de leptine se fait sous le contrôle de l'hypothalamus ventromédian (Satoh et al, 1999). La leptine augmente la lipolyse dans le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun via l'activation du système sympathique mais également via des mécanismes autocrines ou paracrines (Fruhbeck et al, 1997).



**Figure 3. Rétrocontrôle périphérique par les fibres sensorielles, la leptine et l'insuline sur les centres régulateurs de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (D'après Schwartz et al, 2000).** ARC, noyau arqué ; CCK, cholécystokinine ; LHA, hypothalamus latéral ; NPY, neuropeptide Y ; PFA, aire périfornicale ; POMC, pro-opiomélanocortine ; PVN, noyau hypothalamique paraventriculaire.

Il est intéressant de noter que l'augmentation de l'activité sympathique observée par Haynes et al (1997) suite à une injection de leptine ne se traduit pas par une augmentation de la pression artérielle. Sur des rats sympathectomisés, Lembo et al (2000) ont montré un effet hypotenseur de la leptine par son action vasodilatatrice directe sur les vaisseaux.

La leptine joue un rôle régulateur sur **la sécrétion de l'insuline** (Cohen et al, 1996) et sur **la sensibilité périphérique à l'insuline**. La leptine a une action périphérique directe sur l'adipocyte de rat se traduisant par une diminution de leur sensibilité à l'insuline et une diminution du transport du glucose (Müller et al, 1997). De plus des souris homozygotes pour une mutation *ob* du gène codant pour la synthèse de la leptine, développent une résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Kahn et Flier, 2000). Toutefois il faut noter que ces études réalisées *in vitro* sont en désaccord avec les études *in vivo* montrant qu'une injection chronique de leptine améliore chez le rat la sensibilité à l'insuline (Sivitz et al, 1997).

La leptine intervient également dans la régulation d'autres systèmes comme le système reproducteur, le métabolisme osseux, le système immunitaire.

L'infertilité des souris déficientes en leptine serait due à un manque d'hormones hypothalamiques et hypophysaires. L'importance du rôle de la leptine dans la **maturation du système reproducteur** est démontrée par la capacité de la leptine à initier la puberté et restaurer la fertilité chez des souris femelles *ob/ob* (déficientes en leptine) et d'accélérer la puberté chez des souris sauvages (Ahima et al, 1997).

Des études *in vitro* ont montré que la leptine augmentait l'apparition de nodules osseux sur des cultures de cellules dérivées de moelles osseuses de rat (Iwaniec 1998). Ces données confirment les études *in vivo* qui montrent que des souris *ob/ob* répondent à des injections de leptine par une augmentation du nombre d'ostéoblastes. Cette action sur le tissu osseux se fait directement via les récepteurs à la leptine situés sur les ostéoclastes et les ostéoblastes et indirectement par l'action de la leptine sur l'axe hypothalamo-hypophysaire via la régulation de la **libération d'hormone de croissance et de somatostatine** (Quintela et al, 1997). La leptine régule la formation osseuse également par l'intermédiaire du système nerveux sympathique (Takeda et al, 2002).

Au niveau du **système immunitaire**, l'activation des récepteurs à la leptine sur les cellules CD4<sup>+</sup> agit sur la production de lymphocytes T. Il existe une forte corrélation entre le

niveau de leptine plasmatique et le nombres de leucocytes chez les individus obèses (Wilson et al, 1997).

La leptine stimule également l'activité du **système à corticolibérine** (Schwartz et al, 1996) qui module l'activité de l'axe hypophyso-corticosurrénalien en réponse à un stress.

#### *IV. 1. F. Rythme circadien de la sécrétion de leptine*

On observe une variation circadienne de la concentration plasmatique de leptine. Chez la souris, la sécrétion de leptine est la plus faible 2 heures après le début de la période nocturne, ensuite on observe une augmentation commençant 6 heures après le début de la période nocturne avec un pic au début de la période diurne. Ensuite, il y a une baisse progressive au cours de la journée (Kalra et al, 1999). Saladin et al (1996) ont montré une augmentation de la synthèse de l'ARNm de la leptine dans les adipocytes durant la période nocturne chez la souris. Chez le rat, cette augmentation apparaît plus rapidement au début de la période nocturne pour décroître progressivement (Xu et al, 1999). Ces augmentations de sécrétion de la leptine sont corrélées avec la prise alimentaire et serviraient de signal à l'hypothalamus afin de diminuer l'appétit. Cette diminution de l'appétit se prolongerait durant la période diurne (Kalra et al, 1999).

#### *IV. 1. G. Leptine et vieillissement*

La concentration de leptine plasmatique est très élevée chez des sujets obèses. Cependant, l'obésité persiste en dépit de ce taux élevé de leptine qui devrait normalement provoquer une perte de poids (Caro et al, 1996). Il a été suggéré que l'obésité aussi bien chez l'homme que chez les animaux était associée à une résistance à la leptine (Caro et al, 1996, Van Heek et al, 1997, Halaas et al, 1997). Cette résistance à la leptine serait à la fois le résultat d'une trop grande quantité de leptine circulante et également le résultat d'une suppression du contrôle par la leptine de la quantité d'ARNm du NPY dans l'hypothalamus (Scarpace et al, 2000). Des études menées au cours du vieillissement, sur des rats en restriction alimentaire montrent que la résistance à la leptine pourrait être due à l'effet de l'âge en soi et non à l'excès de masse adipeuse (Gabriely et al, 2002). Les rats âgés présentent une diminution de la quantité de récepteurs à la leptine au niveau de l'hypothalamus (Fernandez-Galaz et al, 2001) et présentent également une altération de la transduction du signal des récepteurs à la leptine (Scarpace et al, 2001).

Bien que la thérapie à l'aide de la leptine soit efficace dans certaines formes d'obésités, elle semble quand même limitée par le grand nombre de degrés d'insensibilités à la leptine observé dans les cas d'obésités humaines (Heymsfield et al, 1999). Ainsi, les réponses à l'administration exogène de leptine varient suivant si on a affaire à une obésité liée à une déficience en production de leptine ou alors à une résistance à la leptine. Suite aux premiers essais mitigés de traitement de l'obésité par la leptine, d'autres études sont menées avec seulement des fragments de la protéine (Gonzales et al, 1999).

## **IV. 2. L'insuline**

### *IV. 2. A. Découverte*

L'histoire de la découverte de l'insuline est surprenante, non pas tant par la démarche scientifique qui a abouti à sa caractérisation que par les rebondissements liés à l'attribution de cette découverte.

P Langerhans décrit en 1869 l'anatomie du pancréas et la structure particulière des îlots. Vingt ans plus tard Minkowski et Von Mering parviennent à recréer un diabète expérimental chez le chien par pancréatectomie, ce qui va lier la découverte de l'insuline aux études sur le diabète. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, différents types d'extraits de pancréas furent injectés ou donnés à des patients diabétiques. Entre 1902 et 1904, Reenie et Fraser utilisent des extraits de poissons, en 1906, Zuelzer tire du coma un diabétique avec des injections d'extrait de pancréas, en 1920 Garin observe les effets hypoglycémiant d'un extrait de pancréas chez l'homme. En 1923, le prix Nobel est attribué à Banting et à Macleod pour la découverte de l'insuline en 1921. Cet événement provoqua de nombreuses controverses. Tout d'abord, concernant la participation effective de Macleod à cette découverte (ce dernier était le directeur de Banting mais était absent lors des travaux expérimentaux). De plus, les détracteurs de Banting, affirmèrent qu'il s'était largement inspiré de travaux de Paulesco, un chercheur roumain et qu'il avait participé à son discrédit scientifique pour s'attribuer à lui seul la découverte. Macleod découvrant le « complot » aurait menacé Banting de dévoiler l'affaire s'il ne lui concédait pas en partie la paternité de la découverte de l'insuline (« The discovery of insulin » de Michael Bliss, 1982).

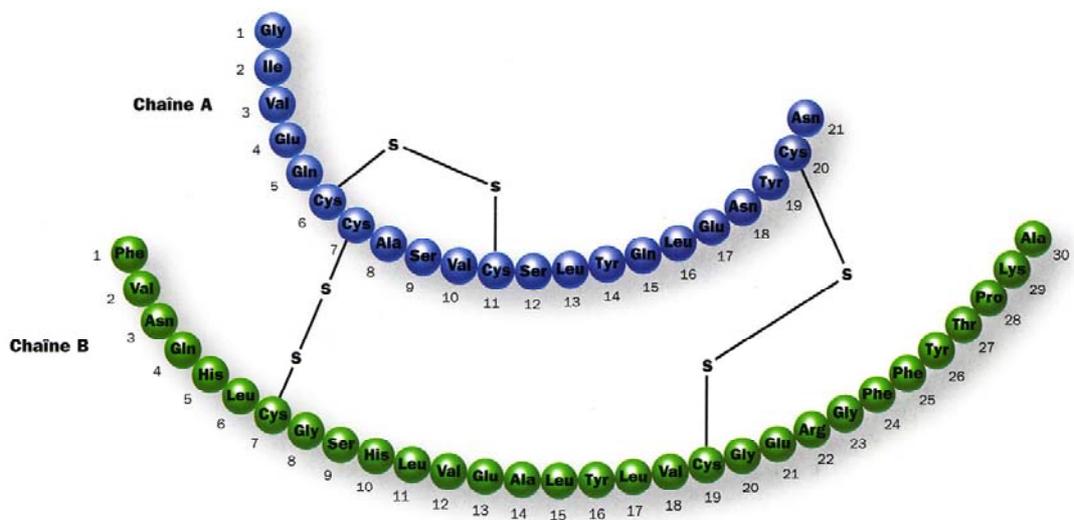
En 1955 Sanger décrit la structure biochimique de l'insuline, il recevra le prix Nobel en 1956. La découverte du principe de transpeptidation permet en 1978 d'obtenir de l'insuline humaine à partir de l'insuline porcine (qui ne diffèrent que d'un acide aminé). Dès 1980, de

l'insuline humaine sera produite par génie génétique, suite à l'insertion dans un plasmide bactérien de la séquence d'ADN codant pour l'insuline humaine.

#### IV. 2. B. La protéine

L'insuline est une protéine de 51 acides aminés d'un poids moléculaire de 5734 Da. Elle est constituée de 2 chaînes : la chaîne A de 21 acides aminés et la chaîne B de 30 acides aminés (Figure 4). Elle possède une bonne homologie d'enchaînement des acides aminés entre les différentes espèces animales (un seul acide aminé de différence entre l'insuline humaine et l'insuline porcine, 3 avec l'insuline bovine).

L'insuline est synthétisée au niveau des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans dans le pancréas. L'ARNm de l'insuline est traduit en pré-proinsuline qui est clivée en proinsuline dans le réticulum endoplasmique granuleux. Cette proinsuline est convertie dans l'appareil de Golgi en peptide C et en insuline qui est stockée dans des granules de sécrétion.



**Figure 4. Structure de l'insuline.**

La molécule est constituée de deux chaînes respectivement de 21 et 30 acides aminés respectivement reliées entre elles par des liaisons bisulfures.

#### *IV. 2. C. Le récepteur à l'insuline*

Le récepteur à l'insuline présent sur la plupart des cellules est constitué de l'assemblage de 2 chaînes  $\alpha$  (entièrement extracellulaires) et de 2 chaînes  $\beta$  (transmembranaires). Chez l'homme, il existe deux isoformes du récepteur à l'insuline, INSRA (forme courte, présente essentiellement dans le cerveau et les cellules circulantes) et INSRB (forme longue, présente essentiellement dans le foie) (Seino et al, 1989). Les éventuelles différences d'affinité pour l'insuline et ses récepteurs restent encore discutées (Whittaker J et al, 2002). Suite à la fixation de l'insuline sur son récepteur, il y a activation de la tyrosine-kinase qui va relayer l'action biologique de l'insuline au niveau intracellulaire.

#### *IV. 2. D. Régulation de la synthèse et de la libération d'insuline*

L'élément majeur de régulation de la sécrétion de l'insuline est le glucose.

Il existe au niveau des cellules  $\beta$  des transporteurs au glucose GLUT-2 qui permettent d'atteindre de manière très rapide un équilibre de concentration en glucose entre le milieu intra- et extracellulaire (Guillam et al, 2000). Le glucose entrant dans la cellule  $\beta$  va augmenter la réaction de glycolyse et le changement du degré d'oxydoréduction de certains composés cellulaires va engendrer la fermeture des canaux  $K^+$  ATP dépendant et l'entrée massive de  $Ca^{2+}$  provoquant ainsi l'exocytose de l'insuline (Matschinsky, 1990). Par ailleurs, le glucose a une action directe sur certains phospholipides membranaires, ce qui permet la libération du  $Ca^{2+}$  contenu dans le réticulum endoplasmique granuleux. De manière plus tardive (après 6 minutes), il y a activation de la kinase C qui déclenche la sécrétion d'insuline.

La demi-vie de l'insuline dans le sang est de 3 à 4 minutes. Elle circule sous forme libre. A chaque passage vasculaire, le foie catabolise environ 50% de l'insuline circulante. D'autres tissus catabolisent l'insuline : le rein (30 à 40%), le pancréas, les testicules et le placenta (chez la femme enceinte).

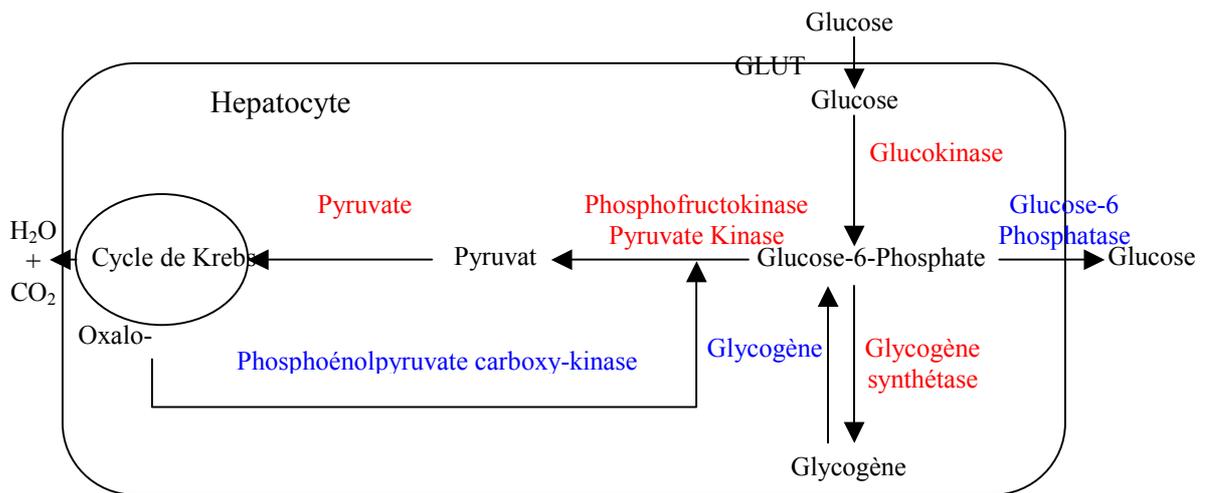
#### *IV. 2. E. Rôles de l'insuline*

D'une manière générale, l'insuline augmente l'utilisation du glucose et diminue sa production.

Tout d'abord, l'insuline agit sur les transporteurs du glucose, afin de faciliter l'entrée du glucose dans les cellules.

**Le foie** est le principal site d'action de l'insuline. Le glucose pénètre dans les hépatocytes via le transporteur du glucose GLUT-2. La glucokinase transforme le glucose en

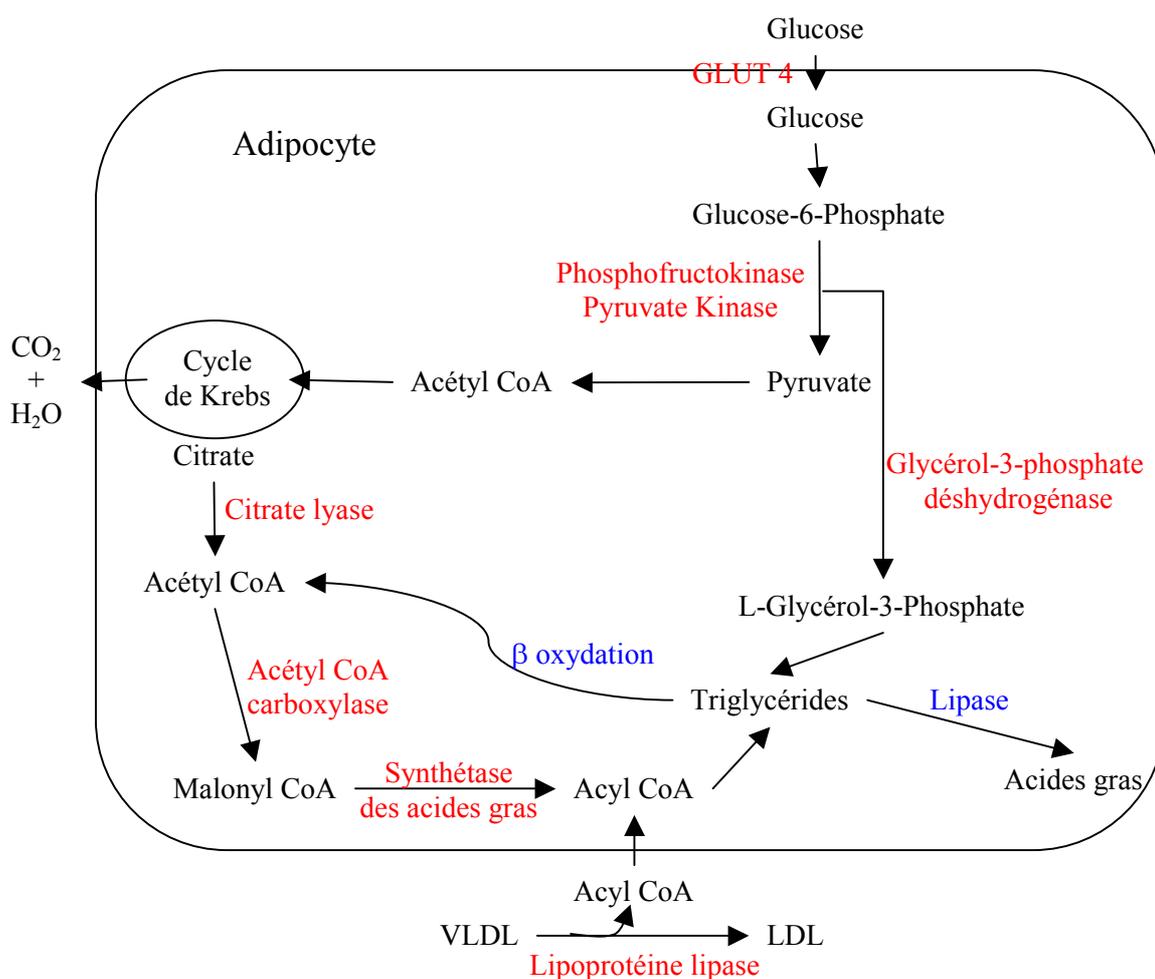
glucose-6-phosphate qui peut soit suivre la glycolyse soit être transformé en glycogène grâce à la glycogène synthétase. L'insuline provoque la diminution de la quantité de glucose au niveau de l'hépatocyte en activant ces deux enzymes (Matschinsky, 1990). Par ailleurs l'insuline inhibe la glycogénolyse ainsi que la néoglucogenèse en jouant sur les enzymes clés de ces réactions (Pugazhenthii et Khandelwal, 1995) (Figure 5). Le foie devient ainsi un organe capteur du glucose.



**Figure 5. Action de l'insuline sur le métabolisme du glucose dans les hépatocytes**  
**Enzymes activées par l'insuline**

Au niveau du **muscle**, le glucose pénètre dans la cellule grâce à un transporteur GLUT-4 insulino-dépendant (Zisman et al, 2000). L'insuline va ensuite stimuler la glycogénolyse et en moindre mesure la glycolyse.

Comme dans le muscle, le glucose pénètre (mais en moins grande quantité) dans les **adipocytes** grâce au transporteur GLUT-4, ensuite il peut être soit oxydé soit être stocké sous forme de triglycérides, par activation de la synthèse d'acyl coenzyme A et de la synthèse d' $\alpha$ -glycérophosphate (Figure 6). De plus elle favorise l'entrée dans les adipocytes des acides gras circulant en activant la lipoprotéine lipase (Kern et al, 1985, Pradines-Figueres et al, 1988).



**Figure 6. Action de l'insuline sur le métabolisme du glucose au niveau des adipocytes**  
 Enzymes activées par l'insuline  
 Enzymes inhibées par l'insuline

Dans le **cerveau**, le glucose passe la barrière hématoencéphalique par l'intermédiaire du transporteur GLUT-1 mais ce transfert semble indépendant de l'insuline (Hasselbalch et al, 1999). L'insuline intervient directement au niveau du système nerveux central dans la régulation de la balance énergétique. Une injection d'insuline au niveau central, engendre une baisse de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (Woods et al, 1979). Récemment, Obici et al (2002) ont rendu des rats hyperphagiques en injectant au niveau central des anti-sens dirigés contre l'expression des récepteurs à l'insuline. L'insuline inhibe l'expression de l'ARNm du NPY, un neuropeptide orexigène, dans l'hypothalamus (Schwartz et al, 1992).

Mais, si les principaux organes cibles de l'insuline sont le foie, le tissu adipeux et les muscles il existe des récepteurs à l'insuline sur la plupart des tissus : hématies, lymphocytes, fibroblastes, tissu placentaire, cellules tubulaires rénales (Desoye et al, 1994).

## V. PRINCIPALES STRUCTURES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL IMPLIQUÉES DANS LA RÉGULATION DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE

La prise alimentaire est tributaire de deux sensations, la faim qui conduit à la prise alimentaire et la satiété qui détermine la fin de la prise alimentaire. Ces deux sensations sont très finement régulées au niveau du système nerveux central.

*Les noyaux hypothalamiques sont les principales structures centrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire.*

De nombreuses études expérimentales de lésions ont mis en évidence le rôle prépondérant des noyaux hypothalamiques dans la régulation de la prise alimentaire. A l'exception d'une lésion de l'hypothalamus latéral qui provoque une hypophagie (Powley et al, 1970, De Luca et al, 1987), une lésion des noyaux arqué, ventromédian, dorsomédian ou paraventriculaire engendre une augmentation de la prise alimentaire (Hetherington et Ranson, 1940, Poon et Cameron, 1978, Tanaka et al, 1978, Meister et al, 1989). L'hypothalamus est subdivisé en près de 40 noyaux. Les six noyaux décrits ci-après sont ceux les plus impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire (Figure 7).

Les structures telencéphaliques comme le noyau accumbens, l'hippocampe ou le cortex préfrontal interviennent dans le contrôle du comportement alimentaire mais plus par leur rôle dans la notion de plaisir et dans la mémorisation des sensations associées à l'alimentation.

### *Le noyau arqué*

Il est situé à la base de l'hypothalamus en dessous du noyau hypothalamique ventromédian. Sa position est stratégique du fait de l'absence de barrière hématoencéphalique à son niveau, il est en relation directe avec les signaux périphériques comme la leptine, l'insuline, le glucose et les glucocorticoïdes. Il contient une grande densité de neurones produisant des peptides orexigènes, tels que le neuropeptide Y (NPY) (Chronwall, 1985), la galanine (Merchenthaler et al, 1993), la pro-opiomelanocortine (POMC), la  $\beta$ -endorphine (Khachaturian et al, 1985), des acides aminés avec le glutamate et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) stimulant également la prise alimentaire (Meister et Hökfelt, 1988). On trouve également dans le noyau arqué des cellules produisant la protéine Agouti qui est un

antagoniste des récepteurs de la mélanocortine (MC3-R et MC4-R), une molécule anorexigène (Kieffer et al, 1998).

#### *Le noyau hypothalamique ventromédian*

Jusqu'à présent la synthèse de signaux orexigènes ou anorexigènes n'a pas été mise en évidence dans le noyau hypothalamique ventromédian. Cependant les expériences de stimulation de ce noyau à l'aide de NPY ou de galanine (Stanley et al, 1985, Kyrkouli et al, 1990) stimulent la prise alimentaire alors que l'injection de leptine dans ce noyau inhibe la prise alimentaire (Jacob et al, 1997). Le noyau hypothalamique ventromédian reçoit des afférences de nombreux autres noyaux hypothalamiques et émet de nombreuses efférences vers ces noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. De plus il émet des efférences vers les noyaux préganglioniques du système nerveux autonome.

#### *L'hypothalamus latéral*

Ce noyau hypothalamique reçoit et émet un grand nombre de projections dans l'ensemble du cerveau. On trouve dans l'hypothalamus latéral des neurones glucosensibles. L'hypothalamus latéral est considéré comme un centre de la faim plutôt qu'un centre de la satiété. En effet une lésion de ce noyau engendre une perte de l'appétit avec une diminution de poids (Powley et Keeseey, 1970, De Luca et al, 1987). L'orexine, l'hormone melanin-concentrating (MCH), des peptides orexigènes, sont synthétisés au niveau de l'hypothalamus latéral.

#### *Le noyau hypothalamique dorsomédian*

Ce noyau reçoit essentiellement des efférences NPY du noyau arqué (Bai et al, 1985). Il possède également des corps cellulaires synthétisant du NPY. Dans les modèles d'obésité, l'expression de NPY est augmentée dans ce noyau (Kesterson et al, 1997). Par ailleurs, on retrouve dans le noyau dorsomédian des récepteurs de la leptine et des récepteurs de la cholecystokinine.

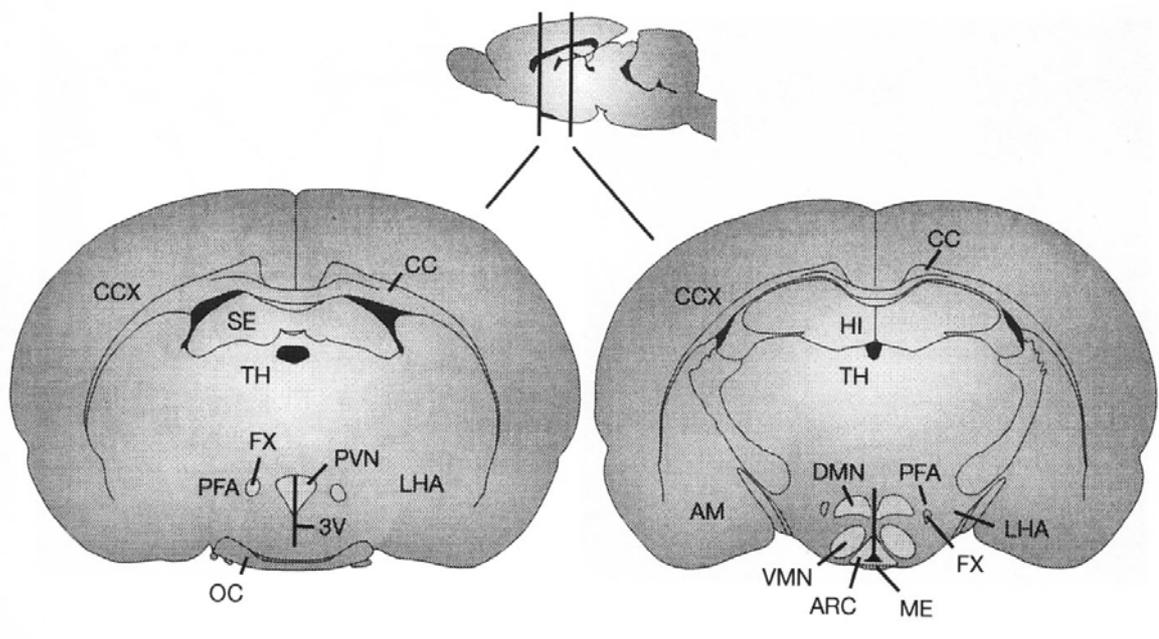
#### *Le noyau paraventriculaire*

L'injection dans ce noyau de nombreuses molécules orexigènes stimule la prise alimentaire, ce qui implique l'existence, dans ce noyau, de l'ensemble des récepteurs pour ces molécules (Kalra et al, 1999). Le noyau du tractus solitaire dans le tronc cérébral reçoit de nombreuses afférences viscérales et projette ensuite sur le noyau paraventriculaire. Le noyau

paraventriculaire est en étroite relation avec le noyau arqué, et il est le seul noyau hypothalamique dans lequel la quantité de NPY (un neuropeptide orexigène) est augmentée dans la période précédant la reprise alimentaire après le jeûne (Kalra et al, 1991). Le noyau paraventriculaire émet des projections sur les neurones produisant l'ocytocine, la vasopressine, la corticolibérine (CRH) et la tyroxine releasing hormone (TRH). De plus le noyau paraventriculaire possède des efférences sur les centres bulbopontiques contrôlant l'innervation sympathique et parasympathique.

#### *Le noyau suprachiasmatique*

La prise alimentaire est liée à la photopériode. Le noyau suprachiasmatique, considéré comme une horloge biologique interne, sensible à la photopériode, exerce une influence inhibitrice sur la prise alimentaire (Kalra et al, 1999).



**Figure 7. Localisation anatomique sur deux coupes frontales de cerveau de rat, des principaux noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la balance énergétique (D'après Schwartz et al, 2000).** ARC, noyau arqué ; DMN, noyau dorsomédian ; LHA, hypothalamus latéral ; PVN, noyau paraventriculaire ; VMN, noyau hypothalamique ventromédian.

*Comme résumé sur la figure 8, ces noyaux hypothalamiques interviennent également dans le contrôle de l'innervation sympathique des organes impliqués dans le métabolisme énergétique.*

De nombreux modèles de stimulations électriques ou chimiques, ou de lésions ont été développés afin de déterminer l'implication de ces noyaux hypothalamiques dans la régulation de la dépense énergétique.

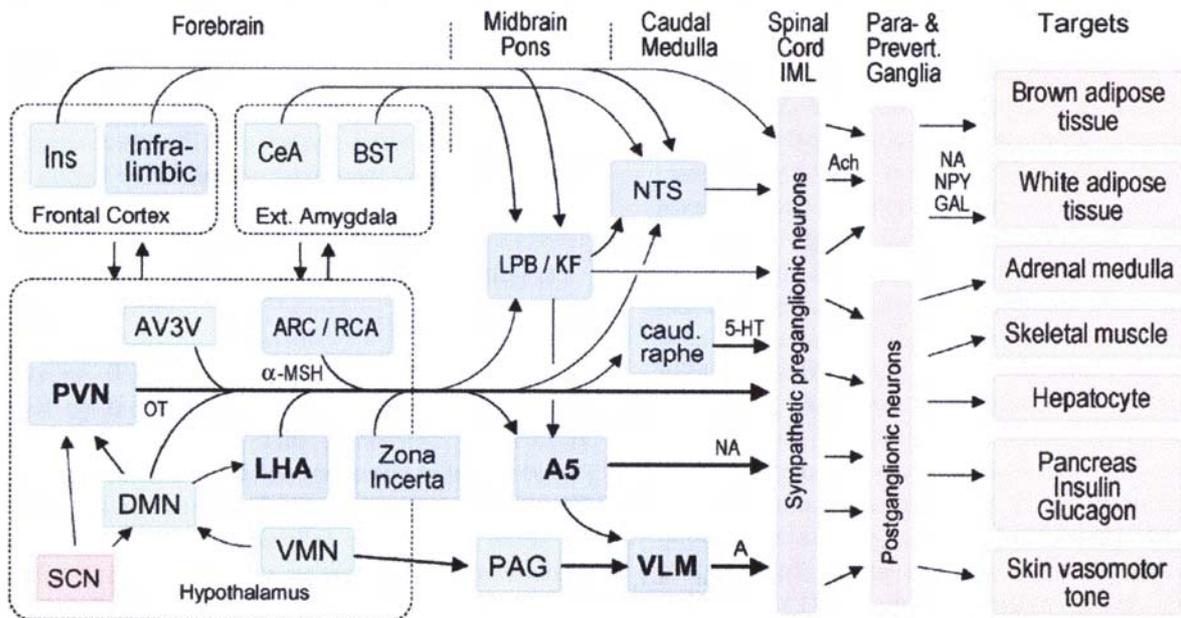
Au niveau du tissu adipeux brun, ces différentes modifications hypothalamiques ont permis de mettre en évidence le rôle de certains noyaux dans le contrôle de l'innervation sympathique (Nijima et al, 1984, Saito et al, 1989, Yoshimatsu et al, 1993). De plus une injection de leptine dans l'hypothalamus ventromédian stimule le système nerveux sympathique avec une augmentation de la concentration plasmatique d'adrénaline et de noradrénaline (Satoh et al, 1999).

A l'aide de la technique de rétro-marquage viral, il a été possible de déterminer plus précisément les structures centrales à l'origine de l'innervation sympathique du tissu adipeux brun. Un traceur viral capable de remonter les fibres nerveuses est injecté dans le tissu adipeux brun, ensuite l'animal est sacrifié à différents jours après l'injection et un marquage immunologique permet de déterminer les zones contenant le virus. Bamshad et al (1999) ont ainsi pu montrer que les deux principales structures hypothalamiques contenant le virus 6 jours après l'injection sont le noyau paraventriculaire et l'aire préoptique médiane. Il est intéressant de noter que dans le tronc cérébral ce sont le noyau du tractus solitaire, les raphés obscurus et pallidus, les noyaux noradrénergique A5, paragigantocellulaire latéral, rostroventrolatéral et adrénérgique C1. Cependant contrairement aux nombreuses expériences de lésion ou de stimulation qui montrent une implication importante du noyaux hypothalamique ventromédian, Bamshad et al (1999), trouvent peu de rétro-marquage dans ce noyau.

De la même manière, Bamshad et al (1998), montrent que le noyaux paraventriculaire et l'aire préoptique médiane sont à l'origine de l'innervation sympathique du tissu adipeux blanc.

Une stimulation de l'hypothalamus ventromédian ou du noyau paraventriculaire est responsable d'une augmentation de la glycogenolyse hépatique essentiellement via l'action du nerf hépatique (Yoshimatsu et al, 1988, Honmura et al, 1992 et Takahashi et al, 1997). A

l'aide d'un rétro-marquage, il a été montré que le noyau paraventriculaire et le noyau supra-chiasmatique étaient à l'origine du contrôle de l'innervation sympathique du foie (La Fleur et al, 2000). Le noyau paraventriculaire est également impliqué avec le noyau hypothalamique latéral et le noyau supra-chiasmatique dans le contrôle de l'innervation sympathique du pancréas (Buijs et al, 2001).



**Figure 8.** Interrelations entre les différentes structures du système nerveux central régulant l'innervation sympathique des organes impliqués dans le métabolisme énergétique (Berthoud, 2003).

*5-HT*, sérotonine ; *A5*, noyau noradrénergique ; *ARC*, noyau arqué ; *DMN*, noyau dorsomédian ; *GAL*, galanine ; *LHA*, aire hypothalamique latérale ; *LPB/KF*, noyau parabrachial latéral/ noyau Koelliker-Fuse ; *NA*, noradrénaline ; *NPY*, neuropeptide Y ; *NTS*, noyau du tractus solitaire ; *PVN*, noyau paraventriculaire ; *VLM*, medulla ventrolatérale ; *VMN*, noyau hypothalamique ventromédian.

## VI. IMPORTANCE DES MONOAMINES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL DANS LA RÉGULATION DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE

### VI. 1. Les monoamines

#### VI. 1. A. Les catécholamines

##### *Métabolisme (Figure 9)*

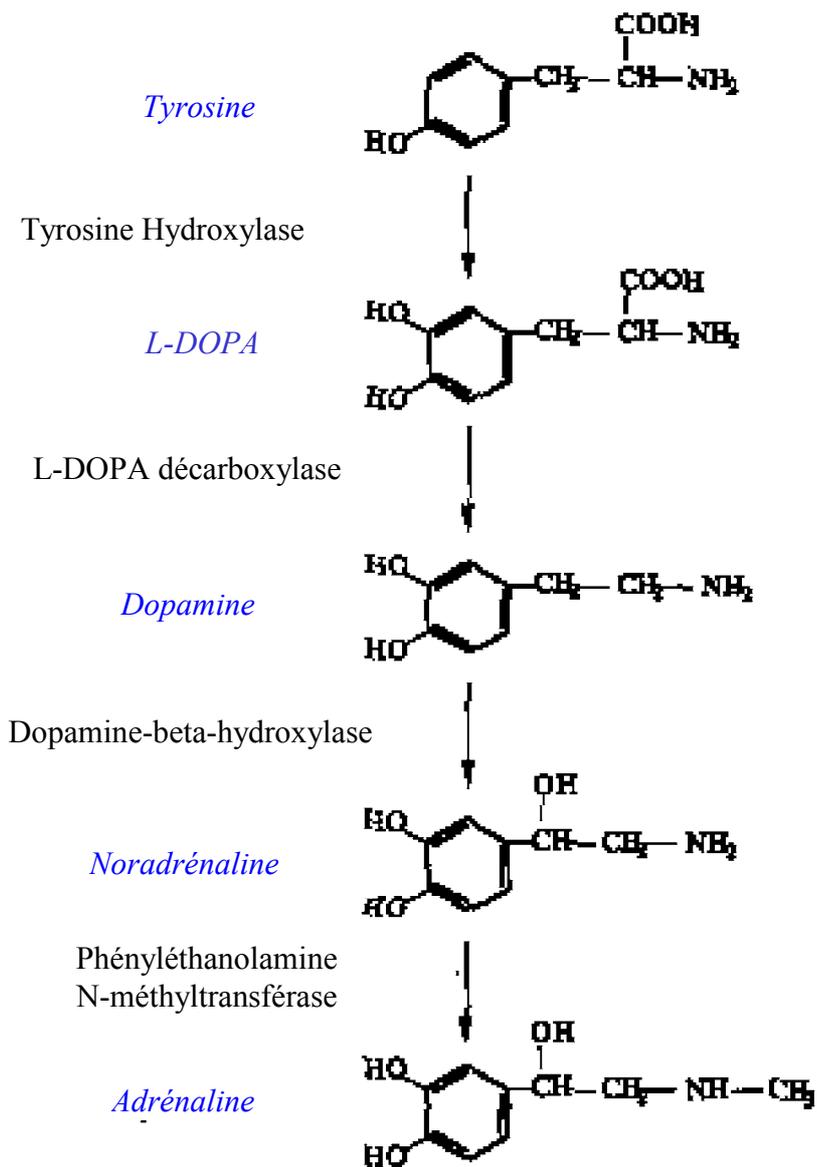
La chaîne de synthèse des catécholamines fait intervenir quatre enzymes qui après avoir été synthétisées dans les corps cellulaires sont transportées jusqu'aux terminaisons axonales. Par ailleurs, il existe également un transport axonal de l'ARNm de ces enzymes.

La tyrosine hydroxylase est la première enzyme intervenant dans la synthèse des catécholamine. C'est une enzyme limitante (Natgatsu et al, 1969) et semble, de ce fait, la plus régulée (Kumer et Vrana, 1996). Elle permet l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA). La tyrosine hydroxylase est spécifique des cellules catécholaminergiques dans le système nerveux central et périphérique, des cellules chromaffines de la glande medullo-surrénale, des cellules SIF ganglionnaires et des cellules glomiques des corps carotidiens. La tyrosine hydroxylase est soumise à deux mécanismes de régulation : une régulation à court terme, au niveau de l'activité spécifique de l'enzyme (phosphorylation, rétrontrôle inhibiteur par les produits de synthèse, modification de la configuration de l'enzyme) et une régulation à long terme au niveau de l'expression de la protéine.

La L-DOPA est décarboxylée en dopamine par la L-amino-acide aromatique décarboxylase, une enzyme non-spécifique des neurones catécholaminergiques. Cette étape n'est pas limitante.

La dopamine est ensuite transformée en noradrénaline par la dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH) qui est une enzyme spécifique des cellules noradrénergiques.

La phényléthanolamine N-transférase (PNMT) est l'enzyme qui catalyse la méthylation de la noradrénaline en adrénaline. Elle est présente dans les neurones adrénergiques centraux et dans les cellules chromaffines de la glande medullo-surrénale. L'activité de la PNMT est inhibée par un retrocontrôle de ses produits et activée notamment par les glucocorticoïdes qui ont une action aussi sur la transcription de la PNMT.



**Figure 9. Biosynthèse des catécholamines**

*Les récepteurs adrénergiques*

La noradrénaline et l'adrénaline exercent leur rôle par l'intermédiaire de différents types de récepteurs divisés en deux groupes, les  $\alpha$  et les  $\beta$ , subdivisés en plusieurs sous-variétés identifiées en fonction de leurs propriétés physiologiques et leurs différentes localisations. Schématiquement, dans le système nerveux central, les récepteurs  $\alpha_1$  sont postsynaptiques alors que les  $\alpha_2$ , sont essentiellement présynaptiques. Les récepteurs  $\beta_1$  sont

localisés sur les neurones tandis que les  $\beta_2$  sont localisés sur les cellules gliales. Les récepteurs  $\beta_1$  sont majoritaires dans le cœur (70 à 80% des récepteurs  $\beta$ ) alors que les récepteurs  $\beta_2$  sont majoritaires au niveau des vaisseaux, des poumons et des muscles squelettiques. Les  $\beta_3$  sont essentiellement localisés dans le tissu adipeux brun et également au niveau du cœur chez l'homme.

Il existe également six types de récepteurs de la dopamine répartis en deux familles, les récepteurs D1 qui sont postsynaptiques et les récepteurs D2 qui sont présynaptiques. On retrouve les récepteurs D1 et D2 dans les reins, les poumons, les artères, les lymphocytes (Amenta et al, 2002) dans le tissu adipeux (Nisoli et al, 1992) et bien sur au niveau du système nerveux central.

*Les groupes cellulaires catécholaminergiques bulbo-pontiques (Figures 10 et 11)*

Le tronc cérébral contient différents groupes cellulaires catécholaminergiques qui peuvent être mixtes, adrénérergiques/noradrénérergiques (A1C1, A2C2) ou simplement noradrénérergiques (A5, A6 et A7) ou adrénérergiques (C3).

*Le groupe cellulaire A1C1* est situé dans la partie caudale du bulbe ventrolatéral, il s'étend de l'axe rostro-caudal de la bordure de la moelle épinière à la partie caudale du noyau facial. C'est le groupe cellulaire catécholaminergique le plus caudal du tronc cérébral. Le groupe adrénérergique C1 est constitué d'environ 700 neurones qui représentent 70% du nombre total de neurones adrénérergiques centraux (Howe et al, 1980)

*Le groupe cellulaire A2C2.* Ce groupe cellulaire est localisé anatomiquement au niveau du noyau du tractus solitaire. Les neurones adrénérergiques du groupe C2 représentent 10% du nombre total des neurones adrénérergiques centraux (Howe et al, 1980).

Le groupe cellulaire C3 représente 10% du nombre total des neurones adrénérergiques centraux. Il est situé entre le raphé dorsal et les axones bulbaires de la IX<sup>ème</sup> paire de nerf crâniens (Howe et al, 1980).

*Le groupe cellulaire A5* est situé ventro-latéralement entre l'olive supérieure et la racine mésencéphalique de la VIIème paire de nerfs crâniens.

*Le locus coeruleus* regroupe le groupe cellulaire A4 et surtout le groupe A6 qui est la plus importante structure noradrénérergique du cerveau avec 1500 neurones chez le rat. De par son grand nombre d'afférences et de projections dans l'ensemble du cerveau, le locus coeruleus est la « plaque tournante » du système nerveux central, impliquée dans la régulation

de nombreuses fonctions telles que le contrôle cardiovasculaire, les rythmes veille/sommeil et le sommeil paradoxal.

*Le groupe A7* est le groupe noradrénergique pontique le plus rostral. Il est constitué de trois noyaux : le noyau subcoeruleus, le noyau de Kölliker-Fuse, le noyau parabrachial ventral et latéral. Le groupe A7 a surtout été étudié dans le cadre de la nociception (Nuseir et Proudfit, 2000).

#### *Les projections noradrénergiques (Figures 10 et 11)*

*Les projections noradrénergiques ascendantes* suivent le faisceau tegmental, constitué d'un faisceau ventral et d'un faisceau dorsal, et le système périventriculaire ventral et dorsal.

Le faisceau tegmental ventral constitué des fibres originaires des groupes bulbaires A1 et A2 ainsi que des groupes pontiques A5 et A7. Il permet l'innervation noradrénergique de l'hypothalamus, du thalamus et des régions pré-optiques et septale. Les projections issues du groupe pontique A6 suivent principalement le faisceau tegmental dorsal. Il innerve les noyaux thalamiques, ainsi que toutes les régions corticales comme le néocortex, l'hippocampe et l'amygdale (Moore et Bloom, 1979).

Le système périventriculaire ventral et dorsal est constitué de fibres longeant la substance grise périventriculaire et périaqueducale. Il achemine les fibres noradrénergiques en provenance de A2 et de A6. Il innerve les noyaux hypothalamiques, le noyau tegmental ventral, les tubercules quadrijumeaux, le raphé dorsal, les régions thalamiques.

*Les projections noradrénergiques descendantes* qui aboutissent dans la moelle épinière sont issues des trois groupes pontiques A5, A6 et A7.

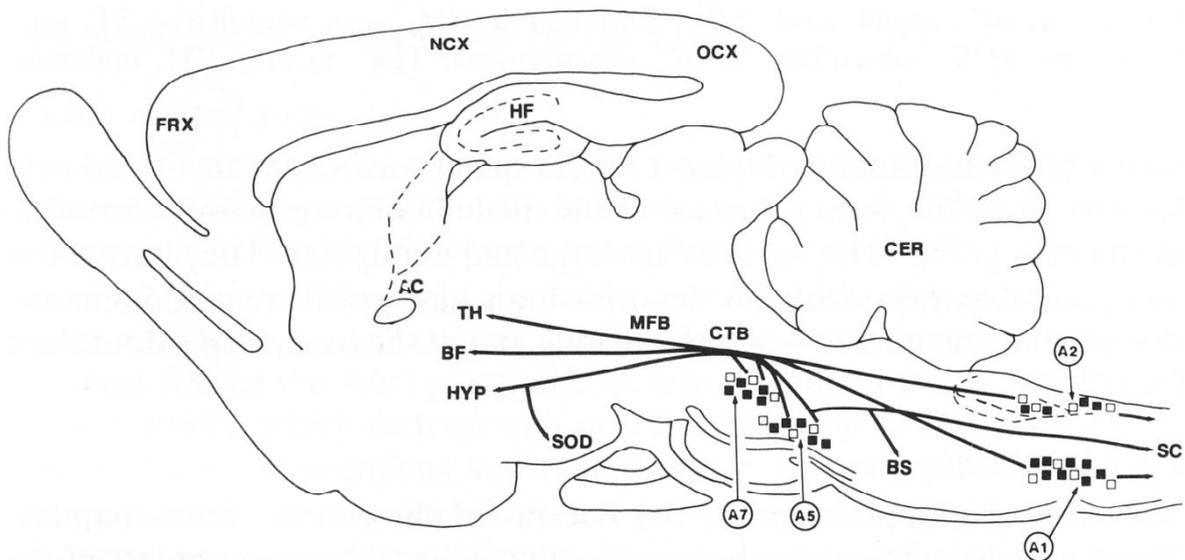


Figure 10. Localisation des groupes cellulaires noradrénergiques A1, A2, A5 et A7 et leurs principales projections.

BF, cerveau antérieur basal ; BS, noyaux du tronc cérébral ; CER, cervelet ; HF, hippocampe ; HYP, hypothalamus ; SC, moelle épinière ; SOD, décussation supraoptique ; TH, thalamus.

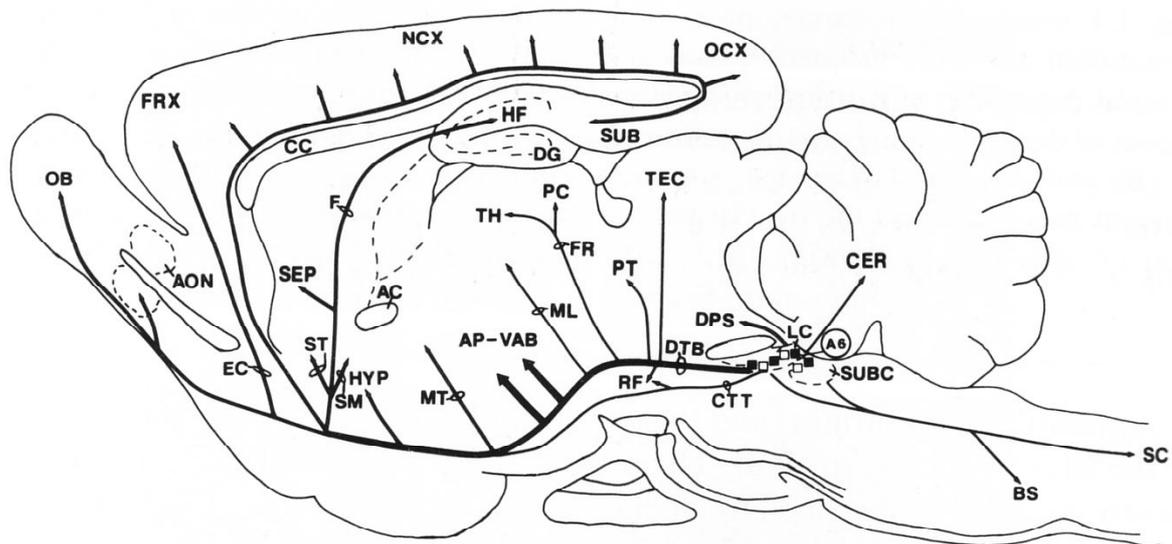


Figure 11. Localisation du groupe noradrénergique A6 et ces principales projections.

BF, cerveau antérieur basal ; BS, noyaux du tronc cérébral ; CC, corps calleux ; CER, cervelet ; FRX, cortex frontal ; HF, hippocampe ; HYP, hypothalamus ; NCX, neocortex ; OB, bulbe olfactif ; SC, moelle épinière ; SOD, décussation supraoptique ; TH, thalamus.

VI. 1. B. la sérotonine

## VI. 1. B. La sérotonine

### *Métabolisme (Figure 12)*

#### *Biosynthèse*

La sérotonine est synthétisée en deux étapes à partir du tryptophane, un acide aminé essentiel :

-Hydroxylation du tryptophane en 5-hydroxytryptophane par la tryptophane hydroxylase, une enzyme spécifique des neurones sérotoninergiques. Cette première étape est limitante.

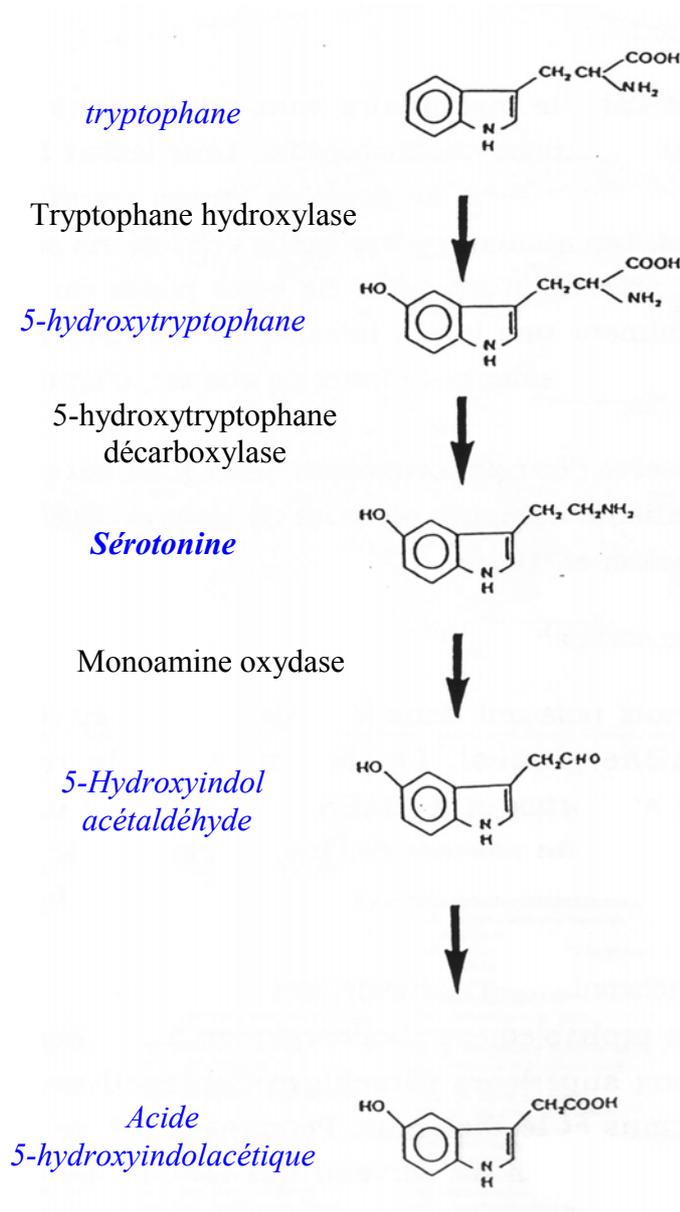
-Décarboxylation du 5-hydroxytryptophane en sérotonine par une enzyme non-spécifique des neurones sérotoninergiques, la L-amino-acide aromatique décarboxylase. Cette étape n'est pas limitante.

#### *Dégradation*

L'inactivation enzymatique de la sérotonine est réalisée par sa désamination oxydative en deux étapes. La sérotonine est tout d'abord transformée en 5-hydroxyindol acétaldéhyde par les monoamines oxydases, une enzyme associée à la membrane externe des mitochondries. Le 5-hydroxyindol acétaldéhyde, très labile, est rapidement converti en deux dérivés plus stables : l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) de façon irréversible et en 5-hydroxytryptophol, de façon réversible.

En conditions normales, le 5-HIAA constitue le catabolite majeur de la sérotonine. Il est éliminé du cerveau par un mécanisme actif principalement au niveau du plexus choroïdien (groupe cellulaire de la paroi des ventricules latéraux qui secrètent le liquide céphalo-rachidien).

A cette voie métabolique prédominante, il faut ajouter la formation d'autres composés synthétisés à partir du tryptophane : tryptamine, N-acétylsérotonine, mélatonine, bufoténine. Leur synthèse est liée à la spécialisation de certains types cellulaires comme la glande pinéale qui produit la mélatonine.



**Figure 12. Biosynthèse de la sérotonine à partir du tryptophane et sa dégradation en acide 5-hydroxyindolamine**

*Les noyaux sérotoninergiques (Figure 13)*

Seule une fraction minime (1 à 2%) de la sérotonine de l'organisme est présente dans le cerveau. La majorité de la sérotonine est contenue dans les plaquettes sanguines et dans la muqueuse intestinale. Comme la sérotonine n'est pas capable de passer la barrière hémato-encéphalique, il est apparu qu'il existait dans le cerveau des cellules capables de synthétiser de la sérotonine.

La neuroanatomie des groupes cellulaires sérotoninergiques a été définie par Dahlström et Fuxe (1964). Les corps cellulaires sérotoninergiques sont situés dans le tronc cérébrale au niveau des noyaux du raphé et sont numérotés de B1 à B9 dans un ordre caudo-rostral.

*Le raphé dorsalis* (groupes sérotoninergiques B6, B7) est situé en avant du 4<sup>ème</sup> ventricule, sous l'aqueduc central. C'est la structure du système nerveux central qui contient le plus grand nombre de corps cellulaires sérotoninergiques (environ la moitié des neurones sérotoninergiques du cerveau). On trouve dans le raphé dorsalis environ 48% de cellules sérotoninergiques. Certains neurones du raphé dorsalis contiennent d'autres neurotransmetteurs tels que la noradrénaline, l'acide  $\gamma$ -amino-butirique (GABA) ou des neuropeptides tels que les enképhalines ou la substance P.

*Le raphé médian* (groupe sérotoninergique B5, B8) est situé plus rostralement et de manière centrale sous le raphé dorsalis. Il contient une minorité de neurones sérotoninergiques.

Ces deux raphés projettent essentiellement vers le diencephale et le telencéphale. Le cortex, le striatum, l'hypothalamus, reçoivent des afférences du raphé dorsalis et du raphé médian. Le noyau du tractus solitaire ainsi que le locus coeruleus reçoivent des afférences du raphé dorsalis.

*Le raphé pontique* (Groupe sérotoninergique B4), *le raphé magnus* (Groupes sérotoninergiques B2 et B3), *le raphé obscurcus* (Groupe sérotoninergique B2) et *le raphé pallidus* (groupe sérotoninergique B1) situés plus caudalement émettent des projections essentiellement vers le tronc et la moelle épinière.

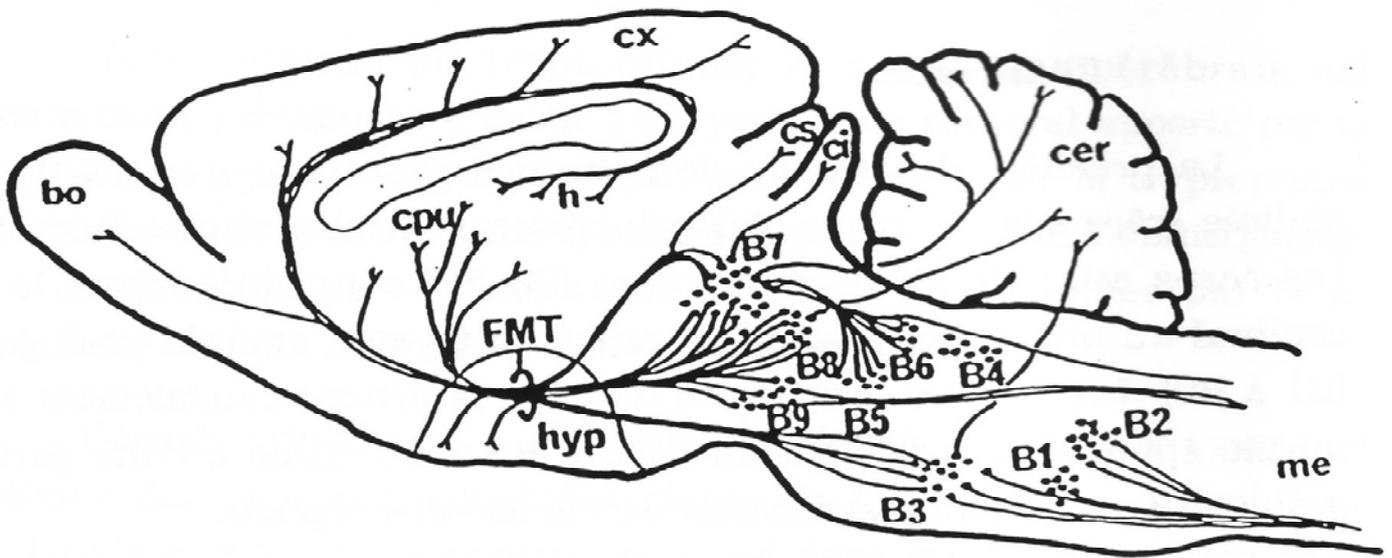


Figure 13. Localisation des groupes cellulaires sérotoninergiques (B1 à B9) et représentation de leurs principales projections.

bo, bulbe olfactif ; cer, cervelet ; cpu, noyau caudé putamen ; cx, cortex ; h, hippocampe ; hyp, hypothalamus.

#### *Les récepteurs à la sérotonine*

La classification des récepteurs sérotoninergiques basée sur leurs caractéristiques fonctionnelles (pharmacologiques), transductionnelles (couplage du récepteur), et structurales a permis de déterminer 7 classes

Les récepteurs de la classe 1 qui comprend cinq sous-types (A, B, C, D, E, F) sont couplés aux protéines G et ils sont préférentiellement couplés à l'inhibition de l'adényl cyclase. Ils ont une forte affinité pour la sérotonine.

Les récepteurs de la classe 2 sont au nombre de trois (A, B, C). Ils sont également couplés aux protéines G, cependant, ils stimulent le métabolisme des phosphatidyl-inositols par l'intermédiaire de la phospholipase C.

Les récepteurs de la classe 3 sont couplés à des canaux ioniques permettant le passage de ligands. Ils sont situés essentiellement au niveau périphérique où ils transmettent l'effet excitateur de la sérotonine.

Les récepteurs de la classe 4 induisent la formation d'AMPC.

## **VI. 2. Rôle des monoamines du système nerveux central dans la régulation du métabolisme énergétique**

Concernant la régulation du métabolisme glucidique, différents neurotransmetteurs interviennent au niveau de l'hypothalamus parmi lesquels les monoamines jouent un rôle important (Nonogaki et Iguchi, 1997).

L'action de la sérotonine au niveau hypothalamique sur le métabolisme glucidique est discutée. En effet, une injection intrahypothalamique de sérotonine n'a pas d'effet sur la glycémie, l'insulinémie et la concentration plasmatique de glucagon (Shimazu et Ishikawa, 1981). Des études pharmacologiques effectuées à l'aide d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine ont montré une augmentation de la glycémie, mais cet effet s'effectuerait via l'activation de neurones noradrénergiques hypothalamiques (Nonogaki et Iguchi, 1997). Une infusion de noradrénaline et de sérotonine dans l'hypothalamus ventromédian pendant cinq semaines provoque un dysfonctionnement de la sécrétion d'insuline par le pancréas (Liang et al, 1999). Une injection chronique de noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian de rats entraîne une augmentation de l'insulinémie ainsi que la libération de glucagon (Cincotta et al, 2000). La noradrénaline au niveau hypothalamique va directement induire une augmentation de la libération de glucose par le foie et induire indirectement (via le déclenchement de la libération d'adrénaline par la glande médullosurrénale) une inhibition de la libération d'insuline par le pancréas (Smythe et al, 1989).

Une infusion de noradrénaline dans le noyau paraventriculaire chez le rat engendre une diminution de la dépense énergétique (Siviy et al, 1989). Ceci est cohérent avec les études montrant une diminution de l'activité noradrénergique dans le noyau paraventriculaire chez des rats obèses Zucker (Pacak et al, 1995).

La noradrénaline ou la sérotonine dans les noyaux hypothalamiques ventromédian et paraventriculaire contrôlent l'activité sympathique du tissu adipeux brun (Sakaguchi et al, 1989). Chez le rat, soumis à un stress (nage en eau froide), Gotoh et al (1992) observent une augmentation de l'activité noradrénergique dans l'hypothalamus et dans le tissu adipeux bruns. Une stimulation du raphé dorsalis, la principale structure sérotoninergique centrale, provoque une augmentation de la température et de la thermogénèse dans le tissu adipeux brun (Dib et al, 1994). Une altération de la transmission sérotoninergique entre le raphé dorsalis et l'hypothalamus ventromédian a été observée chez les rats obèses Zucker (De Fanti et al, 2000). De plus, chez ces rats, une infusion chronique de noradrénaline au niveau de

l'hypothalamus ventromédian augmente l'activité lipogénique et lypolitique dans les adipocytes (Cincotta et al, 2000).

### **VI. 3. Rôle des monoamines du système nerveux central dans la régulation de la prise alimentaire**

L'arsenal de molécules agissant sur le métabolisme monoaminergique utilisées par l'industrie pharmaceutique (amphétamine, manzidol, phentamine, phenilpropanolamine, fenfluramine, d-fenfluramine, sibutramine...) pour supprimer la prise alimentaire atteste de l'importance des monoamines dans la régulation de l'appétit.

L'effet stimulateur de **la noradrénaline** sur la prise alimentaire est connu depuis les expériences d'injections intrahypothalamique de noradrénaline chez le rat par Grossman en 1960. Les afférences noradrénergiques de l'hypothalamus ont pour origine essentiellement le groupe cellulaire bulbo-pontique A2C2 et secondairement le locus coeruleus (A6, principal groupe cellulaire noradrénergique central) (Palkovits, 1981, Luiten et al, 1987). Le groupe catécholaminergique A2C2 fait partie du noyau du tractus solitaire situé à proximité de l'area postrema qui possède une barrière hémato-encéphalique « lâche ». L'area postrema est sensible aux constituants métaboliques et à certaines hormones plasmatiques (Adachi et al, 1991). Par ailleurs, le noyau du tractus solitaire sert de relais entre les afférences périphériques et l'hypothalamus et sert également de relais entre les centres et le système nerveux sympathique (Luiten et al, 1987).

Une microinjection de noradrénaline dans le noyau paraventriculaire (Hajnal et al, 1997) ou dans le noyau ventromédian (Shimazu et al, 1986) engendre une hyperphagie. Dans l'hypothalamus paraventriculaire, la noradrénaline active la prise alimentaire par son action sur les récepteurs  $\alpha_2$  (Leibowitz, 1988) alors qu'elle a un effet inhibiteur sur la prise alimentaire par son action sur les récepteurs  $\alpha_1$  (Wellman et Davies, 1991). L'action d'appétence de la noradrénaline dépend notamment de la corticostérone circulante ou de la glycémie qui toutes deux permettent une surexpression des récepteurs  $\alpha_2$  par rapport aux récepteurs  $\alpha_1$  (Leibowitz, 1988).

La leptine contrôle les afférences catécholaminergiques de hypothalamus. En effet, des récepteurs à la leptine ont été localisés sur l'ensemble des noyaux catécholaminergiques bulbo-pontiques (Hay-Schmidt et al, 2001). Par ailleurs, la noradrénaline stimulerait l'expression de NPY, un neuropeptide orexigène, dans l'hypothalamus (Wellman, 2000).

Une augmentation de la quantité **de dopamine** dans le noyau hypothalamique ventromédian est associée avec la prise alimentaire. La dopamine provoque le début de la prise alimentaire et régule le nombre de repas. Chez les rats Zucker, la libération de dopamine est plus importante dans le noyau ventromédian, ce qui conduit à une augmentation de la prise alimentaire (Meguid et al, 2000). Chez ces rats obèses, on observe également une modification de la quantité de récepteurs D1 et D2 dans le noyau ventromédian, dans le noyau paraventriculaire et dans l'hypothalamus antérieur (Fetissoff et al, 2002). Mais la dopamine exerce aussi un effet inhibiteur sur la prise alimentaire mais de manière indirecte. En effet, son action anorexigène est le résultat d'une interaction avec les centres dopaminergiques telencéphaliques impliqués dans la sensation de plaisir et de satiété (Halford et Blundell, 2000).

**L'adrénaline** semble avoir un effet inhibiteur limité sur la régulation de la prise alimentaire (Leibowitz, 1988).

Une injection de **sérotonine** au niveau de différents noyaux hypothalamiques, le noyau ventromédian, le noyau paraventriculaire, le noyau dorsomédian ou le noyau suprachiasmatique, diminue la prise alimentaire (Leibowitz et Alexander, 1998) notamment en inhibant l'action orexigène du NPY (Currie et al, 2002). On trouve une augmentation de la concentration de sérotonine dans l'hypothalamus juste avant et pendant le repas (Schwartz et al, 1990, Orosco et Nicolaidis, 1992). Les afférences sérotoninergiques de l'hypothalamus ont pour origine le raphé dorsalis, le raphé médian et le lemnicus médian (Willoughby et Blessing, 1987). Il existe plus de 14 sous-types de récepteurs de la sérotonine. C'est l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> et 5-HT<sub>2C</sub> qui aurait le plus d'effet sur la prise alimentaire (Halford et Blundell, 2000).

La sérotonine influence le profil temporel de la prise alimentaire en diminuant la durée et la fréquence des repas (Leibowitz et Alexander, 1998). Elle joue également sur la sélection des macronutriments. Une injection de sérotonine ou de ses agonistes au niveau central, sans modifier la prise alimentaire en protéine, inhibe la préférence pour les glucides et les lipides selon les protocoles expérimentaux (Currie, 1993, Weiss et al, 1990).

Des relations ont été établies entre le métabolisme sérotoninergique et la leptine. Tout d'abord, au niveau hypothalamique les récepteurs à la leptine et à la sérotonine sont exprimés dans les mêmes noyaux (ventromédian, paraventriculaire, arqué). En outre, dans le raphé dorsalis, la leptine se fixe sur les cellules sérotoninergiques (Fernandez-Galaz et al, 2002) et des récepteurs de la leptine sont retrouvés sur l'ensemble des noyaux sérotoninergiques centraux (Hay-Schmidt et al, 2001).

## VII. LE SYSTÈME NERVEUX SYMPATHIQUE ET LA RÉGULATION DU METABOLISME ÉNERGÉTIQUE

Une des hypothèses expliquant le développement de l'obésité chez l'homme est une hypoactivité du système nerveux sympathique. Cette hypoactivité sympathique ne permettrait pas la dépense calorique (notamment la thermogenèse) en réponse à une suralimentation, ce qui conduirait à une balance énergétique positive et une prise de poids (Bray et al, 1989). Nonogaki dans un article de 1999 redonne au système nerveux autonome son rôle prépondérant dans le développement de l'obésité par rapport à l'importance qui avait été donnée jusqu'alors au contrôle central de la prise alimentaire.

### VII.1. Organisation générale du système nerveux sympathique

Le système nerveux sympathique périphérique du rat consiste en un vaste arrangement de nerfs et de ganglions reliés d'une part à la moelle épinière et d'autre part aux viscères. D'une façon schématique, les ganglions sympathiques peuvent être subdivisés en différents groupes selon leur localisation :

Les ganglions paravertébraux constituent une double chaîne ganglionnaire de part et d'autre de la colonne vertébrale et sont directement reliés à la moelle thoracique et lombaire par les rameaux communicants. Le ganglion cervical supérieur et le ganglion stellaire font partie de cette catégorie.

Les ganglions prévertébraux sont rassemblés dans un large plexus : le plexus abdominal qui comprend notamment le ganglion coeliaque.

Les ganglions paraviscéraux sont situés à proximité des viscères comme le plexus cardiaque, le plexus pelvien, le plexus de la trachée et des bronches.

Les ganglions intramuraux sont localisés dans les parois du tractus gastro-intestinal et des voies biliaires.

#### *Fibres préganglionnaires*

Les neurones des ganglions sont innervés par les efférences centrales libérant principalement de l'acétylcholine. Cette dernière agit par l'intermédiaire des récepteurs nicotiniques, entraînant un potentiel postsynaptique excitateur rapide. Elle peut également agir par l'intermédiaire de récepteurs muscariniques, entraînant une action lente.

### *Neurones ganglionnaires*

95% des neurones des ganglions utilisent la noradrénaline comme principal médiateur (Borghini et al, 1991, Klimaschewski et al, 1996). On peut identifier ces neurones en les marquant avec des anticorps anti-tyrosine hydroxylase, anti-dopa décarboxylase et anti-dopamine  $\beta$ -hydroxylase. Des études chez le chien montre que quelques corps cellulaires de neurones du ganglion cervical sont dopaminergiques. Au niveau des terminaisons, les catécholamines sont libérées dans la fente synaptique et peuvent soit être recaptées par la terminaison présynaptique soit dégradées par la monoamine oxydase (MAO) ou la catéchol-O-méthyltransférase. La noradrénaline est libérée des vésicules en réponse à une augmentation intracellulaire d'ions  $Ca^{2+}$ . Elle agit par l'intermédiaire de récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques localisés sur les membranes pré- et postsynaptiques.

## **VII. 2. Le système nerveux sympathique et le métabolisme du glucose**

Le foie est la principale réserve glucidique (sous forme de glycogène) et est la principale source de glucose de l'organisme. Le système nerveux sympathique intervient à la fois sur la production de glucose et sur la capture du glucose par les tissus périphériques.

Au niveau du foie, l'innervation sympathique agit sur la production de glucose en régulant non seulement le débit sanguin mais également les fonctions des cellules hépatiques.

L'importance de l'innervation sympathique dans le contrôle de l'activité des enzymes hépatiques a été démontrée sur des préparations *ex vivo* de foies perfusés isolés de toutes influences endocrines (Hartmann et al, 1982, Jungermann et al, 1987). Une stimulation des terminaisons sympathiques au niveau du foie engendre une augmentation de l'activité de la glycogène phosphorylase et de la glucose-6-phosphatase qui sont des enzymes limitantes de la dégradation du glycogène. Parallèlement une activation du système sympathique réduit l'activité de la glycogène synthase. Toutes ces actions enzymatiques conduisent à une augmentation de la libération de glucose.

L'activation sympathique va également diminuer le débit sanguin au niveau hépatique via son action sur les récepteurs adrénergiques  $\alpha$  (Gardemann et al, 1987, Lin et al 1997, Kurosawa et al, 2002).

En plus des effets de l'innervation sympathique directe sur la production hépatique de glucose, **l'adrénaline** circulante joue un rôle primordial dans l'augmentation de production de glucose par le foie en activant la glycogénolyse de manière directe dans les hépatocytes ou

par le biais de l'activation de la libération de glucagon par le pancréas. Par contre au regard de la noradrénaline provenant de l'innervation sympathique, la noradrénaline circulante ne joue qu'un rôle mineur dans la régulation de la production de glucose par le foie (Chu et al, 1997, Nonogaki, 2000).

L'action de l'adrénaline sur les récepteurs  $\beta$  des hépatocytes active la voie du second messenger AMPc qui conduit fait passer la glycogène phosphorylase de la forme inactive à la forme active. L'activation des récepteurs  $\alpha$  augmente la glycogénolyse par des mécanismes indépendant de l'AMPc.

L'adrénaline circulante ou la noradrénaline provenant des terminaisons sympathiques inhibent la sécrétion d'insuline par **les cellules  $\beta$  du pancréas** ce qui constitue une action indirecte du système sympathique dans la diminution de la capture du glucose au niveau hépatique. L'activation des récepteurs adrénergiques  $\beta$  engendre une augmentation de la libération d'insuline et de glucagon, alors que l'activation des récepteurs adrénergiques  $\alpha$  inhibe la sécrétion d'insuline. L'inhibition de la sécrétions d'insuline par les récepteurs  $\alpha$  est dominante par rapport à la stimulation de la libération de l'insuline par les récepteurs  $\beta$  (Ahren et al, 1987, Nonogaki 2000).

La noradrénaline augmente la glycogénolyse dans les muscles squelettiques via l'activation des récepteurs adrénergiques  $\beta$ . L'entrée de glucose dans les myocytes est dépendante de l'insuline, les muscles peuvent prélever le glucose également suite à une stimulation par le système nerveux sympathique (Minokoshi et al, 1994).

Une infusion chronique de noradrénaline augmente l'utilisation de glucose indépendamment de l'insuline par le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc (Liu et al, 1994, Shimizu et al, 1996). Cette action se fait via l'activation des récepteurs  $\beta$  qui agiraient sur les transporteurs du glucose, GLUT-4 (Macaulay et al, 1994).

### **VII. 3. Le système nerveux sympathique et le tissu adipeux blanc**

Le tissu adipeux blanc est la principale réserve énergétique de l'organisme. Ce tissu stocke les lipides sous forme de triglycérides, et il est capable de fournir une quantité importante d'acides gras non estérifiés suite à la lipolyse en fonction des besoins de l'organisme. Cette lipolyse est activée par le système nerveux sympathique.

Le tissu adipeux blanc est innervé essentiellement par le système nerveux sympathique. Le type d'innervation n'est pas clairement établie : l'innervation sympathique

des vaisseaux irriguant le tissu adipeux blanc ne fait aucun doute, mais de nouvelles données attestent de l'existence d'une innervation directe des adipocytes (Rebuffé-Scrive, 1991, Youngstrom et Bartness, 1995, Penicaud et al, 2000, Rayner, 2001).

Le récepteur  $\beta_3$  est le sous-type de récepteurs adrénergiques majoritaire dans le tissu adipeux blanc chez les rongeurs (en 10 fois plus grande quantité que les  $\beta_1$ , D'Allaire et al, 1995) alors que chez l'homme il ne représente que 20% de la population totale des récepteurs  $\beta$ . Le récepteur  $\beta_3$  possède une affinité pour l'adrénaline inférieure à celle des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , et une affinité pour la noradrénaline inférieure à celle des récepteurs  $\beta_1$  mais supérieure à celle des récepteurs  $\beta_2$ . Ainsi, le récepteur  $\beta_3$  est plus sensible à la forte concentration de noradrénaline à proximité des terminaisons nerveuses qu'aux catécholamines circulantes (Rayner, 2001). De plus, en conditions physiologiques normales, la quantité d'adrénaline circulante est inférieure à la concentration de noradrénaline au niveau des terminaisons nerveuses. Le tissu adipeux blanc possède également des récepteurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  (lafontan et Berlan, 1993). Les récepteurs  $\alpha_1$  sont peu impliqués dans la lipolyse mais leur stimulation augmente la glycolyse (Faintrenie et Géloën, 1996). L'activation des récepteurs  $\beta_3$  et  $\alpha_2$  n'a pas les mêmes effets sur la lipolyse : les  $\beta_3$  activent la lipolyse alors que les  $\alpha_2$  inhibent la lipolyse. En fait, les  $\alpha_2$  sont activés pour de faibles concentrations de catécholamines alors que les  $\beta_3$  sont activés pour de fortes concentrations de catécholamines (Lafontan et Berlan, 1993).

L'expression protéines découplantes UCP2 et UCP3, des perméases à proton permettant un « gaspillage » d'énergie par la production de chaleur au lieu de molécules d'ATP au niveau mitochondrial, est induite suite à une stimulation des récepteurs  $\beta_3$  dans le tissu adipeux blanc (Emilsson et al, 1998).

En plus de son rôle dans le métabolisme lipidique, le système nerveux sympathique régule la prolifération et la différenciation adipocytaire. Une dénervation sympathique du tissu adipeux blanc engendre une prolifération adipocytaire (Cousin et al, 1993).

#### **VII. 4. Le système nerveux sympathique et le tissu adipeux brun**

Le tissu adipeux brun comme le tissu adipeux blanc est capable de stocker les triglycérides (lipogénèse) et de les hydrolyser (lipolyse) en acides gras non estérifiés. Cependant, les adipocytes du tissu adipeux brun sont plus petits et contiennent de nombreuses inclusions lipidiques de petites tailles qui n'occupent qu'une partie du volume cellulaire. Il est plus richement vascularisé que le tissu adipeux blanc. Chaque adipocyte est vascularisé par 4

à 5 capillaires et environ un tiers du tissu adipeux est en contact avec des capillaires. Le tissu adipeux brun est également plus innervé que le tissu adipeux blanc (Lever et al, 1988, Nnodim et Lever, 1988). Pour une consommation d'oxygène plus importante, les adipocytes du tissu adipeux brun synthétisent moins de molécules d'ATP que des hépatocytes. Les adipocytes du tissu adipeux brun contiennent un grand nombre de mitochondries, qui possèdent sur leur membrane interne des protéines découplantes UCP-1, UCP-2 et UCP-3 (Klaus et al, 1991, Boss et al, 1997, Prunet-Marcassus et al, 1999). Ces UCP permettent le passage de protons du milieu intramembranaire mitochondriale où ils sont en concentration importante, vers le milieu interne de la mitochondrie. Cette dissipation du gradient de proton est accompagnée d'une production de chaleur. Les mitochondries ont une forte capacité respiratoire corrélée avec une grande quantité d'enzymes oxydatives (cytochrome oxydase, succinate deshydrogénase...) (Houstek et al, 1991).

Les récepteurs adrénérgiques  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  coexistent dans le tissu adipeux brun. Les récepteurs  $\beta_1$  sont en quantité dix fois plus importante que les  $\beta_3$  et les récepteurs  $\beta_2$  sont principalement localisés sur des cellules autres que les adipocytes. La présence de récepteurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  a été mise en évidence mais les  $\alpha_2$  sont exprimés en quantité minoritaire (Lafontan et Berlan, 1993, D'Allaire et al, 1995). Les récepteurs  $\beta_1$  sont activés par la noradrénaline circulante alors que les  $\beta_3$  seraient activés par les fortes concentrations de noradrénaline au niveau des terminaisons synaptiques (Atgié et al, 1997). L'activation des récepteurs  $\alpha_1$  agit en synergie avec la stimulation des récepteurs  $\beta_3$ . L'innervation sympathique va provoquer une augmentation de la lipolyse et une activation des UCP. De plus la stimulation noradrénergique va augmenter la transcription du gène des UCP (Rehmark et al, 1990, Kozak et Kozak, 1994, Rohlf's et al, 1995).

Par ailleurs la noradrénaline exerce un effet trophique sur le tissu adipeux brun. La noradrénaline augmente le nombre de mitoses des précurseurs adipocytaires et des cellules endothéliales (Géloën et al, 1988, 1992).

De nombreuses études ont montré une altération de l'activité thermogénique du tissu adipeux brun chez des modèles de rats obèses. Une diminution du contenu en noradrénaline, du turnover de la noradrénaline ou de la réponse thermogénique à la noradrénaline dans le tissu adipeux brun des rats obèses seraient à l'origine d'une dispersion énergétique moindre à l'origine du développement de l'obésité (Yoshida et al, 1984, York et al, 1985, Rekorek et al, 1987, Himms-hagen, 1989, Marette et al, 1990, Seydoux et al, 1990, Atgié et al, 1993, Blouquit et al, 1993).

## OBJECTIF GÉNÉRAL

Le rat Lou/C est présenté comme un modèle ne développant pas d'obésité, mais peu d'études comparatives avec la souche de rats Wistar, dont le rat Lou/C est issue, ont été effectuées. Ainsi, **notre premier objectif** est de caractériser la balance énergétique de cette souche au cours du vieillissement, à 1, 6, 12, 18 et 24 mois en comparaison avec des rats Wistar. La mise en réserve excessive de substrats énergétiques conduisant à l'obésité, résulte d'un déséquilibre en faveur des entrées et au détriment de la dépense énergétique. Au cours de notre étude nous mesurerons les trois versants de la balance énergétique : la dépense énergétique, la prise alimentaire et l'adiposité, reflet de l'état des réserves énergétiques.

La leptine et l'insuline sont deux hormones sécrétées proportionnellement à la quantité de tissu adipeux. Elles fournissent au cerveau une information sur l'état des réserves énergétiques de l'organisme. Au cours du vieillissement et chez les sujets obèses, on observe une altération du fonctionnement de ce système de rétrocontrôle. Une modification de ce signal périphérique pourrait être à l'origine du non-développement de l'obésité chez le rat Lou/C. **Notre deuxième objectif** va être de caractériser chez le rat Lou/C, les taux plasmatiques d'insuline et de leptine. Par ailleurs, nous allons nous servir du fait que le rat Lou/C n'accumule pas de graisse au cours du vieillissement, pour discriminer les effets de l'âge et de l'obésité sur le développement de la résistance à l'insuline et à la leptine.

Le système nerveux sympathique constitue une des voies activatrices de la dépense énergétique. Notre hypothèse est que l'origine de la maigreur du rat Lou/C pourrait être une innervation sympathique augmentée dans certains tissus impliqués dans la mise en réserve ou dans la dépense énergétique. **Notre troisième objectif** va être de déterminer l'activité sympathique dans les tissus adipeux blancs et brun et dans le foie des rats Lou/C en comparaison avec les rats Wistar.

Notre étude aura porté sur une voie afférente (leptine et insuline) et une voie effectrice (système nerveux sympathique) d'une boucle de régulation de la balance énergétique, **notre quatrième objectif** va être d'évaluer le rôle des monoamines centrales dans le déterminisme énergétique des rats Lou/C. Nous définirons le profil monoaminergique des principales structures catécholaminergiques et sérotoninergiques bulbo-pontiques et des noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle à la fois de la dépense énergétique et de la prise alimentaire.

# **MATERIEL ET METHODES**

## I. LES ANIMAUX

Les rats utilisés au cours de cette étude sont de souches Lou/C et Wistar (Harlan, Gannat, France). Afin d'éviter les variabilités inter-sexe ; nous n'avons utilisé que des rats mâles. Les rats ont été maintenus dans une animalerie où règnent une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , un degré d'hygrométrie constant et où l'éclairage correspond à 12 heures de lumière par jour de 7 heures à 19 heures et 12 heures d'obscurité le reste du temps. Ils sont placés en cage collective par quatre et ont libre accès à l'eau et à la nourriture A03 (3,2 kcal/g, UAR, France).

## II. MESURES DE LA PRISE ALIMENTAIRE ET DE LA DEPENSE ENERGETIQUE

Les mesures de la dépense énergétique ont été réalisées en collaboration avec le Docteur Alain Géloën (UMR 585 INSERM / INSA IMBL-Lyon).

Les mesures concernant la prise alimentaire ainsi que la dépense énergétique ont été effectuées sur des rats âgés de 1, 6, 12, 18 et 24 mois.

Les rats ont été placés individuellement en cage pendant une semaine d'habituation et ensuite pendant une semaine leur prise alimentaire a été mesurée tous les jours en faisant la différence entre le poids de granules de nourriture données et le poids de granules restant.

La dépense énergétique a été mesurée par **calorimétrie indirecte**, c'est-à-dire que la chaleur produite par les processus métaboliques peut être calculée à partir des échanges gazeux. Nous pouvons ainsi mesurer la dépense énergétique des rats à partir de leur consommation d' $\text{O}_2$  et leur rejet de  $\text{CO}_2$ .

Les rats sont placés dans des cages en plexiglas fermées hermétiquement, dont le volume est adapté à la morphologie des rats afin de minimiser le volume mort (L x l x h : 15 cm x 10 cm x 8 cm pour les rats âgés de 1 mois, 30 cm x 20 cm x 15 cm pour les rats âgés de 6 mois et plus) (Figure 14). Les cages comprennent un orifice assurant une entrée d'air et une sortie sur le côté opposé à cette entrée. Cette sortie est reliée à un système de pompe qui aspire l'air à débit constant et l'envoie dans un circuit d'analyse des gaz. Le débit des pompes mesuré par un débitmètre massique (précision <1%; Tylan, FM 380) est de 1 L/min pour les cages des rats âgés de 1 mois et de 2 L/min pour les cages à partir de rats âgés de 6 mois. Le pourcentage d' $\text{O}_2$  dans l'air est mesuré par un analyseur d' $\text{O}_2$  paramagnétique (amplitude de mesure 0-100%, délai de mesure <3 s; Klogor, France) et le pourcentage de  $\text{CO}_2$  est mesuré

par un analyseur à infrarouge (amplitude de mesure 0-1%, délai de mesure <3 s; Gascard I, Edinburgh Sensors). Les analyseurs d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> sont étalonnés avant chaque mesure avec de l'azote pur afin de régler les 0 et avec un mélange contenant 20,215% d'O<sub>2</sub> et un mélange contenant 0,600% de CO<sub>2</sub>.

Le système comprend cinq cages. Une cage est laissée vide et sert de référence pour les valeurs d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>. Elles sont placées dans une enceinte fermée et isolée phoniquement. La température ambiante est maintenue à 26°C, proche de la thermoneutralité des rats (Gordon, 1993). Le rythme jour/nuit de la salle de mesure est identique à celui de la pièce d'élevage des rats. Les rats ont libre accès à la nourriture et à l'eau. Les pompes et les analyseurs sont placés dans une pièce adjacente pour éviter toute perturbation des rats consécutive aux manipulations et au bruit. Les rats sont laissés dans les cages afin qu'ils s'habituent pendant 24 heures avant le début des mesures. Chaque jour les analyseurs sont réétalonnés, la nourriture est pesée afin de contrôler la prise alimentaire et les rats sont pesés. Les mesures sont effectuées 23H30 par jour.

Le pourcentage d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> contenu dans l'air à la sortie des cages est analysé en alternance dans les 4 cages et dans la pièce où sont situées les cages. Entre chaque mesure, un temps de rinçage des tuyauteries communes de 90 s est nécessaire afin d'éviter toute interférence de mesures entre les différentes cages et ensuite l'air est analysé sur une période de 40 s. Pendant ces 40 secondes, les valeurs sont enregistrées toutes les 4 secondes et la moyenne est calculée sur les 10 valeurs accumulées.

Le système d'acquisition donne ainsi toutes les 10 min 50 s pour chaque cage une valeur du débit d'air, une valeur de fraction de CO<sub>2</sub> et une valeur de la fraction d'O<sub>2</sub> dans l'air de sortie de la cage. Pour chaque cycle de mesure on calcule les différences pour chaque paramètre mesuré entre les cages contenant les rats et la cage de référence. Ensuite, à l'aide de la formule de calcul de Depocas et Hart (1957) on obtient la dépense énergétique pour chaque rat.

Afin de pouvoir comparer ces données entre deux rats de corpulence différente, les valeurs de métabolisme sont ensuite exprimées en tenant compte de la masse métabolique des animaux. Une approximation de cette masse métabolique est obtenue en prenant le poids des animaux élevé à la puissance 0,67.

Ainsi, la **mesure de la dépense énergétique est exprimée en J/min.kg<sup>0,67</sup>**.

QuickTime™ et un décompresseur  
BMP sont requis pour visualiser  
cette image.

**Figure 14. Installation des rats dans le système de calorimétries indirecte**  
Les 4 cages sont placées dans une pièce isolée dont la température est maintenue  
à 26°C avec un rythme jour/nuit 12-12 h.

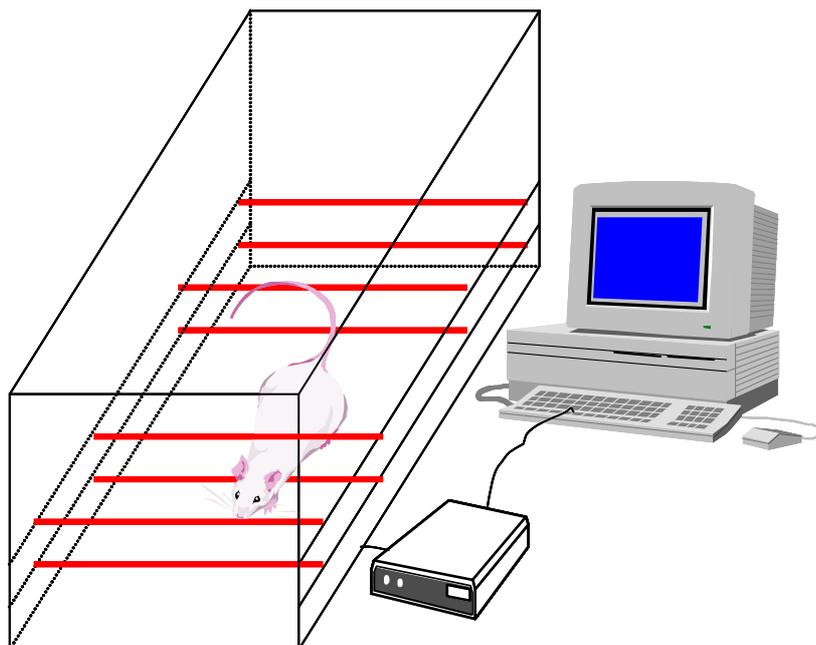
### III. EVALUATION DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE DES RATS

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le «Laboratoire de Neuropharmacologie et Neurochimie INSERM U512-UCBL-ISPBL» avec le Docteur Hélène Scarna.

#### III. 1. Principe (figure 15, 16)

L'activité locomotrice est mesurée à l'aide d'un **actimètre** Imétronic comportant 8 casiers qui reçoivent chacun une cage. Chaque casier est équipé de 4 baguettes infrarouges (2 à l'avant, 2 à l'arrière) espacées de 4 cm en hauteur. Les cages d'enregistrement sont en polycarbonate transparent et mesurent 22 x 15 x 38 cm (l x h x L).

L'ordinateur relié à l'actimètre comptabilise le nombre de va-et-vient, de mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage ainsi que le nombre de mouvements de redressement effectués par chaque animal et les cumule sur des périodes de 30 minutes. Un va-et-vient est enregistré lorsque le rat coupe successivement les rayons infrarouges situés à l'arrière puis à l'avant de la cage (ou inversement). Ce paramètre est utilisé pour quantifier l'activité locomotrice des rats. Un redressement est enregistré lorsque le rat coupe simultanément les rayons infrarouges du haut et du bas.



**Figure 15. Système d'enregistrement d'actimétrie**

Détection des mouvements par rayons infra-rouge.

Mesure du nombre de mouvements par tranche de 30 minutes sur une durée de 24 heures.

Mesures du nombre de mouvements de va et vient, de la somme des mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage et des redressements.

QuickTime™ et un décompresseur  
pTexture sont requis pour visualiser  
cette image.

**Figure 16. Installation des rats dans l'actimètre.**

Il est possible d'effectuer les mesures dans 8 cages simultanément.

### **III. 2. Mesures**

Après une période d'habituation de 24 heures, l'activité locomotrice au cours du cycle circadien est mesurée pendant 24 heures chez des rats Wistar et des rats Lou/C âgés de 6 mois. Les animaux sont placés dans une cage contenant de la sciure et ont librement accès à la nourriture et à l'eau.

## IV. MESURE DE L'ACTIVITÉ CYTOCHROME OXYDASE

### IV. 1. Principe

L'activité de la cytochrome oxydase des membranes mitochondriales est déterminée indirectement. On mesure la consommation d'oxygène par la cytochrome oxydase lors de sa mise en présence avec un substrat spécifique. La mesure d'activité s'effectue dans une cellule thermostatée à 25°C avec un oxygraphe Gilson, muni d'une électrode de Clark. L'appareil est capable de déterminer précisément la concentration en oxygène présente dans la cellule de mesure, mais il nécessite pour cela un étalonnage.

Le point 0% correspond ainsi au niveau où la concentration en oxygène est nulle dans la cellule. Pour cela on ajoute dans la cellule du sulfite de sodium (NaSO<sub>3</sub>) en excès dans le milieu respiratoire. Il a pour rôle de réduire l'oxygène :



Le point 100% correspond à la saturation du milieu en oxygène, par bullage, après un temps d'équilibration.

### IV. 2. Préparation des tissus

L'activité cytochrome oxydase est mesurée sur les homogénats tissulaires de cœur, de foie, de tissu adipeux brun, de tissus adipeux blancs rétropéritonéal et épидидymal de rats âgés de 6 mois. Après sacrifice des animaux, les tissus sont rapidement prélevés et congelés à -80°C. Avant chaque dosage, les échantillons sont broyés au Polytron (ultra-max T8 IKA) dans un milieu composé d'une solution de Chappel et Perry (ATP 1 mM, Hépes 50 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM) contenant un détergent, le lubrol (100 mg.g<sup>-1</sup> de tissus). Après la phase de broyage, une incubation de 30 minutes à 0°C permet de parachever la dilacération mécanique des tissus. Le détergent pourra alors détruire entièrement les membranes plasmiques et mitochondriales, afin de démasquer l'activité de la cytochrome oxydase présente dans ces membranes.

### IV. 3. Dosages

L'activité enzymatique d'une fraction d'homogénat va être alors mesurée par polarographie à 25°C dans un milieu respiratoire approprié (Cytochrome c 30  $\mu\text{M}$ , roténone 4  $\mu\text{M}$ , 2-4 dinitrophénol 0,5  $\mu\text{M}$ , hépes 75 mM, malonate de sodium 10 mM, pH 7,4) avec comme substrat un mélange Ascorbate/TMPD (8  $\mu\text{M}$ /0,6 mM). Dans la cellule de l'oxygraphe d'un volume de 1,5 ml, on injecte 37,5  $\mu\text{l}$  de l'homogénat (50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) dans 1450  $\mu\text{l}$  de milieu respiratoire. L'addition de 20  $\mu\text{l}$  de substrat permet alors d'initier la respiration. La cytochrome oxydase catalyse l'oxydation aérobie de la cytochrome c préalablement réduite par le substrat Ascorbate/TMPD. L'activité spécifique, exprimée en nanoatome d'oxygène, est obtenue par la différence entre la consommation d'oxygène due à la présence d'enzyme proprement dit, et celle liée à l'autooxydation de l'ascorbate (milieu respiratoire et Ascorbate/TMPD).

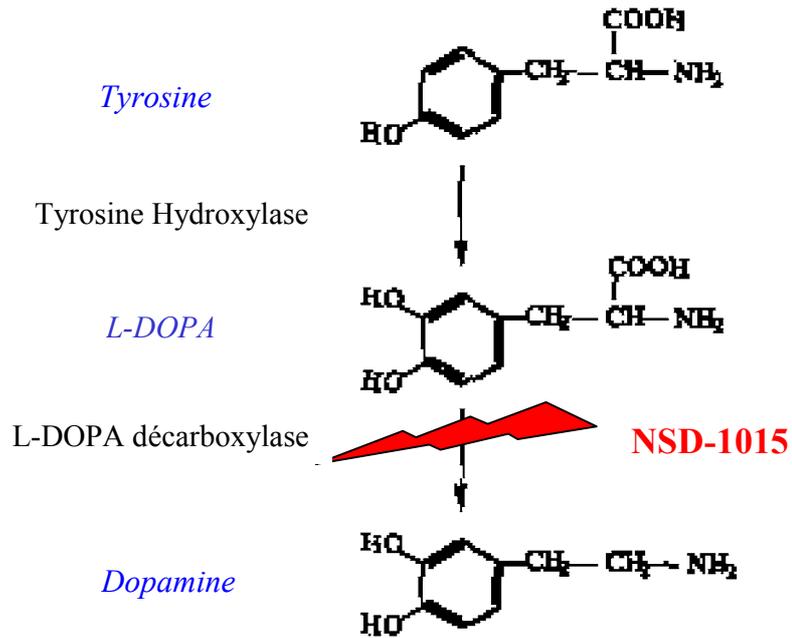
## V. NEUROCHIMIE

Les catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline), la sérotonine, l'acide 5-hydroxyindolamine, la L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) et la 5-hydroxytryptophane (5-HTP) sont détectées dans les échantillons en utilisant la technique de chromatographie liquide haute performance suivie d'une détection électrochimique (Pequignot et al, 1987, Dalmaz et al, 1994).

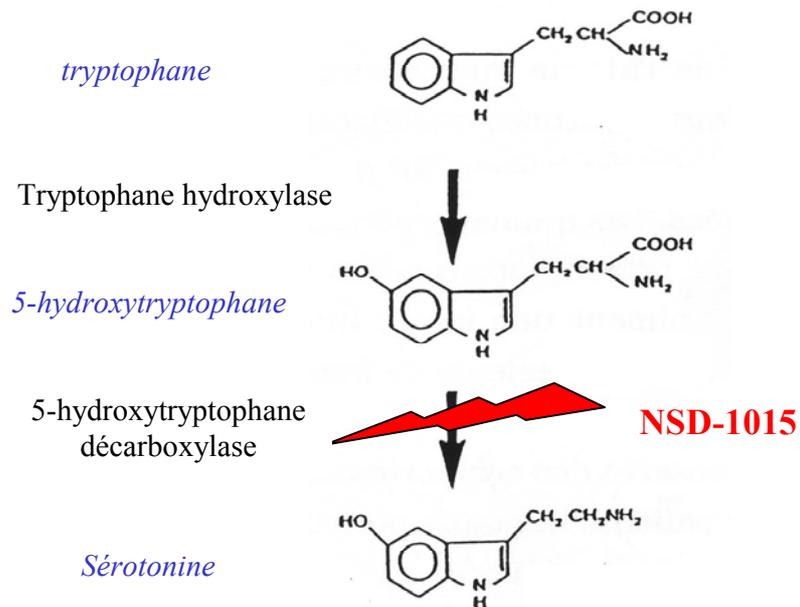
### V. 1. Traitement pharmacologie pour l'étude de l'activité *in vivo* de la tyrosine hydroxylase et de la tryptophane hydroxylase (Figure 17)

Le NSD 1015 (3-hydroxybenzylhydrazine dihydrochloride, Sigma, St Louis, USA) est un inhibiteur des L-aromatic acide décarboxylases, notamment de la dopa-décarboxylase et de la tryptophane-décarboxylase qui permettent respectivement l'hydroxylation de la L-DOPA en dopamine et l'hydroxylation de la 5-HTP en sérotonine. L'injection intra-péritonéale d'une solution de NSD 1015 à 100 mg/kg entraîne une accumulation de la L-DOPA et de la 5-HTP dans les structures. L'accumulation de L-DOPA et de la 5-HTP *in vivo* pendant un temps donné permet une bonne estimation de l'activité tyrosine hydroxylase et de l'activité tryptophane hydroxylase des structures. Cette accumulation est linéaire pendant 20 minutes (Lachuer et al, 1991) dans la plupart de structures périphériques et centrales. Ces mêmes auteurs ont également montré que les contenus en L-DOPA et en 5-HTP sont négligeables chez les animaux témoins ayant reçu une injection de sérum physiologique. Les rats reçoivent par voie intra-péritonéale une solution de NSD 1015, 20 minutes avant le sacrifice. Les activités tyrosine hydroxylase et tryptophane hydroxylase sont exprimées en picomoles de L-DOPA/20 minutes et 5-HTP/20 minutes pour les structures centrales et en picomoles de L-DOPA/20 minutes par g d'organe pour tenir compte de la différence de poids des organes entre les deux souches.

A



B



**Figure 17. Action du NSD-1015 sur la chaîne de synthèse des catécholamines (A) et de la sérotonine (B).**

Le NSD-1015 inhibe l'activité des L-amino-acide aromatique décarboxylases. Une mesure de l'accumulation de L-DOPA ou de 5-hydroxytryptophane, 20 minutes après injection de NSD-1015, permet d'évaluer l'activité de la tyrosine hydroxylase et de la tryptophane hydroxylase.

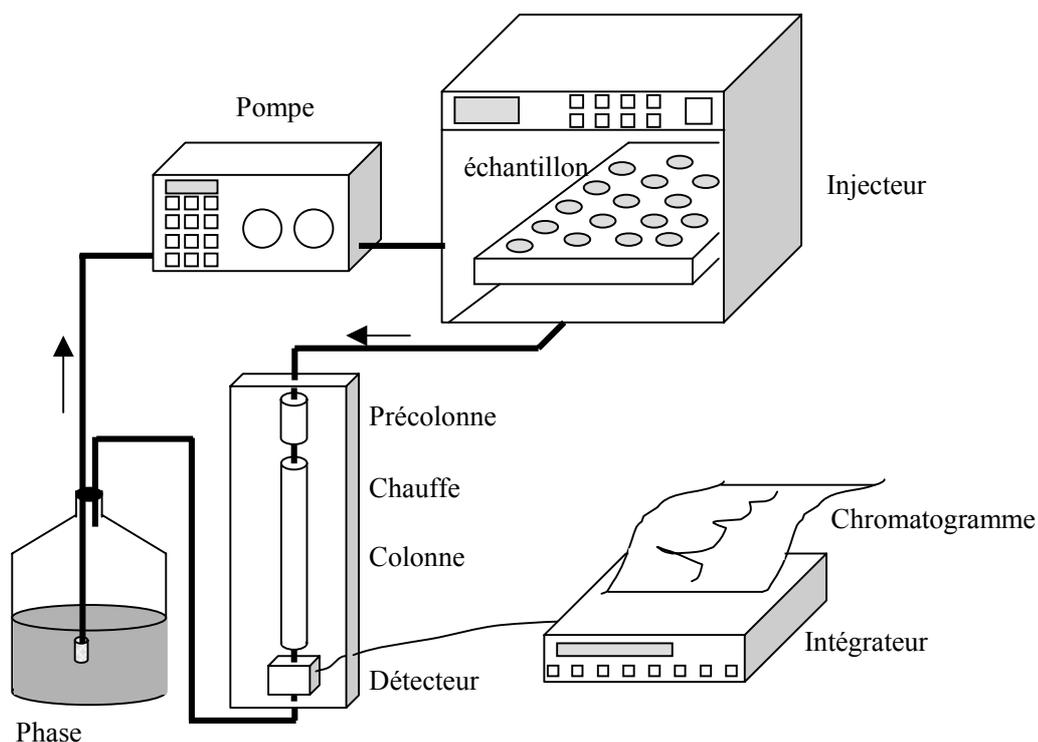
## V. 2. Technique de chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électrochimique (HPLC-ED)

### V. 2. a. Principe (Figures 18 et 19)

La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électrochimique est une méthode de séparation de molécules fondée sur l'entraînement de celles-ci par une phase mobile propulsée par une pompe. Les paramètres régissant la séparation des molécules dépendent de nombreux facteurs tels que le type de colonne utilisée (nature et diamètre des composants ; longueur et diamètre de la colonne), le pH de la phase mobile, la température et la charge ionique. Le type de séparation utilisé est à polarité inversée, la colonne est remplie avec une phase de silice greffée, les greffons étant de type alkyl (chaîne de C<sub>4</sub> à C<sub>8</sub>). La séparation est basée sur la force ionique de chaque molécule. Elles sont séparées les unes des autres par interaction plus ou moins forte avec la phase dite stationnaire qui correspond à un garnissage de microbilles de silice contenu dans la colonne de séparation.

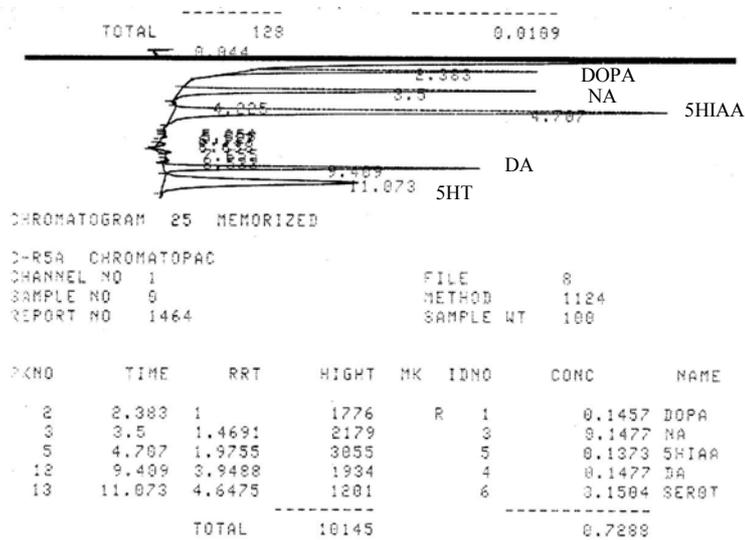
Les catécholamines, la L-DOPA et la 5-HTP possèdent un noyau catéchol ayant des groupements hydroxyles facilement oxydables. Les composés sont détectés électrochimiquement (détection ampérométrique) à la sortie de la colonne. Le détecteur est composé de 3 électrodes distinctes : une électrode de référence (Ag<sup>+</sup>/AgCl), une électrode de travail en carbone vitreux chargée d'effectuer l'oxydation et une électrode auxiliaire.

Une différence de potentiel stable (+0,67V) règne entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Cette tension permet l'oxydation spécifique des composés, ici le noyau catéchol en noyau orthoquinone. Au cours de cette oxydation, des protons et des électrons sont perdus par la molécule. L'électrode auxiliaire génère alors un courant d'électrons proportionnel à la quantité de composés oxydables présents dans la cellule de mesure. Ce courant va être amplifié et transcrit sous forme de tracé dont les inflexions et les déflexions sont analysées sous forme de surface ou de hauteur de pics.



**Figure 18. Schéma représentant la chaîne de dosage HPLC couplée à une détection électrochimique.**

Après séparation des différentes molécules chargées, l'oxydation des amines va être détectée par une électrode et va être transcrite sous forme d'un tracé, dont les hauteurs de pic seront proportionnelles à la



**Figure 19. Exemple de chromatogramme**

### *V. 2. b. Dosages*

#### *V. 2. b. $\alpha$ Les glandes medullosurrénales*

Chaque glande surrénale est placée dans 100 $\mu$ l d'acide perchlorique 0,4 M contenant 2,7mM d'EDTA-Na<sub>2</sub>. A ce stade de la manipulation, il est possible de les conserver à -80°C. Extemporaneément les structures sont décongelées, puis le volume est complété à 200 $\mu$ l avec une solution contenant du dihydrobenzylamine (DHBA) comme étalon interne. Les surrénales sont ensuite broyées aux ultrasons pendant 30 secondes à une fréquence de 20000 Hz. Après addition d'eau bidistillée, les homogénats sont centrifugés pendant 6 minutes à 8800 x g. Enfin le surnageant est dilué dans de l'acide acétique 0,02 M.

Un étalonnage est effectué au préalable avec une solution à base d'acide perchlorique 0,02 M contenant 100 pg/10  $\mu$ l, de noradrénaline, d'adrénaline, de dopamine et de dihydrobenzylamine (DHBA). Ceci permet de calibrer l'appareil en déterminant les temps de rétention et l'intensité de détection.

Les aliquots de 5  $\mu$ l des échantillons, volume permettant un bon compromis entre le niveau de détection et le niveau de bruit de fond, sont injectés dans une colonne montée en phase réverse (Licrospher RP 18 ec, 5  $\mu$ m, 250 x 3 mm). L'élution s'effectue par une phase mobile contenant 50 mM d'acide citrique, 50 mM d'acétate de sodium, 1 mM d'EDTA-Na<sub>2</sub>, 437 mM d'acide acétique, 2,13 mM d'heptane sulfonate et 7% de méthanol à un débit de 0,4 ml/min.

#### *V. 2. b. $\beta$ Les tissus*

La quantité de noradrénaline et l'accumulation de L-DOPA ont été mesurées sur des lots de rats différents.

Les organes sont décongelés et broyés dans un volume connu d'acide perchlorique 0,4 M contenant 2,7mM d'EDTA-Na<sub>2</sub> et en présence d'une quantité connue DHBA (standard interne). Les tubes sont laissés reposés 10 minutes dans de la glace. Un volume de solution d'acide perchlorique 6 M et de KOH formiate 7,7 M est ajouté pour précipiter l'excès d'acide perchlorique. Cet homogénat est vortexé et centrifugé à 8800 x g pendant 10 minutes.

Un volume connu de surnageant est ensuite purifié sur alumine dans un tube Eppendorf contenant 20 mg d'alumine purifiée, 100  $\mu$ l de bisulfite de sodium 0,75% et 0,5 ml de tampon Tris 2,8 M, pH 9,3. Après une agitation de 15 minutes, chaque surnageant est aspiré et l'alumine est lavée 3 fois avec 1 ml de solution tampon Tris contenant 14 mM de Tris-HCl et 2,7 mM d'EDTA-Na<sub>2</sub>.

La L-DOPA, la noradrénaline et le DHBA sont élués de l'alumine avec un volume adéquat d'acide perchlorique 0,3M contenant 1mM d'EDTA-Na<sub>2</sub> et 1mg de sodium bisulfite par mL. L'éluat est agité pendant 5 minutes et centrifugé à 8800 x g pendant 15 minutes.

Les aliquots de 15 µl des échantillons, volume permettant un bon compromis entre le niveau de détection et le niveau de bruit de fond, sont injectés sur une colonne montée en phase réverse (Spherisorb ODS-2,5 µm, 125 x 4 mm). L'analyse s'effectue sur une phase mobile contenant 50 mM d'acide citrique, 50 mM d'acétate de sodium, 1 mM d'EDTA-Na<sub>2</sub>, 437 mM d'acide acétique, 4,3 mM d'octane sulfonate et 4% de méthanol à un débit de 0,9 ml/min.

#### *V. 2. b. δ Les punches (Figure 20)*

Les contenus en monoamines et l'accumulation de L-DOPA ou de 5-HTP ont été mesurées sur des lots de rats différents.

Une fois le rat décapité, le cerveau est rapidement extrait puis congelé à -80°C sur un lit de carboglace.

#### *- Réalisation des coupes*

La partie rostrale du cerveau congelé est fixée avec une colle Tissue Freezing Medium (Leica Instrument GmbH, Germany) sur la platine du microtome réglée pour permettre la réalisation des coupes successives. L'épaisseur des coupes obtenues est de 480 µm. Ces coupes sont ensuite rapidement déposées sur une lame de verre et congelées sur de la carboglace.

#### *- Microdissection proprement dite*

Les différentes structures sont prélevées bilatéralement selon la technique de microdissection (Palkovits et Brownstein, 1987) qui consiste à prélever des structures à l'aide d'une micro-aiguille creuse de 0,9 mm de diamètre. Les échantillons sont déposés dans de l'acide perchlorique 0,1 M puis congelés à -80°C.

Le groupe cellulaire A1C1 est disséqué bilatéralement sur 6 coupes successives (Bregma -15/ -11,8 mm) et le groupe cellulaire A2C2 sur 8 coupes (Bregma -14,6/ -11,3 mm).

Le groupe cellulaire A6 ou locus coeruleus est situé dans la partie dorsale du pont, il est prélevé bilatéralement sur 4 coupes successives (Bregma -10,6/ -9 mm) et le groupe cellulaire A5 est prélevé sur 3 coupes (Bregma -10,2/ -9 mm)

On dissèque le raphe dorsalis à la base de l'aqueduc central sur 4 coupes successives (Bregma -8,8/ -7 mm). Le raphe médian est prélevé sous le raphe dorsalis sur 3 coupes successives (Bregma -8,3/ -7 mm).

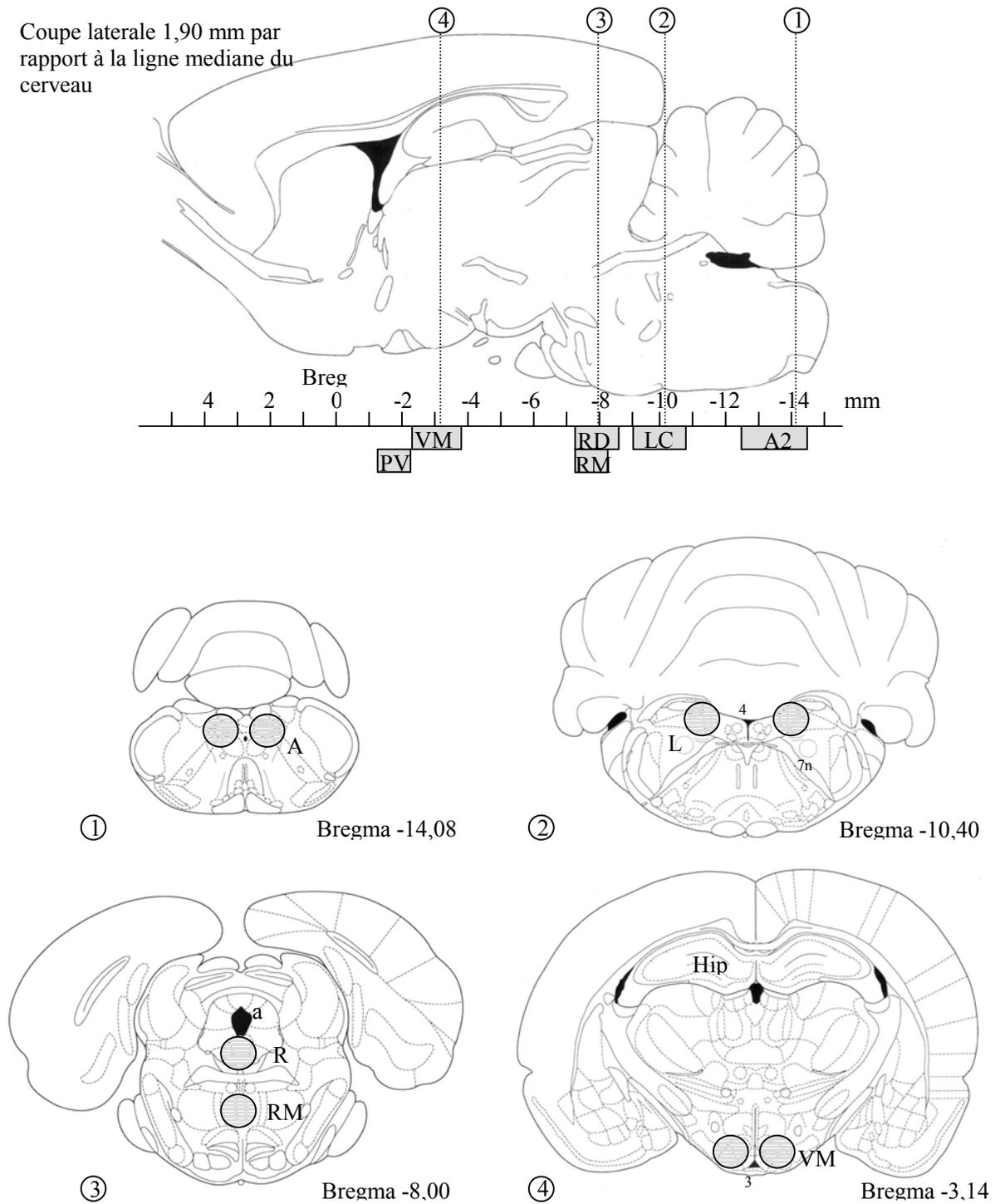
Les noyaux hypothalamiques ventromédian et paraventriculaire sont disséqués bilatéralement de part et d'autre du 3<sup>ème</sup> ventricule, l'hypothalamus ventromédian sur 3 coupes (Bregma -3,6/ -2,1 mm) et le noyau paraventriculaire sur 2 coupes successives (Bregma -1,9/ -0,9 mm).

*- Préparation des échantillons*

Chaque punch est placé dans 200 µl (100 µl pour le locus cœruleus) d'acide perchlorique 0,1 M contenant 2,7mM d'EDTA-Na<sub>2</sub>. A ce stade de la manipulation, il est possible de les conserver à -80°C. Extemporaneément les structures sont décongelées, elles sont ensuite broyées aux ultrasons pendant 1 minute dans un bain de glace à une fréquence de 20000 Hz. Les broyats sont vortexés puis centrifugés pendant 6 minutes à 8800 x g.

Les aliquots de 15 µl des échantillons, volume permettant un bon compromis entre le niveau de détection et le niveau de bruit de fond, sont injectés sur une colonne montée en phase réverse (Spherisorb ODS-2,5 µm, 125 x 4 mm). L'analyse s'effectue sur une phase mobile contenant 50 mM d'acide citrique, 50 mM d'acétate de sodium, 1 mM d'EDTA-Na<sub>2</sub>, 437 mM d'acide acétique, 4,3 mM d'octane sulfonate et 4% de méthanol à un débit de 0,9 ml/min.

Coupe latérale 1,90 mm par rapport à la ligne médiane du cerveau



**Figure 20. Localisation sur une coupe latérale et sur des coupes frontales de cerveaux de rat des différentes structures microdisséquées par la technique de punch.**

3V, troisième ventricule; 4V, quatrième ventricule; 7n, septième paire de nerfs crâniens; A2, groupe cellulaire noradrenergique A2; aq, aqueduc central; Hipp, hippocampe; LC, locus coeruleus; RD, raphe dorsal; RMn, raphe median; VMH, hypothalamus ventromedian.

## **VI. TECHNIQUE DE DOSAGE RADIO IMMUNOLOGIQUE DE L'INSULINE ET DE LA LEPTINE PLASMATIQUE**

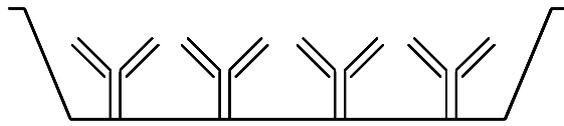
### **VI. 1. Prélèvement sanguin**

Les échantillons de sang sont prélevés via la veine de la queue et sont placés dans des tubes Ependorf contenant 3µl d'EDTA-Na<sub>2</sub> 10%, afin d'éviter la coagulation (l'héparine étant déconseillée, celle-ci pouvant interagir avec les anticorps et fausser les mesures des protéines à doser). Après centrifugation (13000 x g, 15 minutes, + 4 °C), le plasma est conservé à -80°C. Les dosages de chaque protéine à tous les âges ont été effectués en une seule fois, afin de limiter les sources de variabilités et de pouvoir comparer les variations de concentrations entre les âges au sein de chaque souche. Les prélèvements ont tous été réalisés entre 9h et 12h le matin afin d'éviter les différentes variations circadiennes de la sécrétion de la leptine et de l'insuline.

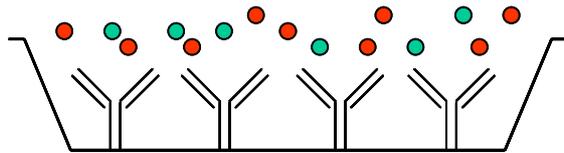
### **VI. 2. Principe du dosage (Figure 21)**

La technique de dosage radioimmunologique a été mise au point par Yalow et Berson en 1960 pour le dosage de l'insuline (Yalow recevra le prix Nobel pour cette découverte).

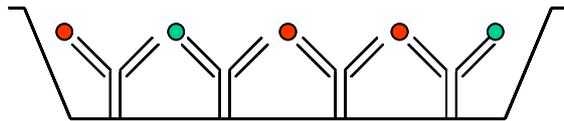
Une concentration déterminée d'antigène marqué est mise à incuber avec un anticorps spécifique de cet antigène. L'addition d'un antigène non marqué induit la compétition avec l'antigène marqué pour la fixation sur l'anticorps. La quantité d'antigènes marqués fixés à l'anticorps diminue proportionnellement à la concentration croissante d'antigènes non marqués. La quantité d'antigène marqué est évaluée dans la solution de rinçage (partie non fixée) ou/et en mesurant la quantité du complexe anticorps/antigène marqué après rinçage.



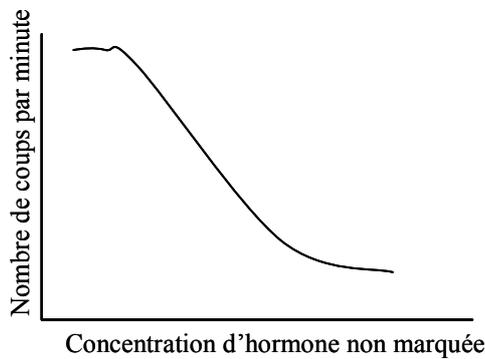
Présence dans le tube de dosage d'anticorps dirigés spécifiquement contre l'hormone à doser



Ajout d'une quantité connue et constante de l'hormone marquée à l'iode 125 (●) et d'un volume de plasma contenant l'hormone non marquée (●).



Les complexes anticorps-antigènes sont précipité et l'excès d'hormones marquées ou non, non liées aux anticorps et supprimé par rinçage.



On détermine une courbe d'étalonnage en représentant le nombre de coup par minute (reflet de la quantité d'hormone marquée qui est restée fixée aux anticorps) en fonction d'une quantité croissante d'hormone non marquée.

**Figure 21: Principe général de la méthode de dosage radio-immunologique.**

### **VI. 3. Dosages**

Les dosages sont effectués à l'aide d'un kit de dosage radioimmunologique d'insuline de rat (Linco Research, Inc. St Charles, MO).

#### **Les solutions du kit**

##### *Diluant :*

Tampon phosphosalin pH = 7.4, contenant 0.025 M d'EDTA, 0.08% d'Azide de Sodium et 1% de BSA.

##### *Anticorps :*

Anti-sérum de cobaye dirigé contre l'insuline de rat ou contre la leptine de rat.

##### *Hormone marquée :*

Insuline marquée à l'iode 125 ou leptine marquée à l'iode 125.

##### *Solutions d'étalonnage :*

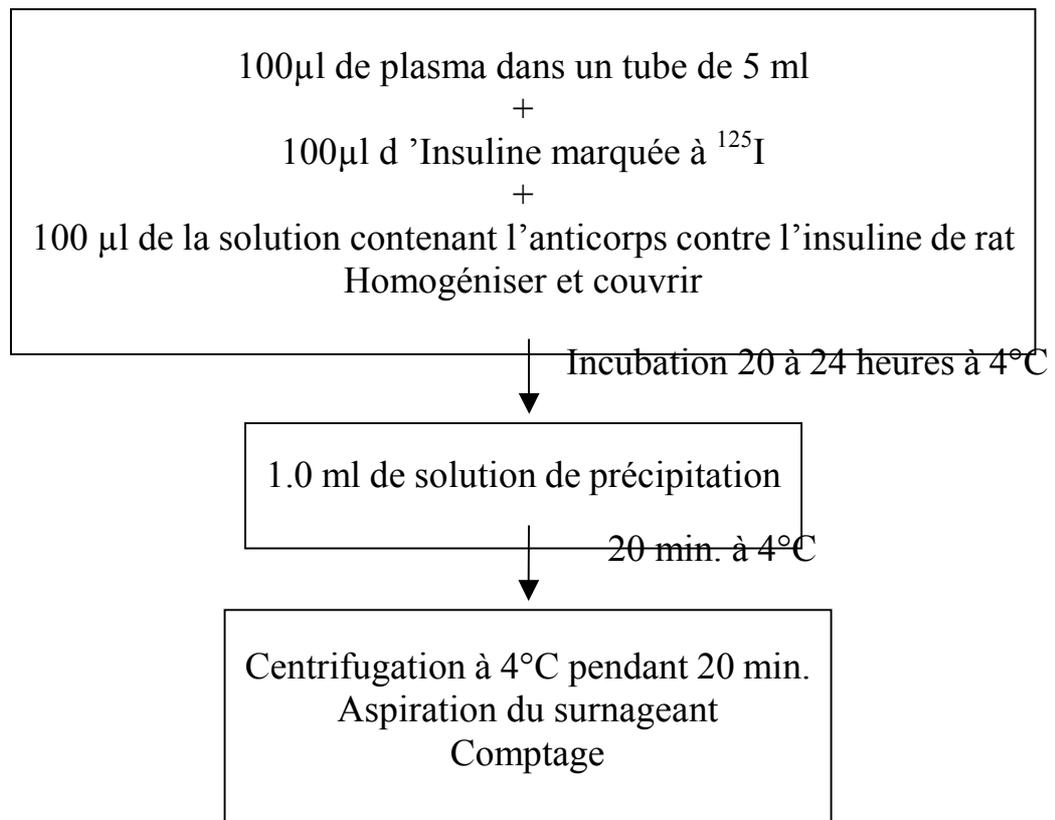
Elles contiennent des concentrations connues de l'hormone à doser : 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 et 10.0 ng/ml pour l'insuline et 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 et 50 ng/ml pour la leptine.

##### *Solution précipitante :*

Gamma Immunoglobuline de chèvre anti cobaye dans du tampon phosphosalin 0.05 M contenant 3% de PEG, 0.05% de Triton X 100, 0.025 M EDTA, 0.08% d'azide de sodium.

#### ***Insuline***

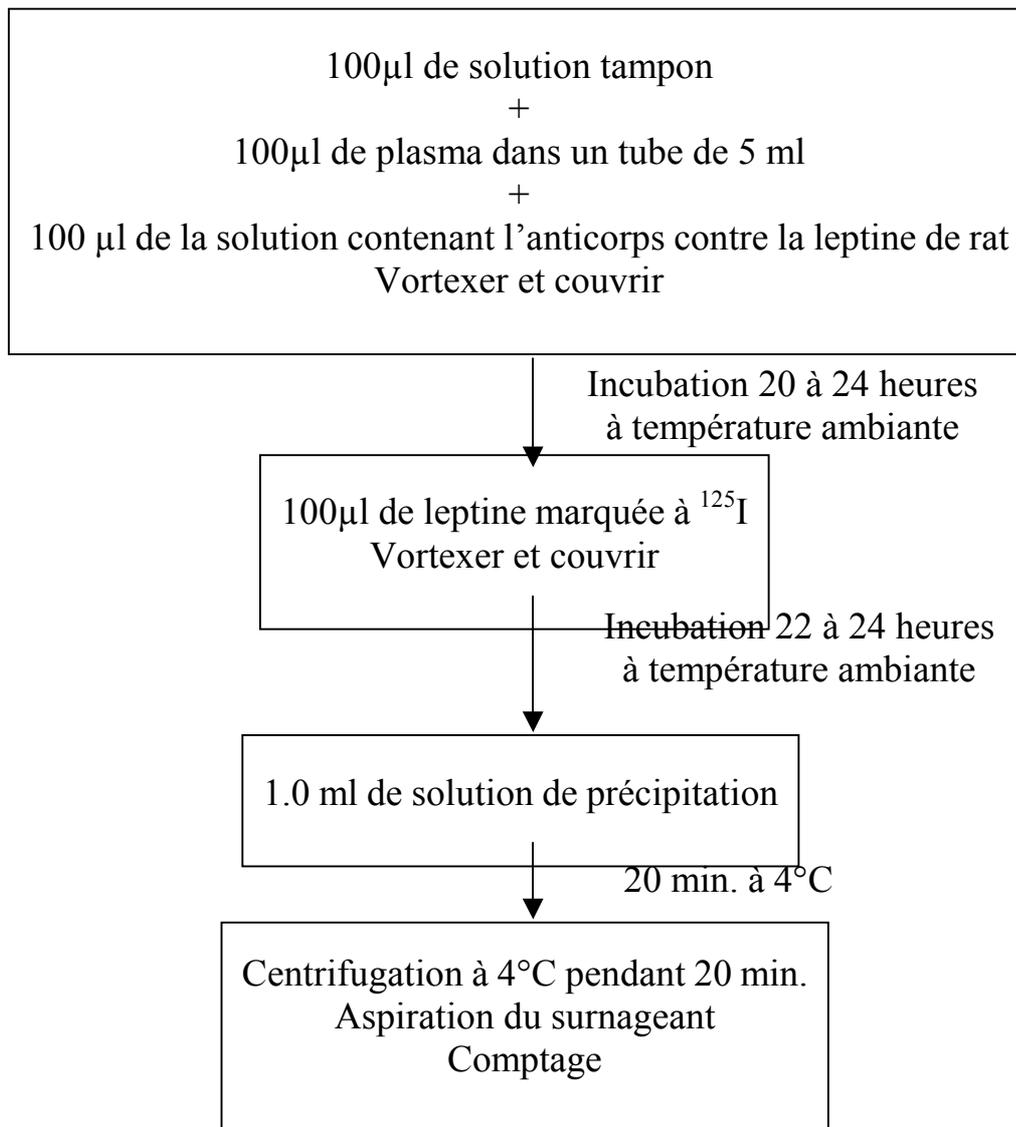
Dans un tube de polypropylène de 5 ml contenant un volume déterminé de plasma à doser (50 µl), on ajoute 100 µl d'insuline marquée à l'Iode 125. On ajoute ensuite 100 µl de l'anticorps dirigé contre l'insuline de rat. Ce mélange est ensuite homogénéisé et mis à incuber pendant 20 à 24 heures à 4°C. Le 2<sup>ème</sup> jour, on ajoute 1 ml de solution de précipitant, on vortexe et on laisse incuber 20 min à 4°C. Après centrifugation (2000×g, 20 min à 4°C) le surnageant est aspiré et la radioactivité restante dans les tubes est quantifiée pendant 1 min dans un compteur gamma.



### Schéma récapitulatif du protocole de dosage radioimmunologique de l'insuline

#### *Leptine*

Dans un tube de polypropylène de 5 ml contenant un volume défini de tampon phosphosalin (100 µl) sont ajoutés 50 µl de plasma à doser. Ensuite, on ajoute 100 µl de l'anticorps dirigé contre la leptine de rat. Après une incubation de 20 à 24 heures à température ambiante, on ajoute 100 µl de leptine marquée à l'iode 125. On homogénise et on laisse incuber 22 à 24 heures à température ambiante. Le 3<sup>ème</sup> jour, on ajoute 1 ml de solution de précipitant, on vortexe et on laisse incuber 20 min à 4°C. Après centrifugation (2000×g, 20 min à 4°C) le surnageant est aspiré et la radioactivité restante dans les tubes est quantifiée pendant 1 min dans un compteur gamma.



**Schéma récapitulatif du protocole de dosage RIA de la leptine**

#### **VI. 4. Quantification**

Le traceur utilisé est marqué à l'iode 125 ( $^{125}\text{I}$ , demi-vie : 60 jours). La détection de la radioactivité du précipité est réalisée par un compteur gamma (cpm). Cette radioactivité correspond à la quantité de leptine marquée qui a pu se fixer aux anticorps. Elle est donc inversement proportionnelle à la quantité de leptine déjà présente dans l'échantillon à doser. En même temps que l'on effectue les dosages des échantillons, une gamme étalon est réalisée.

Après retrait de la radioactivité non spécifique des valeurs données par le compteur, on calcule par différence la quantité en ng/ml dans chaque échantillon en se référant à la courbe d'étalonnage. La limite de sensibilité et de linéarité de la relation cpm/concentration est de 0,5 à 50 ng/mL pour le kit leptine et de 0,1 à 10 ng/mL pour le kit insuline.

## **VII. DÉTERMINATION DE LA GLYCÉMIE**

Un volume de 10  $\mu$ L de plasma est nécessaire afin de doser la glycémie à l'aide d'un analyseur Beckman. Le plasma est injecté dans une solution de glucose oxydase. Une électrode de Clark va quantifier le nombre d'atomes d'oxygène consommés lors de la réaction d'oxydation du glucose contenu dans l'échantillon de plasma à doser.

## **VIII. DÉTERMINATION DE LA RÉSISTANCE PÉRIPHÉRIQUE À L'INSULINE**

### **VIII. 1. Principe du clamp euglycémique-hyperinsulinique**

La technique consiste en la perfusion d'insuline à débit constant dans le rat afin d'avoir une insulinémie stable, associé à une perfusion de glucose variable afin de maintenir une glycémie constante. La quantité de glucose perfusée est proportionnelle à la quantité de glucose utilisée sous l'action de l'insuline. Ceci permet de déterminer la sensibilité de l'organisme à l'insuline et à fortiori de déceler une insulino-résistance.

### **VIII. 2. Protocole**

La technique de clamp euglycémique hyperinsulinique est basée sur le protocole de Kreagen et al. (1983), mais dans notre étude les rats au moment des mesures sont éveillés et non contraints. Les rats utilisés au cours de cette étude sont âgés de 22 mois. Les rats sont anesthésiés à l'halothane et 2 cathéters en polyéthylène sont insérés, un dans la veine jugulaire droite et l'autre dans l'artère carotide gauche. Les cathéters ressortent au niveau de la nuque par une incision dans la peau, ils sont remplis jusqu'à utilisation d'une solution saline de citrate. Le cathéter carotidien sert pour prélever le sang alors que le cathéter

jugulaire sert à l'injection. Les mesures ont été effectuées après 5 jours de récupération après l'opération. La nuit avant l'expérimentation, les rats ont été privés de nourriture. Afin d'obtenir une insulïnémie constante, les rats sont perfusés avec de l'insuline biosynthétique humaine (Actrapid HM, 40 U/ml, Novo Industry, Danemark) à un débit de 6 mU/Kg.min (diluée dans de la saline avec 1% d'albumine). 25 µl de sang sont prélevés toutes les 5 minutes pour doser la glycémie et 100 µl sont prélevés aux temps 0, 60 et 120 minutes pour le dosage de l'insulïnémie. La glycémie est maintenue à un niveau basal (6 mM) par la perfusion de glucose à l'aide d'une pompe péristaltic (Gilson). Le débit de la pompe est ajusté après chaque mesure de glycémie. La moyenne du débit d'infusion de glucose pour maintenir une glycémie constante est calculé sur la 2<sup>ième</sup> heure de l'expérimentation. Les résultats sont exprimés en mg glucose/kg.min et sont considérés comme le reflet de l'utilisation du glucose à l'échelle de l'organisme entier.

## **IX. STATISTIQUES**

Les résultats sont exprimés en donnant la valeur moyenne de chaque groupe et l'erreur standard à la moyenne ( $m \pm SEM$ ). Les différences entre groupes sont considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ .

Les tests statistiques utilisés sont des analyses de variance (ANOVA) à 2 voies (effets de l'âge et de la souche par exemple) couplées à un test post-hoc de Bonferroni pour l'analyse groupe par groupe.

Pour comparer deux groupes d'animaux, on utilise le test de Student.

Tous les tests statistiques sont effectués en utilisant le logiciel Statview (Abacus Concepts Berkeley, CA, USA).

# RESULTATS

## I. ETUDE DES DIFFERENCES MORPHOMETRIQUES ENTRE LES RATS LOU/C ET LES RATS WISTAR

Pour l'étude de la **balance énergétique**, il faut considérer, d'une part les **entrées** (la prise alimentaire) et d'autre part les **sorties** (dépense énergétique) et la **mise en réserve**. La dépense énergétique peut être subdivisée en plusieurs composantes : le métabolisme basal lié aux dépenses énergétiques de fond, indispensables au maintien de la vie (grandes fonctions, métabolisme cellulaire) ; les dépenses énergétiques liées à l'activité musculaire ; celles liées à la thermogénèse (lutte contre le froid, thermogénèse postprandiale) et la dépense énergétique liée à l'assimilation métabolique des aliments. Il existe également une dépense énergétique spécifique liée à l'incorporation des aliments et aux synthèses organiques au cours de la croissance.

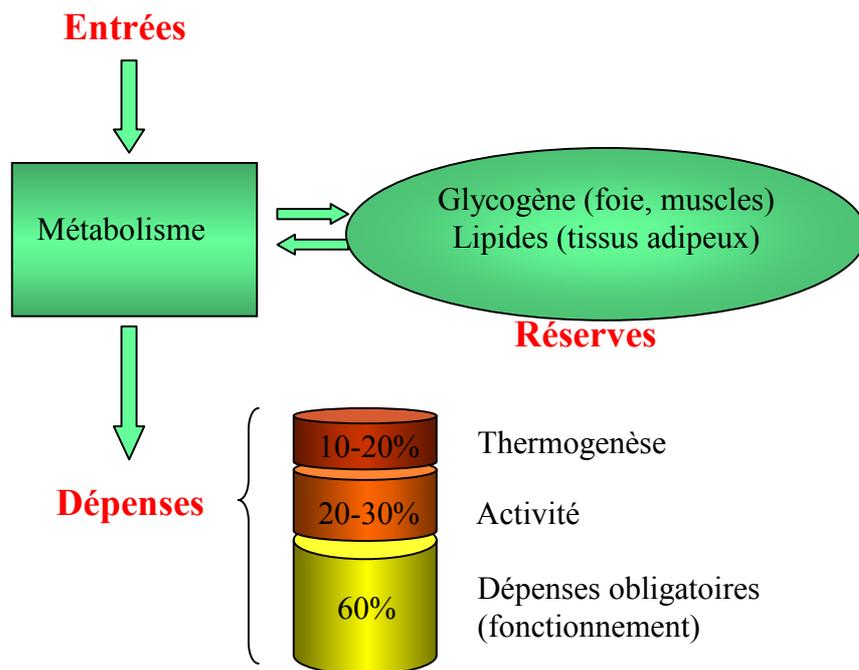


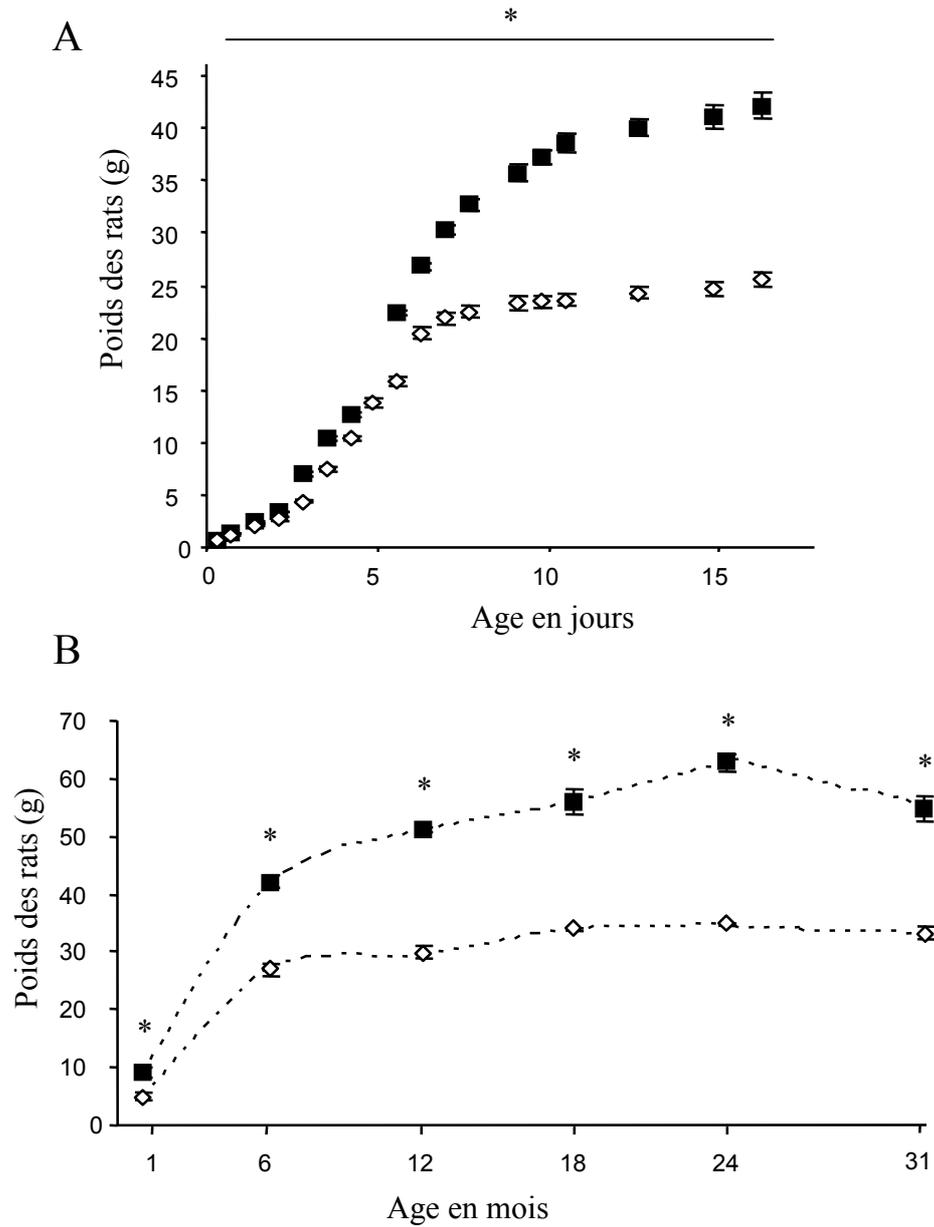
Schéma de la balance énergétique à l'échelle de l'organisme

Dans un premiers temps, les résultats concernant les données morphométriques nous permettront de caractériser les différences de réserves lipidiques entre les rats Lou/C et les rats Wistar. Dans la deuxième partie des résultats, nous nous focaliserons sur la prise alimentaire ainsi que sur certaines composantes de la dépense énergétique (dépense énergétique moyenne, activité locomotrice, activité cytochrome oxydase au niveau tissulaire).

### **I. 1. Evolution du poids des rats (Figures 22 et 23)**

Les données concernant le poids des rats ont été recueillies sur l'ensemble des cohortes de rats élevés au laboratoire. Nous avons pu ainsi obtenir des données sur l'évolution hebdomadaire du poids corporel jusqu'à 6 mois et ensuite les poids ont été relevés aux âges étudiés au cours des différentes expérimentations de cette étude (12, 18, 24 et 31 mois). L'évolution du poids des rats est caractérisée par une phase de forte croissance jusqu'à 2 mois (la maturité sexuelle des rats). Ainsi, le poids des rats des 2 souches est multiplié par un facteur d'environ 4 entre les âges de 1 et 2 mois. Ensuite la masse pondérale augmente mais de manière plus progressive (+49%,  $p < 0,0001$ , pour les rats Wistar et +29%,  $p < 0,0001$ , pour les rats Lou/C entre 6 et 24 mois). A 31 mois, les rats Wistar présentent une diminution de leur poids par rapport à 24 mois (-15%,  $p < 0,05$ ) alors que le poids des rats Lou/C ne varie pas entre ces deux âges.

Dès l'âge de 3 jours, les rats Lou/C présentent un poids significativement inférieur à celui des rats Wistars (6,1 g et 7,3 g respectivement, -17%,  $p < 0,0001$ ). Cette différence de poids se retrouve à tous les âges étudiés et la différence est amplifiée au cours du développement pour atteindre -46% à 1 mois. Au delà de 1 mois, la différence de poids entre les rats Wistar et les rats Lou/C reste constante (-36%, -42%, -39%, -45% et -43%,  $p < 0,0001$  aux âges 1, 6, 12, 18, 24 et 31 mois, respectivement).



**Figures 22-23. Evolution du poids des rats Lou/C (◇) et des rats Wistar (■) de 3 à 161 jours (A) et de 1 à 24 mois (B).**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. \*  $p < 0,05$  représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C.

## I. 2. Evolution du poids des organes (Tableau 4, Figures 24 et 25)

Les organes ont été pesés à 2, 6 et 24 mois.

Les poids du **cœur** des rats Wistar et des rats Lou/C augmentent progressivement au cours du vieillissement (+64%,  $p < 0.01$ , pour les rats Wistar entre 2 et 24 mois et +98%,  $p < 0.01$ , pour les rats Lou/C). Le cœur des rats Lou/C présente aux trois âges étudiés un poids inférieur à celui des rats Wistar.

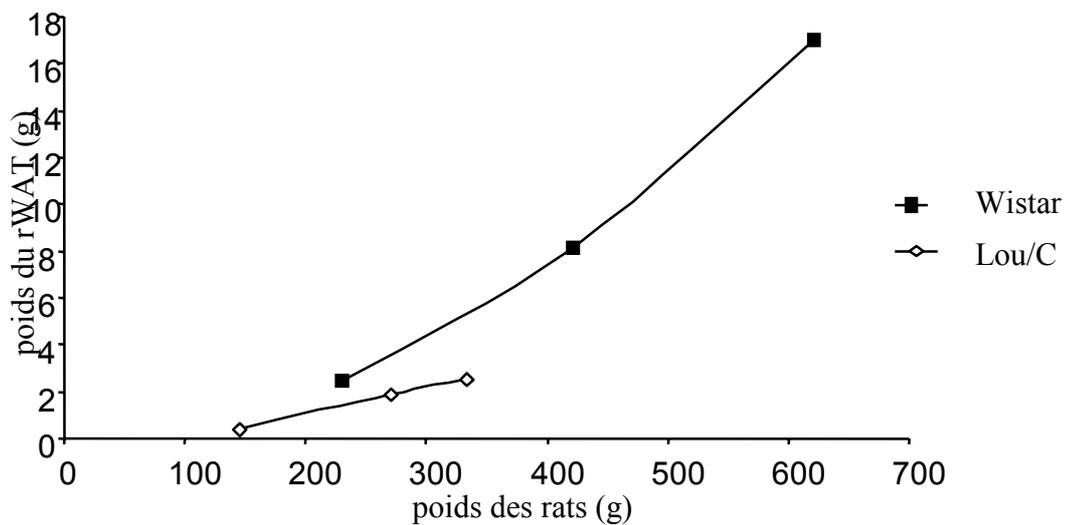
Le poids du **cerveau** des rats Lou/C est plus faible que celui des rats Wistar, mais cette différence de poids n'est significative qu'à 6 et 24 mois (-18% et -12%,  $p < 0.01$ , respectivement).

Les rats Lou/C présente aux trois âges, **un foie** de poids plus faible en comparaison avec celui des rats Wistar.

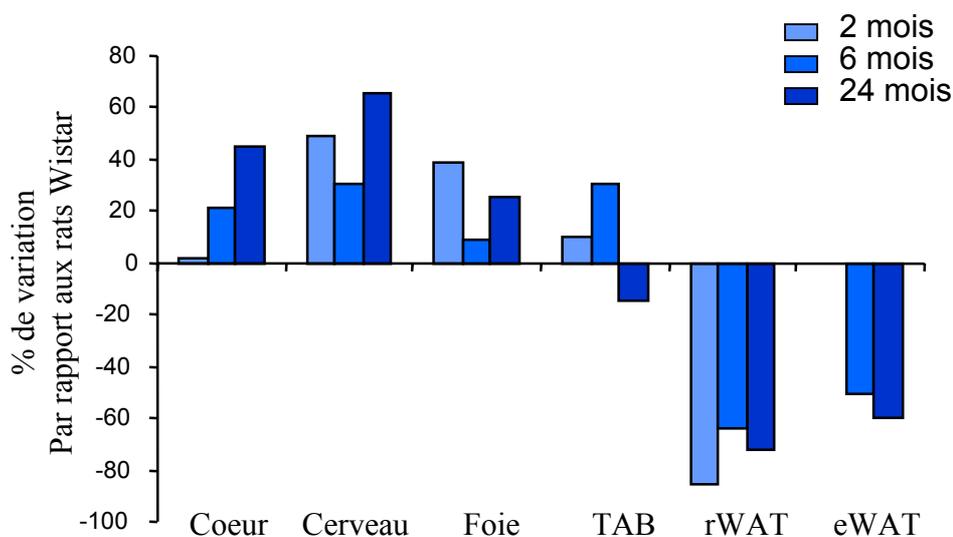
Les différences de poids les plus remarquables concernent **les tissus adipeux blancs**, c'est à dire les tissus qui servent à la mise en réserve des lipides. En effets, par rapport aux rats Wistar, les rats Lou/C ont environ cinq fois moins de tissu adipeux blanc rétro-péritonéal quelque soit l'âge. De plus, à 6 et 24 mois, les rats Lou/C présentent 3 à 4 fois moins de tissus adipeux blanc épидидymal que les rats Wistar. La mesure du poids du tissu adipeux blanc rétro-péritonéal est un bon reflet de l'évolution de la masse de lipide des rats (Newby 1990). On observe chez les rats Wistar une augmentation plus importante du poids du tissu adipeux blanc rétro-péritonéal ramené au poids des rats, en comparaison avec celle observée chez les rats Lou/C (Figure 24).

Le poids du **tissu adipeux brun interscapulaire** des rats Lou/C présente des différence moins marquées avec celui des rats Wistar. Par rapport aux rats Wistar, les rats Lou/C ont un poids de tissu adipeux brun interscapulaire plus petit à 2 et 24 mois alors qu'à 6 mois on n'observe aucune différence.

Si on exprime les poids des différents organes en les rapportant aux poids des animaux, chez les rats Lou/C, seuls les tissus adipeux blancs ont un poids inférieur à ceux des rats Wistar à 2 et 6 et 24 mois (Figure 25).



**Figure 24. Evolution du poids de tissu adipeux blanc rétro-péritonéal des rats Lou/C et des rats Wistar en fonction du poids corporel à 2, 6 et 24 mois.**



**Figure 25. Pourcentage de variation de la masse des différents organes ramenée par 100 g de poids des rats Lou/C par rapport aux rats Wistar. BAT : tissu adipeux brun, rWAT : tissu adipeux blanc rétro-péritonéal, eWAT : tissu adipeux blanc épидidymal.**

		Poids des rats (g)	Cœur (g)	Cerveau (g)	Foie (g)	Tissu adipeux brun (g)	Tissu adipeux blanc rétropéritonéal (g)	Tissu adipeux blanc épидидymal (g)
2 mois	Wistar	230±5,4	0,756±0,022	1,77±0,07	9,71±0,33	0,523±0,019	2,425±0,159	
	Lou/C	145±4,2*	0,487±0,032*	1,66±0,02	8,50±0,28*	0,366±0,031*	0,442±0,019*	
	Différence	-37%	-36%	-6%	-13%	-30%	-82%	
6 mois	Wistar	422±16,4	1,002±0,042	2,17±0,03	11,81±0,48	0,376±0,044	8,123±0,662	11,12±0,93
	Lou/C	270±5,2*	0,782±0,040*	1,78±0,02*	8,28±0,25*	0,307±0,023	1,877±0,190*	3,48±0,12*
	Différence	-36%	-22%	-18%	-30%	-18%	-77%	-69
24 mois	Wistar	622±18,1	1,243±0,049	2,15±0,04	17,09±1,37	0,992±0,102	17,054±2,237	19,72±2,03
	Lou/C	333±10,7*	0,965±0,01*	1,91±0,02*	11,49±0,6*	0,455±0,061*	2,523±0,465*	4,26±0,22*
	Différence	-46%	-22%	-12%	-33%	-54%	-85%	-78%

**Tableau 4. Evolution du poids des organes des rats Wistar et des rats Lou/C à 2, 6 et 24 mois.**

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).

### I. 3. Marqueur d'adiposité : index de Lee (tableau 5)

L'index de Lee nous permet d'obtenir un index d'adiposité complémentaire des poids de tissus adipeux blancs (racine cubique du poids de l'animal divisée par sa longueur naso-anale). Il a été mesuré sur des rats âgés de 6, 12, 24 et 31 mois. La valeur de l'index de Lee est la plus élevée à l'âge de 12 mois chez les deux souches, on observe ensuite une diminution de -5% ( $p < 0,05$ ) chez les rats Wistar et de -13% ( $p < 0,01$ ) chez les rats Lou/C à l'âge de 24 mois par rapport à la valeur mesurée à 12 mois. A tous les âges les rats Lou/C présentent un index d'adiposité inférieur à celui des rats Wistar (-5%, -7%, -6% et -14% à 6, 12, 18 et 24 mois,  $p < 0,01$ , respectivement).

**Les rats Lou/C présentent à tous les âges un poids plus faible que les rats Wistar. Ce poids plus faible est notamment dû à une réduction marquée de la masse de tissus adipeux blancs. Cette adiposité plus faible est confirmée par un index de Lee plus faible chez les rats Lou/C.**

Age	6 mois		12 mois		24 mois		31 mois	
souche	Wistar n = 7	Lou/C n = 8	Wistar n = 7	Lou/C n = 8	Wistar n = 4	Lou/C n = 5	Wistar n = 3	Lou/C n = 4
Poids des rats	522,3 ± 12,4	256,0 ± 4,4 *	540,8 ± 21,1	312,8 ± 8,6 *	634,7 ± 3,1	324,5 ± 7,6 *	542,0 ± 50,7	308,5 ± 10,1 *
Longueur naso-anal (cm)	26,7 ± 0,2	22,1 ± 0,5 *	26,1 ± 4,4	23,3 ± 3,5	27,8 ± 0,1	23,6 ± 0,1 *	27,5 ± 0,2	22,8 ± 0,2 *
Index de Lee	0,302 ± 0,001	0,288 ± 0,006 *	0,313 ± 0,005	0,292 ± 0,003 *	0,309 ± 0,003	0,291 ± 0,003 *	0,296 ± 0,004	0,254 ± 0,003 *

**Tableau 5. Evolution au cours du vieillissement des valeurs servant au calcul de l'index de Lee, un indicateur d'adiposité.**

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ )

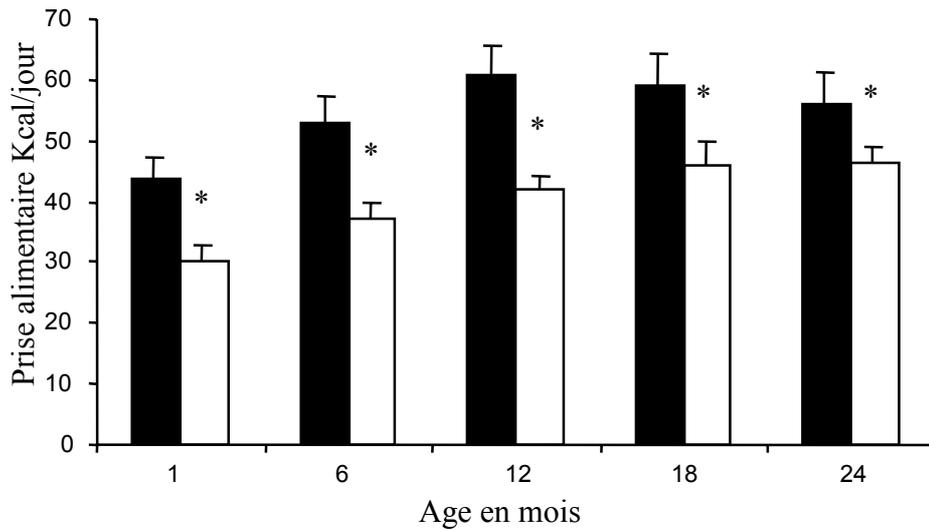
## II. ETUDE DE LA BALANCE ENERGETIQUE AU COURS DU VIEILLISSEMENT CHEZ LE RAT LOU/C ET LE RAT WISTAR

### II. 1. Prise alimentaire (Figure 26)

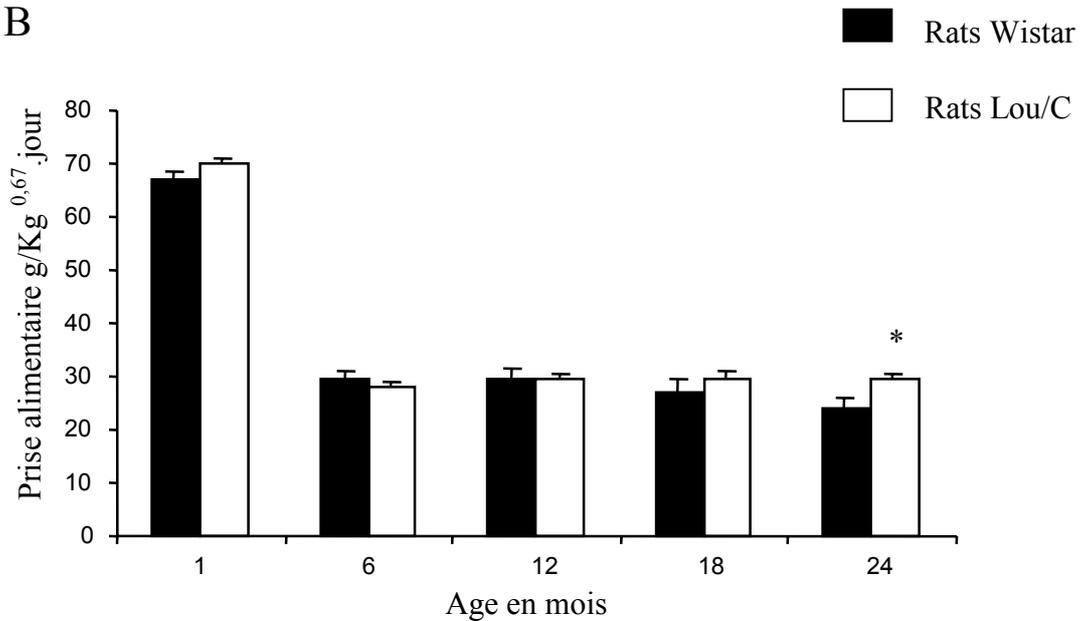
Au cours du vieillissement, les rats Wistar présentent une augmentation de la prise alimentaire entre 1 et 12 mois (+39%,  $p < 0,05$ ) (Figure 26 A). L'évolution de la prise alimentaire des rats Lou/C présente le même profil que celle des rats Wistar avec une augmentation de la prise alimentaire de +39% ( $p < 0,05$ ) entre 1 et 12 mois, mais à tous les âges étudiés elle demeure inférieure à celle des rats Wistar. Cette différence de prise alimentaire entre les rats Lou/C et les rats Wistar est constante jusqu'à 12 mois (respectivement, -31%, -29% et -31% à 1, 6 et 12 mois,  $p < 0,05$ ) puis cette différence a tendance à s'atténuer au cours du vieillissement (respectivement, -22% et -17% à 18 et 24 mois,  $p < 0,05$ ).

Si on rapporte les valeurs de prise alimentaire à la masse métabolique estimée à partir du poids corporel élevé à la puissance 0,67, on observe chez les deux souches de rats une forte diminution de la prise alimentaire entre 1 et 6 mois (-56% pour les rats Wistar, et -59% pour les rats Lou/C,  $p < 0,05$ ) (Figure 26 B). Ensuite, les rats Wistar présentent une diminution progressive de leur prise alimentaire qui se traduit par une différence de -19% ( $p < 0,05$ ) entre la prise alimentaire à 6 mois et celle à 24 mois. Par contre, la prise alimentaire des rats Lou/C est constante au cours du vieillissement. Nous n'observons pas de différence de prise alimentaire rapportée à la masse métabolique (poids du rat élevé à la puissance 0,67) entre les deux souches, excepté à 24 mois où elle est plus importante chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar (+23%,  $p < 0,05$ ).

A



B

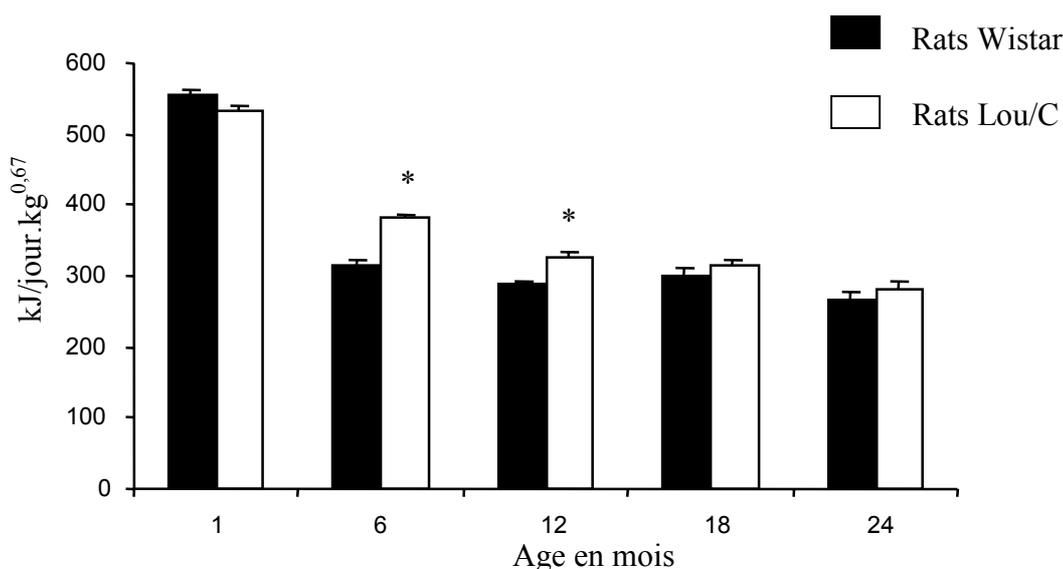


**Figure 26. Prise alimentaire des rats Wistar et des rats Lou/C à 1, 6, 12, 18 et 24 mois.**

Les résultats sont exprimés en Kcal/jour (A) ou en  $g/kg^{0,67}$ .jour (B). \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).

## II. 2. Dépense énergétique (Figure 27)

La dépense énergétique a été évaluée par calorimétrie indirecte chez des rats âgés de 1, 6, 12, 18 et 24 mois. Les valeurs de dépense énergétique sont rapportées à la masse métabolique estimée (poids du rat élevé à la puissance 0,67). On observe chez les rats Wistar entre 1 et 6 mois une forte diminution de la dépense énergétique (-43%,  $p < 0,01$ ) alors que chez les rats Lou/C cette diminution est plus progressive (-28% entre 1 et 6 mois,  $p < 0,01$ , et -14% entre 6 et 12 mois,  $p < 0,05$ ). Ceci se traduit par une dépense énergétique supérieure chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar à 6 et 12 mois (respectivement, +21% et +14%,  $p < 0,05$ ). Entre 6 et 24 mois la dépense énergétique des rats Wistar est constante ainsi que celle des rats Lou/C entre 12 et 24 mois.



**Figure 27. Dépense énergétique moyenne journalière des rats Wistar et des rats Lou/C à 1, 6, 12, 18 et 24 mois.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).

### II. 3. Température des rats

La température rectale des rats a été évalué à 6, 24 et 31 mois à l'aide d'un thermocouple. Nous n'avons pas observé de différence de température interne entre les deux souches de rats. En effet les températures obtenues étaient  $36,95 \pm 0,12$  °C pour les rats Wistar et de  $37,35 \pm 0,03$  °C pour les rats Lou/C à 6 mois,  $37,03 \pm 0,04$  °C pour les rats Wistar et  $36,94 \pm 0,04$  °C pour les rats Lou/c à 24 mois et  $37,17 \pm 0,20$  °C pour les rats Wistar et  $37,15 \pm 0,16$  pour les rats Lou/C à 31 mois.

### II. 4. Activité locomotrice spontanée des rats Wistar et Lou/C à 6 mois (Figure 28)

L'activité locomotrice spontanée des animaux est mesurée à l'aide d'un actimètre qui nous permet d'analyser les mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage, les va-et-vient ainsi que les redressements des rats pendant un nyctémère.

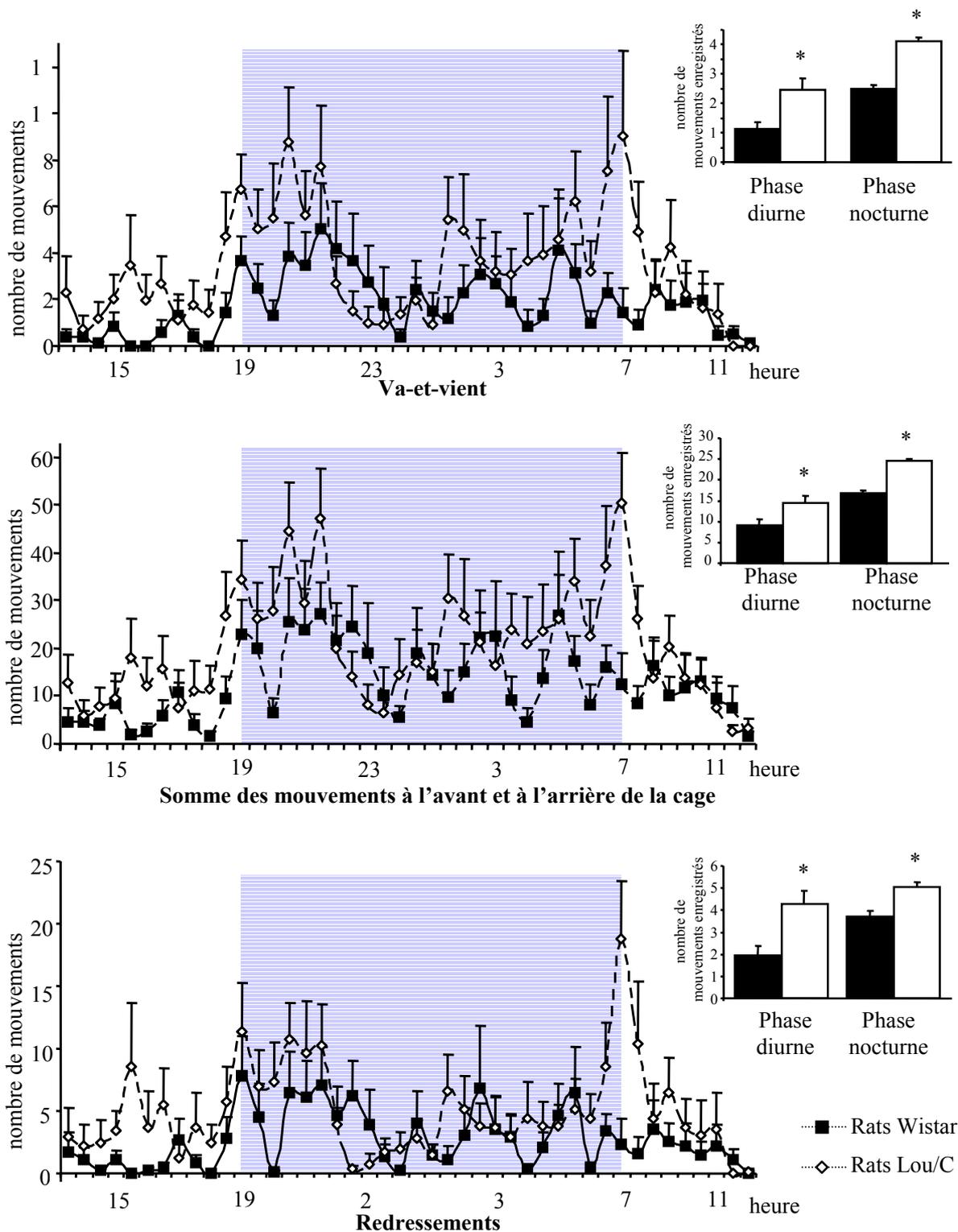
Les deux souches de rats présentent une augmentation de leur activité locomotrice durant la phase nocturne par rapport à la phase diurne. Le nombre de va-et-vient des rats Wistar est augmenté de 200% ( $p < 0,0001$ ) entre la phase diurne et la phase nocturne, celui des mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage est augmenté de 127% ( $p < 0,0001$ ) et le nombre de redressements s'accroît de 162% ( $p < 0,0001$ ). Pour les rats Lou/C, on retrouve également cette augmentation de l'activité locomotrice entre la période diurne et nocturne mais dans une moindre mesure (+60%,  $p < 0,01$  pour les va-et-vient; +69%,  $p < 0,0001$  pour les mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage et +10%, NS, pour les redressements).

L'ANOVA générale montre, pour les trois types de mouvements enregistrés, un effet lié à la souche ( $F_{1,14} = 38,4$ ,  $p < 0,0001$  pour les va-et-vient;  $F_{1,14} = 12,1$ ,  $p < 0,01$  pour les redressements,  $F_{1,14} = 34,5$ ,  $p < 0,0001$  pour les mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage) ainsi qu'une interaction entre l'effet lié au décours temporel et l'effet lié à la souche ( $F_{43,602} = 6,0$ ,  $p < 0,0001$  pour les va-et-vient;  $F_{43,602} = 2,3$ ,  $P < 0,0001$  pour les redressements ;  $F_{43,602} = 2,2$ ,  $p < 0,0001$  pour les mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage). Sur l'ensemble de la période de mesure, on observe que les rats Lou/C présentent une activité locomotrice spontanée supérieure à celle des rats Wistar (+96%,  $p < 0,0001$  pour les va-et-vient, +82%,  $p < 0,0001$  pour les redressements et +59%,  $p < 0,0001$  pour les mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage). Si on analyse les données en fonction des phases nocturnes ou diurnes, on observe les mêmes résultats. Ainsi, durant la phase diurne, les rats Lou/C présentent 3 fois plus de va-et-vient ( $p < 0,0001$ ), 3 fois plus de redressements ( $p < 0,0001$ ) et 2 fois plus de

mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage ( $p < 0,0001$ ) que les rats Wistars. Durant la phase nocturne, on observe 64% ( $p < 0,0001$ ) de va-et-vient, 36% ( $p < 0,01$ ) de redressements et 45% ( $p < 0,0001$ ) de mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage en plus chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar.

**Les rats Lou/C présentent une prise alimentaire rapportée à la masse métabolique, identique à celle des rats Wistar à tous les âges sauf à 24 mois où elle est supérieure.**

**La dépense énergétique des rats Lou/C n'est supérieure à celle des rats Wistar qu'à 6 et 12 mois et leur température corporelle n'est pas différente. Les rats Lou/C présentent une activité locomotrice spontanée supérieure à celle des rats Wistar.**



**Figure 28. Enregistrement des mouvements pendant 24 h des rats Wistar et des rats Lou/C. En gris la période nocturne.**

Les résultats sont exprimés en somme des mouvements + SEM par tranche de 30 min. Les histogrammes à droite des graphiques représentent la moyenne des mouvements sur une tranche de 30 min durant la phase diurne ou la phase nocturne. \* représente une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $n = 8$  dans chaque groupe).

## II. 5. Activité cytochrome oxydase au niveau tissulaire (Tableau 6)

Tout d'abord, on constate chez les deux souches une activité cytochrome oxydase beaucoup plus faible dans le tissu adipeux blanc que dans le foie et dans le tissu adipeux brun. Les rats Lou/C présentent une activité cytochrome oxydase plus importante (+80%,  $p < 0,05$ ) dans le tissu adipeux blanc rétropéritonéal par rapport aux rats Wistar à 6 mois alors que dans le foie et le tissu adipeux brun aucune différence n'est observée entre les deux souches.

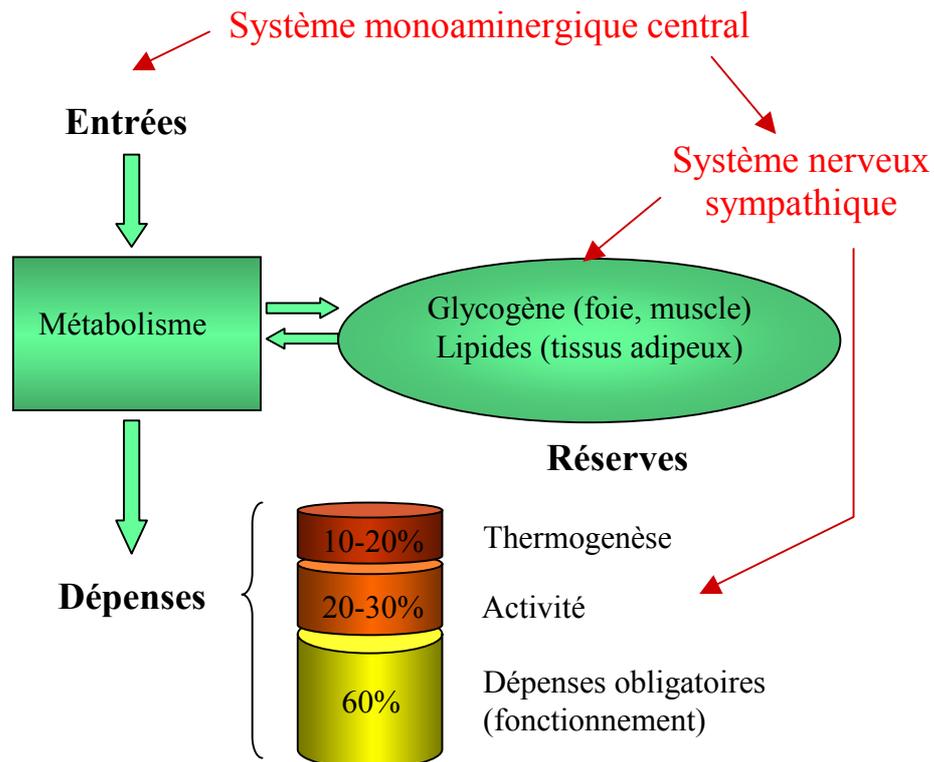
	Foie	Tissu adipeux blanc rétropéritonéal	Tissu adipeux brun
Rats Wistar n = 5	21718 ± 3325	201 ± 38	11173 ± 980
Rats Lou/C n = 6	22955 ± 2606	362 ± 60 *	13914 ± 2373

**Tableau 6. Activité cytochrome oxydase dans le foie, le tissu adipeux blanc rétropéritonéal et dans le tissu adipeux brun chez des rats Wistar et Lou/C âgés de 6 mois.**

Les résultats sont exprimés en nanoatome d'oxygène par minute et par g de tissu. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).

### III. ACTIVITE CATECHOLAMINERGIQUE PERIPHERIQUE CHEZ LES RATS LOU/C ET LES RATS WISTAR

Le système nerveux sympathique intervient dans le contrôle de la balance énergétique grâce à l'innervation noradrénergique des principaux organes impliqués dans la mise en réserve des substrats énergétiques et grâce à la stimulation de la dépense énergétique notamment de via thermogenèse.



#### Intervention du système monoaminergique central et du système nerveux sympathique sur la régulation de la balance énergétique.

Au niveau périphérique, l'activité catécholaminergique est évaluée par mesure de l'accumulation de L-DOPA après blocage pharmacologique de la L-aromatic acid decarboxylase avec du NSD-1015 pendant 20 minutes. Ceci nous permet d'évaluer l'activité de la tyrosine hydroxylase, l'enzyme limitante de la synthèse des catécholamines. Par ailleurs, on détermine le contenu en noradrénaline dans les organes périphériques.

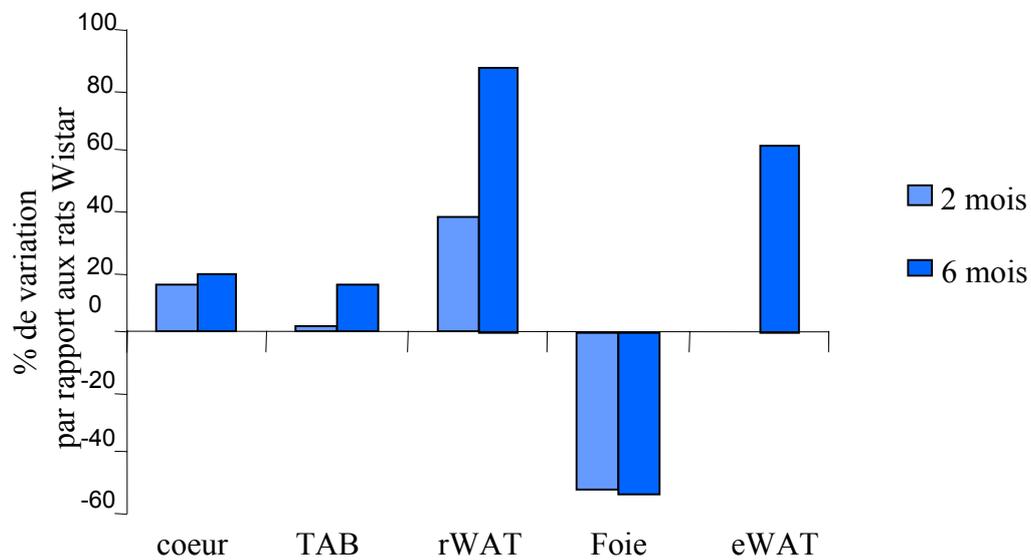
### III. 1. Activité catécholaminergique et contenu en noradrénaline dans les organes périphériques (Tableaux 7 et 8, Figure 29)

Spécifiquement **dans les tissus adipeux blancs**, l'activité catécholaminergique ainsi que le contenu en noradrénaline sont fortement augmentés chez les rats Lou/C comparés aux rats Wistar.

Ainsi dans **le tissu adipeux blanc rétropéritonéal**, les rats Lou/C présentent une activité catécholaminergique supérieure de 38% ( $p < 0,05$ ) et 87% ( $p < 0,01$ ) à celle des rats Wistar respectivement à 2 et 6 mois et un contenu en noradrénaline supérieur de 85% ( $p < 0,01$ ) à 6 mois. Dans **le tissu adipeux blanc épидидymal** on retrouve les mêmes différences avec une activité catécholaminergique de 62% ( $p < 0,01$ ) supérieure chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar à 6 mois. Le contenu en noradrénaline est de 57% ( $p < 0,01$ ) supérieur à 6 mois. L'activité de la tyrosine hydroxylase dans le tissu adipeux brun des rats Lou/C n'est supérieure à celle des rats Wistar qu'à l'âge de 6 mois (+54%,  $p < 0,01$ ).

Par contre dans **le foie**, on observe chez les rats Lou/C une activité catécholaminergique plus faible que chez les rats Wistar (-50% et -54%,  $p < 0,01$ , respectivement à 2 et 6 mois).

Aucune différence d'activité catécholaminergique dans le **cœur** n'est observée entre les rats Lou/C et les rats Wistar à 2 et 6 mois, mais les rats Lou/C présentent une plus forte quantité de noradrénaline dans le cœur que les rats Wistar à 6 mois (+33%,  $p < 0,01$ ).



**Figure 29. Variation de l'activité catécholaminergique dans les tissus périphériques des rats Lou/C par rapport aux rats Wistar.**  
 BAT : tissu adipeux brun, rWAT : tissu adipeux blanc rétro-péritonéal, eWAT : tissu adipeux blanc épидidymal.

	Coeur		Foie		Tissu adipeux brun		Tissu adipeux blanc rétropéritonéal		Tissu adipeux blanc épидидymal	
	2 mois n = 9	6 mois n = 10	2 mois n = 10	6 mois n = 10	2 mois n = 10	6 mois n = 10	2 mois n = 10	6 mois n = 10	2 mois n = 10	6 mois n = 10
Rats Wistar	185,02 ± 11,07	81,96 ± 9,79	287,39 ± 38,54	211,5 ± 11,9	156,84 ± 42,12	124,3 ± 17,9	97,87 ± 13,96	12,42 ± 1,12	nd	27,22 ± 4,27
Rats Lou/C	213,22 ± 12,40	96,94 ± 8,96	144,84 ± 7,57 *	98,0 ± 10,1 *	161,08 ± 12,26	191,1 ± 11,3 *	135,21 ± 6,37 *	23,28 ± 2,13 *	nd	44,09 ± 3,69 *

**Tableau 7. Mesure de l'activité *in vivo* de la tyrosine hydroxylase dans le cœur, le foie, le tissu adipeux brun, le tissu adipeux blanc rétropéritonéal et épидидymal des rats Wistar et des rats Lou/C âgés de 2 et 6 mois : accumulation de L-DOPA 20 minutes après blocage pharmacologique de la L-aromatic acid decarboxylase par le NSD-1015. Les résultats sont exprimés en pmol de L-DOPA accumulée par gramme de tissus et pour 20 minutes.**

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).

	Coeur	Foie	Tissu adipeux brun	Tissu adipeux blanc rétropéritonéal	Tissu adipeux blanc épидидymal
Rats Wistar	6144 ± 336	708.6 ± 77.2	3092 ± 394	85.7 ± 7.2	278.9 ± 50.9
Rats Lou/C	8163 ± 311 *	550.2 ± 48.0	4560 ± 326 *	158.7 ± 10.2 *	437.6 ± 51.7 *

**Tableau 8. Contenu en noradrénaline dans le cœur, le foie, le tissu adipeux brun, les tissus adipeux blancs rétropéritonéal et épидидymal des rats Wistar et des rats Lou/C âgés de 6 mois. Les résultats sont exprimés en pmol de noradrénaline par gramme de tissus.**

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM avec n = 8 dans chaque groupe. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).

### III. 2. Contenu en catécholamines de la glande surrénale (Tableau 9)

Le poids des glandes surrénales des rats Lou/C est inférieur à celui des rats Wistar à 6 mois (-33%,  $p < 0,01$ ). Corrélativement, on observe une diminution de la quantité de catécholamines dans les glandes surrénales des rats Lou/C en comparaison avec celles des rats Wistar. Ainsi il y a -24% ( $p < 0,05$ ) de dopamine, -68% ( $p < 0,01$ ) de noradrénaline et -50% d'adrénaline dans les glandes surrénales des rats Lou/C par rapport aux rats Wistar.

	Poids (mg)	Contenu en dopamine (pmol)	Contenu en noradrénaline (pmol)	Contenu en adrénaline (pmol)
Rats Wistar n = 8	25.6 ± 1.8	578 ± 41	38330 ± 2827	161041 ± 4194
Rats Lou/C n = 8	17.2 ± 1.2 *	437 ± 29 *	12312 ± 1068 *	97421 ± 4679 *

**Tableau 9. Poids de la glande surrénale et contenu en dopamine, noradrénaline et adrénaline chez des rats Wistar et des rats Lou/C âgés de 6 mois.**

\* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).

**Par rapport aux rats Wistar, les rats Lou/C présentent une activité catécholaminergique augmentée spécifiquement dans les tissus adipeux. Le contenu en catecholamines de leur glande surrénale est diminué par rapport aux rats Wistar.**

#### **IV. PROFIL MONOAMINERGIQUE DES STRUCTURES CENTRALES IMPLIQUÉES DANS LA REGULATION DE LA PRISE ALIMENTAIRE ET DE LA DÉPENSE ÉNERGÉTIQUE.**

Les catécholamines centrales et dans une moindre mesure la sérotonine contrôlent le système nerveux sympathique notamment par leurs actions au niveau des noyaux hypothalamiques. De plus ces monoamines jouent un rôle prépondérant dans le contrôle de la prise alimentaire. L'évaluation du profil monoaminergique central des rats Lou/C en comparaison aux rats Wistar va nous permettre de déterminer l'origine des modifications de l'activité sympathique observées chez les rats Lou/C et de déterminer le rôle des monoamines centrales dans la balance énergétique particulière du rat Lou/C.

Au niveau des structures centrales on mesure l'activité sérotoninergique et l'activité catécholaminergique après blocage pharmacologique de la L-aromatic acid decarboxylase avec du NSD-1015 pendant 20 minutes. Cette mesure nous permet de déterminer l'activité de la tryptophane hydroxylase, et de la tyrosine hydroxylase qui sont les enzymes limitantes respectivement de la synthèse de la sérotonine et des catécholamines. On mesurera également les contenus en noradrénaline, en sérotonine et en acide 5-hydroxyindolamine qui est un produit du métabolisme de la sérotonine. Les structures centrales sont prélevées par la technique de punching et les quantifications s'effectuent par HPLC-ED.

##### **IV. 1. Comparaison des contenus en monoamines et des activités des enzymes entre les différentes structures du système nerveux central**

Les résultats présentés dans les figures 30 et 31 sont les valeurs de contenu en monoamines, d'accumulation de L-DOPA ou d'accumulation de 5-HTP rapportées au poids des punches, ce qui permet de comparer l'activité catécholaminergique ou sérotoninergique des différentes structures entre elles. On note ainsi que le locus coeruleus, qui est le groupe cellulaire noradrénergique le plus important du système nerveux central, présente l'activité tyrosine hydroxylase *in vivo* la plus élevée aussi bien chez les rats Lou/C que chez les rats Wistar. De même, les raphés dorsalis et médian qui sont les deux principales structures sérotoninergiques centrales, présentent la plus grande activité tryptophane hydroxylase chez les deux souches de rats.

#### **IV. 2. Profil catécholaminergique central des deux souches (Tableau 10)**

On observe à 2 mois une accumulation de L-DOPA dans les groupes A1C1, A2C2 caudal et A5 plus faible chez les rats Lou/C que chez les rats Wistar (-34%, -38% et -31%,  $p < 0,01$ , respectivement). L'activité de la tyrosine hydroxylase reste plus faible à 6 mois dans le groupe A2C2 chez les rats Lou/C (-26%,  $p < 0,05$ ) par contre l'activité tyrosine hydroxylase est augmentée dans le raphé médian (+67%,  $p < 0,01$ ) et dans le noyau hypothalamique paraventriculaire (+19%,  $p < 0,05$ ). Par rapport aux rats Wistar, les rats Lou/C ont un contenu en noradrénaline plus faible dans A2C2, A6 et dans le noyau hypothalamique ventromédian (respectivement, -32%, -20% et -34%,  $p < 0,05$ ).

#### **IV. 3. Profil sérotoninergique central des deux souches (Tableau 11)**

Concernant le profil sérotoninergique, on observe globalement une diminution de l'activité de la 5-hydroxytryptophane chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar. Ainsi à 2 mois les rats Lou/C présentent une accumulation en 5-HTP inférieure à celle des rats Wistar dans les noyaux A1C1, A2C2 rostral et A5 (-23% , -26% et -38%,  $p < 0,01$ , respectivement), dans le raphe médian (-26%,  $p < 0,05$ ) et dans le noyau hypothalamique ventromédian (-22%,  $p < 0,05$ ). A 6 mois, on retrouve une diminution de cette accumulation chez les rats Lou/C dans les noyaux A5 et A6 (-54%,  $p < 0,01$  et -24%,  $p < 0,05$ , respectivement). Entre les deux souches, aucune différence concernant le contenu en sérotonine des structures centrales a été observée à 6 mois excepté une augmentation dans le raphe médian des rats Lou/C (+34%,  $p < 0,01$ ). Le ratio 5-HIAA/sérotonine, index du métabolisme sérotoninergique, est légèrement diminué chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar dans le noyau A6 (-10%,  $p < 0,05$ ) et dans les raphés dorsalis et médian (-8% et -18%,  $p < 0,05$ , respectivement).

**L'activité *in vivo* de la tyrosine hydroxylase ainsi que les contenus en noradrénaline sont diminués dans les groupes cellulaires catécholaminergiques ainsi que dans l'hypothalamus ventromédian des rats Lou/C par rapport aux rats Wistar. Le profil sérotoninergique central des rats Lou/C semble être peu différent de celui des rats Wistar.**

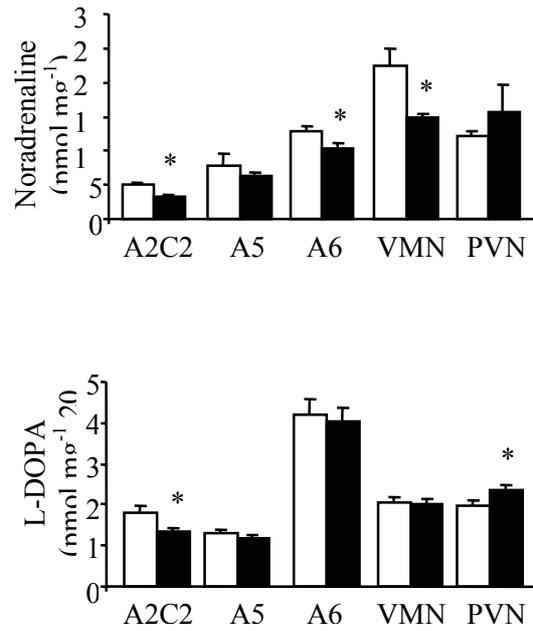
		Accumulation de L-DOPA pmol.20 min <sup>-1</sup>		Contenu en noradrénaline pmol
		2 mois	6 mois	6 mois
A1C1	Rats Wistar	10,76 ± 0,76	nd	nd
	Rats Lou/C	7,14 ± 0,61 *	nd	nd
A2 caudal	Rats Wistar	9,98 ± 0,83	8,11 ± 0,76	22,23 ± 1,93
	Rats Lou/C	6,17 ± 0,31 *	6,03 ± 0,35 *	15,05 ± 1,38 *
A2 rostral	Rats Wistar	4,10 ± 0,45	A 6 mois la partie caudale et la partie rostrale du noyau A2C2 n'ont pas été différenciées	
	Rats Lou/C	3,36 ± 0,26		
A5	Rats Wistar	3,27 ± 0,27	2,94 ± 0,20	17,55 ± 3,99
	Rats Lou/C	2,25 ± 0,20 *	2,69 ± 0,21	14,33 ± 1,01
A6	Rats Wistar	23,94 ± 2,25	12,58 ± 1,17	38,52 ± 2,34
	Rats Lou/C	19,26 ± 1,96	12,12 ± 1,01	30,83 ± 2,66 *
Raphe median	Rats Wistar	3,74 ± 0,61	2,43 ± 0,51	5,72 ± 0,28
	Rats Lou/C	6,56 ± 1,53	4,06 ± 0,91 *	6,54 ± 0,25
Raphe dorsalis	Rats Wistar	4,57 ± 0,45	4,67 ± 0,41	24,69 ± 2,10
	Rats Lou/C	3,67 ± 0,20	4,77 ± 0,20	22,92 ± 1,06
Noyau hypothalamique ventromedian	Rats Wistar	4,89 ± 0,39	4,61 ± 0,35	50,59 ± 5,60
	Rats Lou/C	4,87 ± 0,84	4,56 ± 0,25	33,28 ± 1,69 *
Noyau hypothalamique paraventriculaire	Rats Wistar	nd	2,99 ± 0,20	18,31 ± 1,07
	Rats Lou/C	nd	3,55 ± 0,25 *	23,38 ± 6,26

**Tableau 10. Activité *in vivo* de la tyrosine hydroxylase (accumulation de L-DOPA 20 minutes après blocage pharmacologique de la L-aromatic acid decarboxylase par le NSD-1015) et contenu en noradrénaline dans les noyaux catécholaminergiques A1C1, A2C2, A5 et A6, dans les noyaux sérotoninergiques, raphe dorsalis et raphe median et dans le noyau hypothalamique ventromédian et paraventriculaire des rats Wistar et des rats Lou/C.**

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).

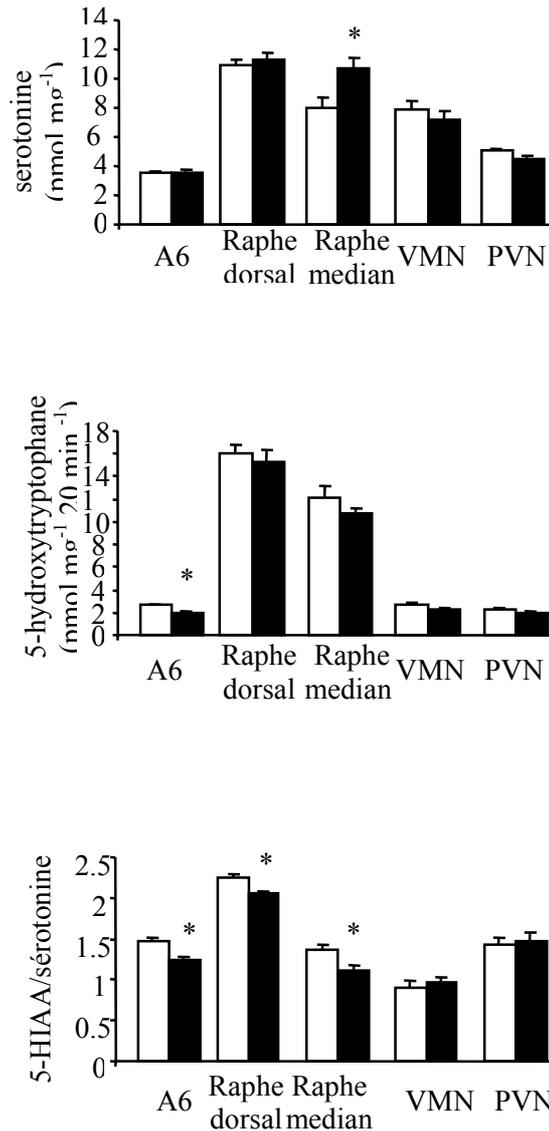
		Accumulation de 5-HTP pmol.20 min <sup>-1</sup>		Contenu en sérotonine pmol	Rapport 5-HIAA /sérotonine
		2 mois	6 mois	6 mois	6 mois
A1C1	Rats Wistar	4,79 ± 0,38	nd	nd	nd
	Rats Lou/C	3,68 ± 0,19 *	nd	nd	nd
A2C2 caudal	Rats Wistar	2,68 ± 0,18	9,85 ± 0,64	17,61 ± 1,14	1,28 ± 0,15
	Rats Lou/C	2,55 ± 0,15	7,174 ± 0,44	15,17 ± 1,71	1,03 ± 0,07
A2C2 rostral	Rats Wistar	5,09 ± 0,33	A 6 mois la partie caudale et la partie rostrale du noyau A2C2 n'ont pas été différenciées		
	Rats Lou/C	3,76 ± 0,19 *			
A5	Rats Wistar	2,72 ± 0,15	2,95 ± 0,67	5,7 ± 0,72	1,93 ± 0,12
	Rats Lou/C	1,70 ± 0,12 *	1,36 ± 0,67 *	7,04 ± 0,61	1,37 ± 0,04
A6	Rats Wistar	4,31 ± 0,30	7,99 ± 0,23	10,54 ± 0,39	1,47 ± 0,05
	Rats Lou/C	3,80 ± 0,25	6,04 ± 0,48 *	10,63 ± 0,69	1,23 ± 0,05 *
Raphe médian	Rats Wistar	6,55 ± 0,55	13,6 ± 1,28	9,03 ± 0,74	1,37 ± 0,05
	Rats Lou/C	4,86 ± 0,40 *	12,1 ± 0,52	12,10 ± 0,82 *	1,12 ± 0,05 *
Raphe dorsalis	Rats Wistar	12,26 ± 1,63	30,11 ± 1,36	20,49 ± 0,75	2,24 ± 0,06
	Rats Lou/C	9,27 ± 1,09	28,84 ± 2,00	21,25 ± 0,86	2,05 ± 0,04 *
Noyau hypothalamique ventromédian	Rats Wistar	2,16 ± 0,14	6,11 ± 0,32	17,89 ± 1,16	0,90 ± 0,08
	Rats Lou/C	1,68 ± 0,10 *	5,13 ± 0,36	16,25 ± 1,24	0,96 ± 0,06
Noyau hypothalamique paraventriculaire	Rats Wistar	nd	3,31 ± 0,42	7,59 ± 0,28	1,42 ± 0,09
	Rats Lou/C	nd	3,00 ± 0,20	6,79 ± 0,29	1,48 ± 0,1

**Tableau 11. Activité *in vivo* de la 5-hydroxy-tryptophane hydroxylase (Accumulation de 5-hydroxytryptamine (5-HTP) 20 minutes après blocage pharmacologique de la L-aromatic acid decarboxylase par le NSD-1015), contenu en sérotonine et rapport 5-hydroxyindolamine acide (5-HIAA)/sérotonine dans les noyaux catécholaminergiques A1C1, A2C2, A5 et A6, dans les noyaux sérotoninergiques, raphe dorsalis et raphe médian et dans les noyaux hypothalamiques ventromédian et paraventriculaire des rats Wistar et des rats Lou/C. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).**



**Figure 30.** Accumulation de L-DOPA 20 minutes après blocage pharmacologique de la L-aromatic acid decarboxylase par le NSD-1015 et contenu en noradrénaline dans les noyaux catécholaminergiques A1C1, A2C2, A5 et A6 et dans les noyaux hypothalamiques ventromédian (VMN) et paraventriculaire (PVN) des rats Wistar et des rats Lou/C âgés de 6 mois.

Les résultats sont exprimés par rapport au poids sec des punches. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0.05$ )

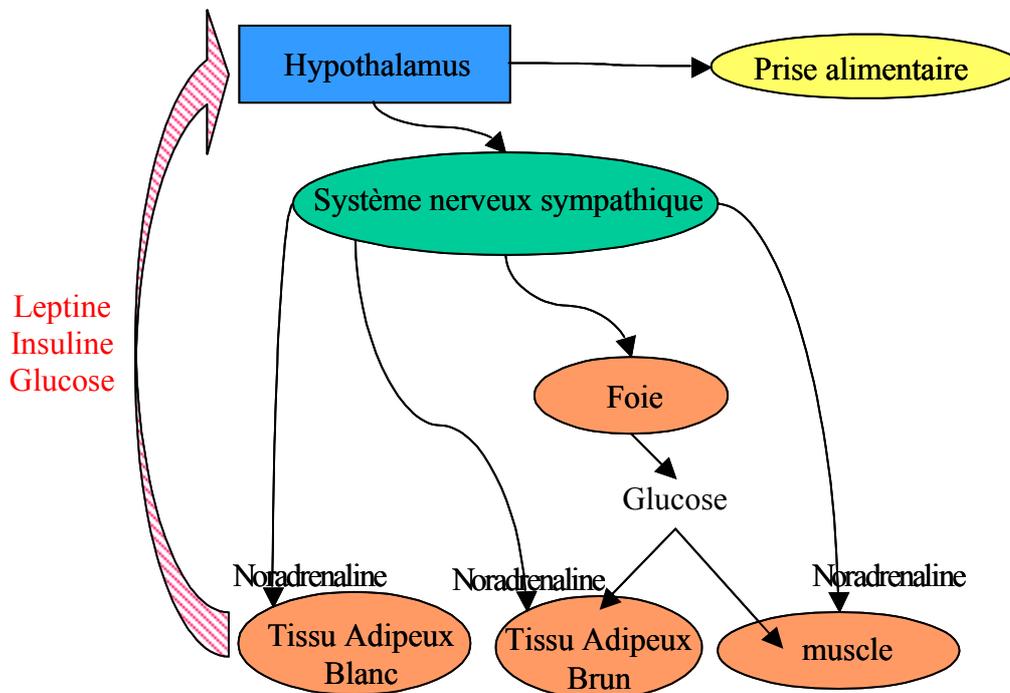


**Figure 31. Accumulation de 5-hydroxytryptophane 20 minutes après blocage pharmacologique de la L-aromatic acid decarboxylase par le NSD-1015, contenu en sérotonine et rapport 5-HIAA/sérotonine dans le noyau noradrénergique A6, dans les noyaux sérotoninergiques (raphe dorsal et médian) et dans les noyaux hypothalamiques ventromédian (VMN) et paraventriculaire (PVN) des rats Wistar et des rats Lou/C âgés de 6 mois.**

Les résultats sont exprimés par rapport au poids sec des punches. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $n < 0.05$ )

## V. CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'HORMONES IMPLIQUÉES DANS LE CONTRÔLE DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE CHEZ DES RATS LOU/C ET DES RATS WISTAR AU COURS DU VIEILLISSEMENT.

La leptine ainsi que l'insuline sont sécrétées en fonction de la quantité de tissu adipeux et vont informer les centres de l'état énergétique de l'organisme. Etant donné que le rat Lou/C ne développe pas d'obésité avec l'âge, il est intéressant de quantifier le taux d'insuline et de leptine circulantes afin de déterminer leurs rôles dans la balance énergétique particulière du rat Lou/C. On pourra également déterminer à l'aide de cette souche quelle est la part relative du vieillissement ou de l'obésité dans l'installation des résistances à l'insuline et la leptine qu'on observe chez des animaux âgés.

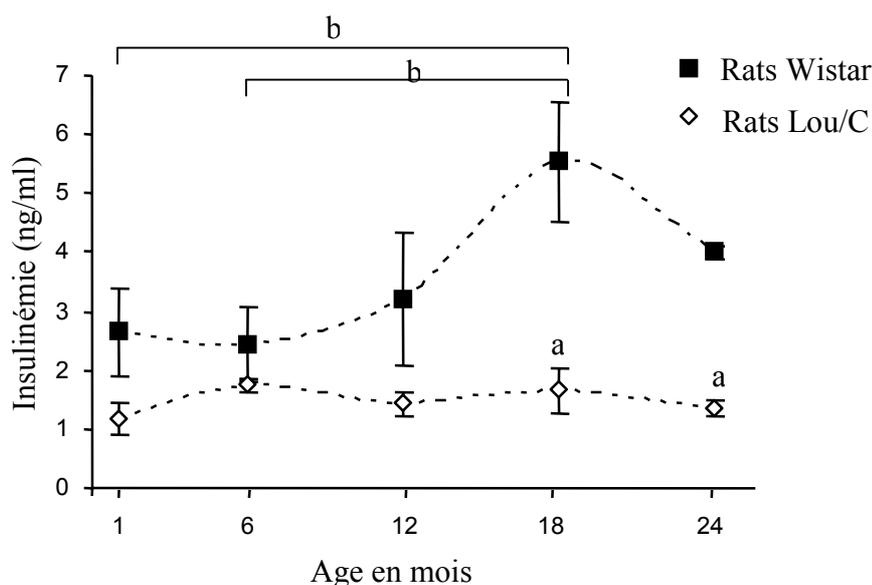


**Boucle de rétrocontrôle du métabolisme énergétique**  
(D'après Nonogaki 2000, Pénicaud et al. 2000, Rayner 2001)

Les concentrations d'insuline et de leptine plasmatiques ont été dosées à l'aide d'un kit radioimmunologique (Linco Research, Inc. St Charles, MO), après prélèvement de sang par la veine de la queue chez des rats âgés de 1, 6, 12, 18 et 24 mois. La glycémie est évaluée à l'aide d'un analyseur Beckman.

## V. 1. Insulinémie (Tableau 12, Figure 32)

Les rats Wistar présentent une insulinémie stable de 1 à 12 mois et ensuite, on observe une augmentation marquée de l'insulinémie entre 12 et 18 mois (+72%,  $p < 0,01$ ). A 24 mois, l'insulinémie a tendance à diminuer. Les rats Lou/C ne présentent aucune augmentation de l'insulinémie au cours du vieillissement. On observe ainsi une plus faible insulinémie à 18 et 24 mois (respectivement, -70% et -66%,  $p < 0,01$ ) chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar.

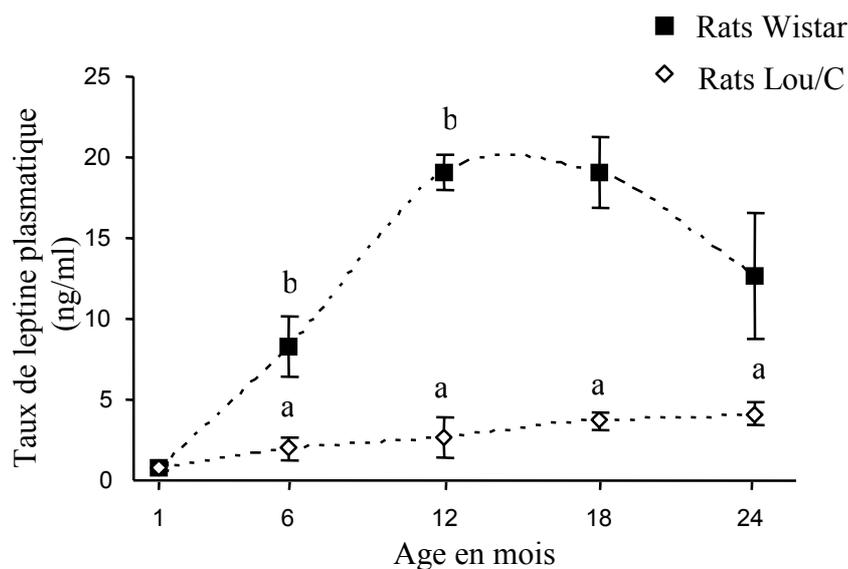


**Figure 32. Concentration plasmatique d'insuline chez les rats Wistar et les rats Lou/C à 1, 6, 12, 18 et 24 mois.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. a représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ). b représente une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre différents âges chez les rats Wistar (aucune variation significative de l'insulinémie n'étant observée au cours du vieillissement chez les rats Lou/C).

## V. 2. Concentration en leptine plasmatique (Tableau 12, Figure 33)

La concentration de leptine plasmatique des rats Lou/C augmente progressivement au cours du vieillissement (multipliée par 5 entre 1 et 24 mois) alors que celle des rats Wistar présente une augmentation soutenue jusqu'à 12 mois (multiplié par 22, entre 1 et 12 mois) et un plateau entre 12 et 18 mois suivi d'une diminution à 24 mois. La leptinémie des rats Lou/C est inférieure à celle des rats Wistar à partir de 6 mois (respectivement, -76%, -86%, -81% et -67%,  $p < 0,01$ , à 6, 12, 18 et 24 mois).

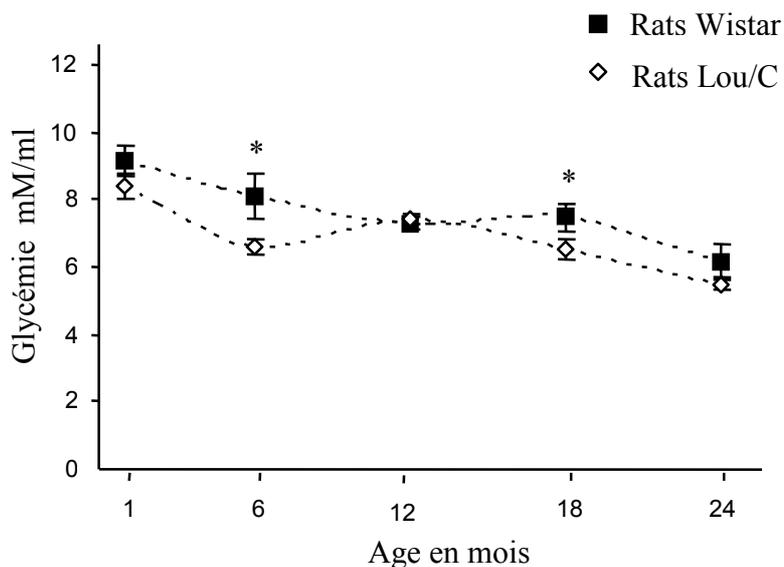


**Figure 33. Concentration plasmatique de leptine chez les rats Wistar et les rats Lou/C à 1, 6, 12, 18 et 24 mois.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. a représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ). b représente une différence significative entre deux âges successifs chez les rats Wistar ( $p < 0,05$ ). On observe chez le rat Lou/C une augmentation progressive de la concentration de leptine plasmatique avec une différence significative entre le premier et le 24<sup>ème</sup> mois.

### V. 3. Glycémie (Tableau 12, Figure 34)

Chez les 2 souches de rats, on observe une diminution significative de la glycémie au cours du vieillissement (-33% chez les rats Wistar entre 1 et 24 mois et -35 % chez les rats Lou/C,  $p < 0,05$ ). La glycémie des rats Lou/C est plus faible que chez les rats Wistar à 6 et 18 mois (respectivement -19% et -12%,  $p < 0,05$ ).



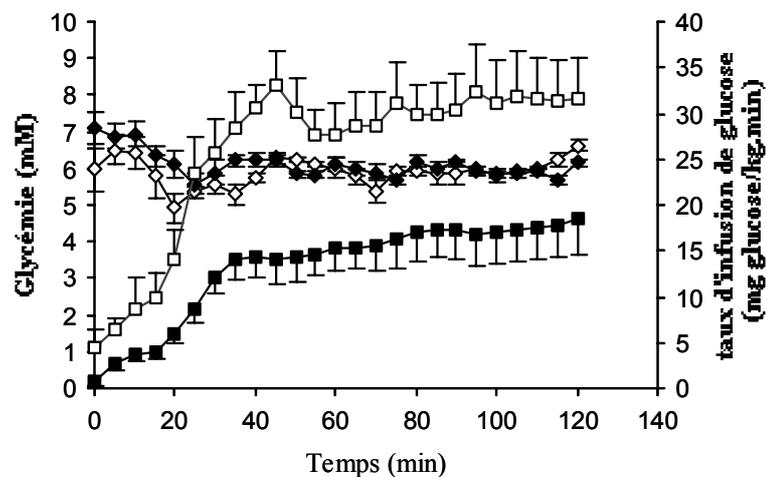
**Figure 34. Concentration plasmatique de glucose chez les rats Wistar et les rats Lou/C à 1, 6, 12, 18 et 24 mois.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C ( $p < 0,05$ ).

## VI. DETERMINATION DE LA SENSIBILITE PERIPHERIQUE A L'INSULINE DES RATS WISTAR ET LOU/C

La sensibilité périphérique à l'insuline des rats Lou/C et Wistar a été mesurée à 22 mois, à l'aide de la technique du clamp euglycémique-insulinique.

L'insulinémie basale était de  $1.68 \pm 0.452$  ng/ml pour les rats Wistar et de  $0.923 \pm 0.119$  ng/ml pour les rats Lou/C (-45%,  $p < 0.05$ ). La quantité de glucose injectée afin de maintenir une glycémie constante durant une perfusion de 6mU/kg.min d'insuline était de  $30.8 \pm 4.0$  mg/kg.min pour les rats Lou/C et de  $16.7 \pm 2.7$  mg/kg.min pour les rats Wistar ( $p < 0.05$ ) (Figure 35).



**Figure 35. Sensibilité périphérique à l'insuline mise en évidence par la technique de clamp euglycémique-insulinique sur des rats Wistar et Lou/C de 22 mois. On mesure la quantité de glucose nécessaire pour maintenir une glycémie constante chez des rats perfusés avec de l'insuline à un débit de 6 mU/Kg.min.**

La glycémie est représentée par des losanges noirs pour les rats Wistar et des losanges blancs pour les rats Lou/C. Le taux d'infusion de glucose est représenté par des carrés noirs pour les rats Wistar et par des carrés blancs pour les rats Lou/C. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\square$  SEM.

		Age en mois				
		1	6	12	18	24
Concentration plasmatique d'insuline ng/ml	Rats Wistar	2,64±0,76 n=9	2,44±0,63 n=4	3,21±1,15 n=8	5,53±1,02 n=6	4±0,10 n=3
	Rats Lou/C	1,18±0,26 n=8	1,75±0,12 n=7	1,42±0,19 n=10	1,65±0,38* n=7	1,36±0,12* n=5
		-59%	-28%	-56%	-70%	-66%
Concentration plasmatique de leptine ng/ml	Rats Wistar	0,85±0,18 n=10	8,24±1,91 n=6	19,09±1,10 n=10	19,06±2,15 n=8	12,70±3,92 n=3
	Rats Lou/C	0,76±0,18 n=10	1,97±0,71* n=9	2,71±1,27* n=10	3,71±0,57* n=8	4,13±0,70* n=5
		-11%	-76%	-86%	-81%	-67%
Glycémie mM/L	Rats Wistar	9,16±0,42 n=10	8,11±0,68 n=6	7,31±0,18 n=10	7,48±0,40 n=7	6,18±0,46 n=4
	Rats Lou/C	8,37±0,36 n=10	6,60±0,22* n=7	7,43±0,16 n=10	6,56±0,31* n=7	5,48±0,15 n=5
		-9%	-19%	2%	-12%	-11%

**Tableau 12. Evolution de la concentration plasmatique d'insuline, de leptine et de glucose chez les rats Wistar et les rats Lou/C à 1, 6, 12, 18 et 24 mois.**

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* représente une différence significative entre les rats Wistar et les rats Lou/C (p < 0,05).

**Les deux souches n'ont pas le même profil d'évolution de leurs hormones marqueurs de leur statut énergétique au cours du vieillissement :**

**Contrairement au rat Wistar qui présente un pic d'insulinémie, le rat Lou/C conserve une insulinémie stable et inférieure à celle du rat Wistar au cours du vieillissement. La concentration plasmatique de leptine chez le rat Wistar croit de manière marquée de 1 à 12 mois chez les rats Wistar alors que celle des rat Lou/C augmente plus progressivement et de manière moins marquée. La glycémie des deux souches diminue légèrement au cours du vieillissement et les rats Lou/C présentent une glycémie inférieure à celle des rats Wistar. Le non-développement d'une résistance périphérique à l'insuline est attesté par un taux d'infusion de glucose supérieur chez le rat Lou/C par rapport au rat Wistar.**

# DISCUSSION

Le rat Lou/C est une souche de rat présentée à la fois comme un modèle de vieillissement sain et de non-développement d'obésité.

Nos principaux objectifs, au cours de cette étude, étaient :

- 1) de caractériser la balance énergétique du rat Lou/C au cours du vieillissement.
- 2) de définir l'implication du système nerveux sympathique périphérique dans le métabolisme particulier de ce rat.
- 3) de déterminer l'évolution au cours du vieillissement de la concentration plasmatique d'insuline et de leptine, deux hormones informant les centres du statut énergétique de l'organisme chez le rat Lou/C.
- 4) d'évaluer le rôle dans le non-développement de l'obésité du rat Lou/C, des monoamines dans les structures centrales impliquées à la fois dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique.

Nous avons montré que le rat Lou/C présentait à tous les âges un poids inférieur au rat Wistar notamment à cause d'une adiposité plus faible (masse des tissus adipeux blancs et index de Lee). Une dépense énergétique supérieure à 6 et 12 mois chez le rat Lou/C ainsi qu'une plus faible prise alimentaire à tous les âges par rapport au rat Wistar pourraient être à l'origine de l'absence d'accumulation de réserve énergétique chez les rats Lou/C.

Les rats Lou/C présentent une activité sympathique augmentée spécifiquement dans les tissus adipeux blancs, impliqués dans la mise en réserve des lipides, et dans le tissu adipeux brun, impliqué dans la thermogénèse, alors que dans le foie, l'activité sympathique est diminuée.

Au cours du vieillissement, l'insulinémie des rats Wistar augmente fortement alors que celle des rats Lou/C reste constante. Ce non-développement d'une résistance à l'insuline est confirmé par un taux d'infusion de glucose plus faible chez le rat Lou/C par rapport au rat Wistar, lors d'un test euglycémique-hyperinsulinique. La leptinémie des rats Lou/C augmente au cours du vieillissement, mais de manière beaucoup moins marquée que la leptinémie des rats Wistar.

On observe une diminution du profil catécholaminergique central dans le noyau hypothalamique ventromédian ainsi que dans les noyaux catécholaminergiques A2C2 et A6. Le profil sérotoninergique central des rats Lou/C diffère peu par rapport à celui des rats Wistar.

## **I. LES RATS LOU/C RÉGULENT LEUR BALANCE ÉNERGÉTIQUE AU COURS DU VIEILLISSEMENT**

### **Vieillessement et dépense énergétique**

Les rats des deux souches présentent une diminution de leur dépense énergétique entre 1 et 6 mois. Cette diminution est en accord avec les résultats de Iossa et al (1999) qui observent une baisse de la dépense énergétique durant les deux premiers mois chez le rat. Par ailleurs, Iossa et al, montrent que cette diminution n'est pas due à une diminution du métabolisme basal et suggèrent qu'elle serait plutôt due à une diminution de l'effet thermique des aliments et/ou une diminution de l'activité locomotrice.

McCarter et Palmer (1992) montrent une diminution de la dépense énergétique exprimée en fonction de la masse métabolique entre 6 et 18 mois et une augmentation entre 18 et 24 mois chez le rat. Mais d'autres études montrent une baisse progressive du métabolisme basal chez le rat au cours du vieillissement (Even et al, 2001). Nous observons, chez les deux souches, une tendance à une diminution de la dépense énergétique entre 6 et 24 mois. Even et al (2001) attribuent cette baisse du métabolisme avec l'âge, à la fois à une diminution de la masse métabolique des animaux ainsi qu'à une diminution spécifique de l'activité métabolique des tissus.

### **Restriction alimentaire et vieillissement sain**

Entre 24 et 31 mois on observe une diminution du poids des rats Wistar. Le phénomène de sénescence est associé à une diminution de la masse des rats. Une diminution de la prise alimentaire dès 13 mois (Ichikawa et al, 1987, Blanton et al, 1998, Matsumoto et al, 2000) est en partie responsable de cette baisse de poids. Nous retrouvons cette diminution de prise alimentaire chez nos rats Wistar (-19% entre 6 et 24 mois, lorsque la prise alimentaire est exprimée en fonction de la masse métabolique). Les rats Lou/C conservent un poids et une prise alimentaire constante à partir de 6 mois et jusqu'à 31 mois. Des résultats récents montrent qu'une restriction alimentaire tout au long de la vie, limite l'apparition de la baisse de poids au moment de la sénescence chez le rat (Black et al, 2003).

Une restriction alimentaire à long terme engendre une diminution de la dépense énergétique (Gonzales-Pacheco et al, 1993). Les rats restreints caloriquement reçoivent en général de l'ordre de 60% de la prise alimentaire des rats nourris *ad libitum*. C'est le même type de restriction alimentaire qui est présentée spontanément par le rat Lou/C. Par contre nous n'observons pas de diminution de la dépense énergétique par masse métabolique chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar. Ces résultats seraient en accord avec de nombreuses études qui montrent que l'effet bénéfique dû à une restriction alimentaire ne serait pas lié à une diminution de la dépense énergétique. Ainsi, Duffy et al, (1989) McCarter et Palmer (1992) montrent qu'une restriction alimentaire de longue durée n'engendre pas de diminution de la dépense énergétique exprimée par masse métabolique. Cependant, Greenberg et Boozer (2000) remettent en cause les résultats de ces études en expliquant que les données ne sont pas rapportées à une bonne estimation de la masse métabolique.

### **Activité locomotrice et vieillissement sain**

A 6 mois, les rats Lou/C présentent une activité locomotrice spontanée supérieure à celle des rats Wistar. Ceci pourrait être à l'origine de la dépense énergétique supérieure observée chez le rat Lou/C.

L'activité physique augmente l'espérance de vie. Des rats placés en présence d'une roue d'activité durant toute leur vie, ont une longévité supérieure (Goodrick, 1980) ou une espérance de vie moyenne supérieure (Holloszy et al, 1985) à celle de rats sédentaires.

Chez le rat Lou/C, des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer la part relative de l'activité locomotrice et/ou de la restriction alimentaire dans l'augmentation de son espérance de vie. Des études de restriction alimentaire couplée à un exercice physique de longue durée chez le rat, ne montrent pas d'effet cumulatif des deux traitements concernant l'espérance de vie : les rat actifs restreints alimentaires ne présentent pas une longévité supérieure à celle des rat sédentaires restreints alimentaires, cependant ils vieillissent en « meilleure santé » (Ichikawa et al, 1999).

La restriction alimentaire, l'activité locomotrice ainsi que la dépense énergétique supérieure chez le rat Lou/C sont en partie responsables de son adiposité diminuée par rapport à celle du rat Wistar. En effet chez des rats âgés de 6, 12 et 24 mois, nous trouvons un index d'adiposité constant chez les rats Lou/C et la masse de tissu adipeux blanc rétro-péritonéal n'augmente pas de manière significative entre 6 et 24 mois. Nos résultats concernant

l'évolution de l'adiposité des rats Lou/C confirment ceux obtenus par Alliot et al. (2002) qui montrent que la masse de tissus adipeux reste constante entre 8 et 23 mois chez les rats Lou/C.

La capacité du rat Lou/C à maintenir sa balance énergétique constante au cours du vieillissement, conforte l'hypothèse d'Alliot et al. (2002) expliquant que le rat Lou/C est un modèle de vieillissement sain. Cette caractéristique pourrait expliquer son espérance de vie médiane (50% des rats survivants) supérieure de 20% à celle des rats Wistar.

## **II. LES RATS LOU/C PRÉSENTENT UNE ACTIVITÉ CATÉCHOLAMINERGIQUE AUGMENTÉE SPÉCIFIQUEMENT DANS LES TISSUS ADIPEUX ET DIMINUÉE DANS LE FOIE EN COMPARAISON AVEC LES RATS WISTAR**

### **Considérations méthodologiques**

Les différences de poids des tissus, plus particulièrement celles concernant les tissus adipeux blancs, entre les deux souches sont relativement importantes (de l'ordre de -70% pour les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar) ce qui rend délicates les comparaisons d'activité catécholaminergique dans les organes. Pour lever cette difficulté d'interprétation des données, nous avons choisi d'exprimer nos résultats en fonction du poids des tissus afin d'obtenir une estimation de leur densité d'innervation noradrénergique.

Peu d'études ont utilisé l'accumulation de L-DOPA consécutivement au blocage pharmacologique de la L-DOPA décarboxylase pour mesurer l'activité catécholaminergique dans les tissus périphériques. Cette approche a été utilisée récemment dans les tissus adipeux blancs dans notre laboratoire (Barret et al, 2002). L'accumulation de L-DOPA au niveau des structures catécholaminergiques centrales est linéaire au moins pendant 20 min (Lachuer et al, 1992) ; afin de limiter le nombre de rats sacrifiés, les mesures de l'accumulation de L-DOPA centrales et périphériques ont été effectuées sur les mêmes animaux. Nous n'avons pas mesuré la linéarité de l'accumulation de L-DOPA. En effet, des études précédentes ont montré que le turnover de la noradrénaline dans le tissu adipeux blanc (Garofalo et al, 1996) est plus lent que dans les structures centrales (Cransac et al, 1996). On considère qu'au niveau périphérique l'accumulation de L-DOPA consécutive à un blocage pharmacologique de la DOPA décarboxylase est plus lente qu'au niveau des structures centrales ; ainsi cette accumulation est au moins linéaire pendant 20 min.

La noradrénaline dans les tissus provient essentiellement des terminaisons sympathiques. En conditions basales, les concentrations plasmatiques d'adrénaline sont largement inférieures à la quantité de noradrénaline présente au niveau tissulaire. L'action de l'adrénaline est négligeable par rapport à celle liée à l'innervation sympathique (Kopin, 1989). Ainsi, les différences d'activité catécholaminergique et de contenu en noradrénaline au niveau tissulaire entre les rats Lou/C et Wistar sont susceptibles d'être directement à l'origine des différents effets métaboliques constatés.

Nous avons observé chez le rat Lou/C une activité catécholaminergique et un contenu en noradrénaline supérieurs (plus de 50%) dans les tissus adipeux blancs rétro-péritonéal et épидидymal et dans le tissu adipeux brun interscapulaire chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar. Par contre, dans le foie cette activité catécholaminergique est plus faible chez les Lou/C (environ -50%).

### **Activité sympathique dans les tissus adipeux blancs**

Tout d'abord il est intéressant de noter que le tissu adipeux blanc présente une activité catécholaminergique 4 à 5 fois inférieure à celle mesurée au niveau du tissu adipeux brun et ce, quelque soit la souche étudiée. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui montrent une innervation sympathique plus importante dans le tissu adipeux brun que dans le tissu adipeux blanc (Nnodim et Lever, 1988, Pénicaud et al, 2000).

L'innervation sympathique joue un rôle prépondérant dans le métabolisme du tissu adipeux blanc (Bartness et Bamshad, 1998). Une dénervation sympathique du tissu adipeux blanc augmente la masse de ce tissu adipeux en augmentant le nombre d'adipocytes sans modification de leur volume chez le hamster (Youngstrom et Bartness, 1998) et chez le rat (Cousin et al, 1993). De plus, la stimulation de l'innervation sympathique du tissu adipeux blanc engendre une augmentation de la lipolyse. Les fibres sympathiques stimulent la lipolyse soit par une innervation directe des adipocytes, soit par une innervation de la vascularisation (Bartness et Bamshad, 1998, Penicaud et al, 2000, Rayner, 2001). La noradrénaline agit via des récepteurs  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  qui vont activer la lipolyse et les récepteurs  $\alpha_2$  qui au contraire vont diminuer la lipolyse (Lafontan et Berlan, 1993). L'oxydation des lipides est augmentée par une stimulation des récepteurs  $\beta_3$  au niveau du tissu adipeux (De Souza et al, 1997)

Ainsi, la plus grande activité catécholaminergique associée à une concentration en noradrénaline plus importante dans les tissus adipeux blancs des rats Lou/C pourraient être à l'origine d'une lipolyse accrue et d'une diminution du nombre d'adipocytes conduisant à la masse adipeuse plus faible des rats Lou/C. L'augmentation de la lipolyse serait cohérente avec une plus grande disponibilité des substrats énergétiques nécessaires à la dépense énergétique supérieure observée chez le rat Lou/C.

## Activité sympathique dans le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est principalement impliqué dans la thermogénèse. Les études sur les adaptations physiologiques au froid ont permis de mettre en évidence l'importance de l'innervation sympathique dans le métabolisme énergétique du tissu adipeux brun. Ainsi, une exposition à long terme au froid engendre une hypertrophie du tissu adipeux brun consécutive à la stimulation sympathique (Rothwell et Stock, 1984) et une dénervation diminue la prolifération cellulaire induite par le froid (Géloën et al, 1992). Les adipocytes des deux lobes du tissu adipeux brun interscapulaire ainsi que les vaisseaux sanguins intrinsèques sont innervés directement (Lever et al, 1988). La noradrénaline active la lipolyse et la thermogénèse en se fixant sur des récepteurs  $\beta 1$  et sur des récepteurs  $\beta 3$  lorsque la stimulation est importante (Atgié et al, 1997). La noradrénaline stimule l'expression d'UCP1 qui est une protéine découplante dans la chaîne respiratoire mitochondriale et qui est à l'origine de l'activité thermogénique du tissu adipeux brun (Rehmark et al, 1990, Kozak et Kozak, 1994, Rohlf's et al, 1995).

Chez des modèles animaux d'obésité, on observe une diminution de l'activité sympathique dans le tissu adipeux brun (Yoshida et al, 1984, York et al, 1985, Rehorek et al, 1987, Himms-hagen, 1989, Seydoux et al, 1990, Blouquit et al, 1993) ou une diminution de la sensibilité à la noradrénaline des adipocytes (Marette et al, 1990). Cette diminution de l'innervation sympathique dans le tissu adipeux brun se traduirait par une diminution de la dépense énergétique et le développement de l'obésité chez ces modèles (rat Zucker, souris *ob/ob*, rat lésé au niveau de l'hypothalamus ventromédian).

Le tissu adipeux brun est responsable de 35 à 65 % de l'augmentation de la thermogénèse. L'augmentation de l'activité catécholaminergique dans le tissu adipeux brun des rats Lou/C par rapport aux rats Wistar pourrait être à l'origine d'une thermogénèse accrue qui se traduirait par la dépense énergétique supérieure observée à 6 et 12 mois chez les rats Lou/C. La température rectale n'est pas différente entre les deux souches. Mais ce type de mesure n'est pas suffisant. Une mesure continue sur plusieurs cycles nyctéméraux à l'aide de capteurs intraabdominaux ou placés au niveau du tissu adipeux brun, nous donnerait un meilleur reflet de la température centrale de l'animal et ses variations, notamment en périodes posprandiales. En effet une part de la dépense énergétique résulte de l'activation du tissu adipeux brun via le système nerveux sympathique suite à l'ingestion d'aliment (Monda et al, 1997). Cette dépense énergétique s'effectue sous forme de thermogénèse sans frisson activée par ingestion de nourriture et ce indépendamment de la densité calorique des aliments. Une

faible efficacité de la thermogenèse postprandiale peut être à l'origine du développement de l'obésité chez le rat et dans une moindre mesure chez l'homme (Glick et al, 1984).

### **Métabolisme énergétique tissulaire et système nerveux sympathique**

Alors que le tissu adipeux blanc a pour rôle de mettre en réserve ou fournir des substrats à l'organisme en fonction de ses besoins énergétiques, le tissu adipeux brun utilise les lipides pour la production de chaleur. Cette thermogenèse est due à une densité plus importante de mitochondries par rapport au tissu adipeux blanc et à la présence dans la membrane mitochondriale de protéines découplantes (UCP) qui vont permettre le passage des protons (Nicholls et Locke, 1984). Cette particularité métabolique du tissu adipeux brun est caractérisée par une plus grande activité respiratoire. La plus grande quantité d'enzymes oxydatives comme la cytochrome oxydase et leur plus grande activité est à l'origine de l'augmentation de l'activité respiratoire du tissu adipeux brun (Houstek et al, 1991).

Nous retrouvons chez les deux souches une activité cytochrome oxydase réduite dans les tissus adipeux blancs par rapport au tissu adipeux brun (Prunet-Marcassus et al, 1999). L'activité cytochrome oxydase est augmentée dans le tissu adipeux blanc des rats Lou/C par rapport aux rats Wistar à 6 mois, ce qui pourrait être lié à une activité métabolique accrue. Ces résultats sont cohérents avec l'innervation sympathique supérieure dans les tissus adipeux des rats Lou/C, la noradrénaline libérée par les terminaisons nerveuses augmentant l'expression d'UCP (Emilsson et al, 1998) et l'activité thermogénique dans les tissus adipeux blanc et bruns (Landsberg et al, 1984).

### **Activité sympathique dans le foie**

L'importance de l'innervation sympathique dans le contrôle de l'activité des enzymes hépatiques a été démontrée sur des préparations *ex vivo* de foies perfusés isolés de toutes influences endocrines (Hartmann et al, 1982, Jungermann et al, 1987). Une stimulation sympathique se traduit par une diminution des réserves de glycogène par augmentation de sa dégradation par la glycogène phosphorylase et une diminution de sa production par la glycogène synthase (Shimazu 1996, Nonogaki, 2000). L'action de l'innervation sympathique peut être directe sur les hépatocytes ou bien elle peut intervenir sur la régulation du métabolisme glucidique via une diminution du débit sanguin hépatique (Hartmann et al, 1982, Gardemann et al, 1987, Lin et al, 1997, Kurosawa et al, 2002).

Les rats Lou/C présentent une diminution de l'activité catécholaminergique dans le foie par rapport aux rats Wistar. Ainsi, une stimulation plus faible de la glycogénolyse chez les rats Lou/C serait reliée à la glycémie plus faible chez les Lou/C observée au cours de notre étude et par Couturier et al (2002).

### **Contenu en catécholamines de la glande surrénale**

Le rat Lou/C présente des contenus en adrénaline, noradrénaline et dopamine plus faibles par rapport à ceux des rats Wistar ce qui traduit une diminution de l'activité de synthèse des catécholamines ou une altération de leur libération par la glande medullo-surrénale. Les rats Lou/C ont une concentration d'adrénaline circulante deux fois plus faible que celle des rats Wistar (Couturier et al, 2002)

En plus des effets directs de l'innervation sympathique sur la production hépatique de glucose, l'adrénaline circulante joue un rôle primordial dans l'augmentation de production de glucose par le foie en activant la glycogénolyse de manière directe au niveau des hépatocytes ou par le biais de l'activation de la libération de glucagon par le pancréas. Par contre au regard de la noradrénaline provenant de l'innervation sympathique, la noradrénaline circulante ne joue qu'un rôle mineur dans la régulation de la production de glucose par le foie (Chu et al, 1997, Nonogaki, 2000). Au niveau du tissu adipeux, l'adrénaline circulante en conditions physiologiques normales, ne semble pas jouer de rôle prépondérant dans le métabolisme des adipocytes par rapport à l'innervation sympathique directe (Rayner, 2001).

Une injection au niveau central de leptine a pour effet d'augmenter la concentration de catécholamines circulantes et ce même chez des rats lésés au niveau de l'hypothalamus, c'est à dire sans une partie de leur contrôle de l'innervation sympathique (Satoh et al, 1999). La leptine agirait directement sur la libération de catécholamines par la glande surrénale. Par ailleurs, les concentrations de catécholamines circulantes sont augmentées suite à une infusion de noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian (Cincotta et al, 2000). Par rapport aux rats Wistar, les rats Lou/C présentent une leptinémie beaucoup plus basse et une quantité de noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian inférieure, ce qui pourrait être à l'origine d'une moins grande libération de catécholamines.

### III. LE PROFIL MONOAMINERGIQUE CENTRAL PARTICULIER DES RATS LOU/C POURRAIT ÊTRE À L'ORIGINE DU NON-DÉVELOPPEMENT DE L'OBÉSITÉ CHEZ CETTE SOUCHE

Nous avons caractérisé chez le rat Lou/C en comparaison avec le rat Wistar à 2 et 6 mois, l'activité *in vivo* de la tyrosine hydroxylase, et l'activité *in vivo* de la tryptophane hydroxylase, enzyme limitante de la synthèse des catécholamines et de la sérotonine, respectivement ainsi que les contenus en noradrénaline dans différentes structures centrales impliquées dans le contrôle de la balance énergétique (les noyaux catécholaminergiques A1C1, A2C2, A5 et A6, les deux principales structures sérotoninergiques centrales : le raphe dorsalis et le raphe médian, dans le noyau hypothalamique ventromédian et dans l'hypothalamus paraventriculaire).

Dans un premier temps, nous discuterons des conséquences sur la dépense énergétique et sur le contrôle de l'innervation sympathique des organes, des altérations neurochimiques observées chez les rats Lou/C. Dans un deuxième temps nous nous intéresserons à leurs implications dans la prise alimentaire particulière des rats Lou/C.

#### **Considérations méthodologiques et choix des structures**

L'hypothalamus est subdivisé en plusieurs noyaux jouant tous un rôle dans le contrôle de la balance énergétique (Noyaux arqué, dorsomédian, hypothalamique ventromédian et paraventriculaire ...). Le choix du noyau hypothalamique ventromédian et du noyau paraventriculaire s'est fait :

- en raison de leurs implications importantes à la fois dans la régulation de la dépense énergétique et dans la régulation de la prise alimentaire.

- en raison de limitations méthodologiques : la technique de microdissection par punching ne nous permettait d'étudier que des structures individualisées et proches de repères anatomiques précis.

- en raison de l'importance du rôle des projections monoaminergiques dans le contrôle de l'activité de ces structures.

Gold (1973) relativise l'importance du rôle de l'hypothalamus ventromédian en le qualifiant même de mythe. Le rôle de cette structure dans la régulation de la balance

énergétique a été établi suite à des stimulations électriques ou chimiques ou suite à des lésions de cette structure (Shimazu et al, 1986, Scheurink et al, 1990, Balkan et al, 1991, Takahashi et al, 1997, Cincotta et al, 2000). Mais ces résultats sont discutés notamment à cause d'un éventuel manque de spécificité des méthodologies employées, la lésion ou la stimulation pouvant affecter d'autres noyaux hypothalamiques (le noyau arqué par exemple) situés à proximité du noyau ventromédian (Bamshad et al, 1999).

Le choix des groupes cellulaires noradrénergiques et sérotoninergiques bulbopontiques s'est fait en fonction de leurs projections sur les noyaux hypothalamiques. En effet, l'innervation noradrénergique hypothalamique provient des groupes cellulaires catécholaminergiques bulbopontiques notamment A2C2 et dans une moindre mesure A6 (Palkovits, 1981, Luiten et al, 1987) et l'innervation sérotoninergique de l'hypothalamus a pour origine essentiellement le raphe dorsalis et le raphe médian, les deux principales structures sérotoninergiques centrales (Willoughby et Blessing, 1987).

### **Rôle des monoamines centrales dans la régulation de la dépense énergétique et de l'innervation sympathique des organes impliqués dans le métabolisme énergétique chez le rat Lou/C.**

#### *Système nerveux central et adiposité chez le rat Lou/C*

La localisation anatomique des centres contrôlant l'innervation sympathique du tissu adipeux blanc a été mise en évidence à l'aide de technique de rétro-marquage viral. Les deux principales structures hypothalamiques impliquées sont le noyau paraventriculaire et l'aire préoptique médiane. Peu de rétro-marquages sont observés dans l'hypothalamus ventromédian (Bamshad et al, 1998, Bartness et Bamshad, 1998). Cependant une lésion de l'hypothalamus ventromédian engendre une hyperphagie, une diminution de la dépense énergétique (Seydoux et al, 1981) et une diminution de la mobilisation des réserves lipidiques (Balkan et al, 1991). Une infusion chronique de noradrénaline au niveau de l'hypothalamus ventromédian engendre une augmentation de l'activité lipogénique dans le tissu adipeux blanc conduisant à une augmentation de la taille des adipocytes, aussi bien dans le tissu adipeux blanc que dans le tissu adipeux brun, une augmentation de l'adiposité sans augmentation de la prise alimentaire (Cincotta et al, 2000).

Le rat Lou/C présente une diminution de la quantité de noradrénaline dans le noyau hypothalamique ventromédian qui pourrait être associée à l'augmentation de l'activité sympathique dans les tissus adipeux blanc et brun chez cette souche.

#### *Système nerveux central et métabolisme glucidique chez le rat Lou/C*

L'implication des noyaux hypothalamiques dans la régulation de la glycémie est bien connue depuis les années 60. La stimulation électrique de l'hypothalamus ventromédian augmente l'activité du système nerveux sympathique et l'utilisation du glycogène hépatique résultant en une hyperglycémie (Shimazu et al, 1966). Ces résultats ont été confirmés par Yoshimatsu et al. (1988), Honmura et al (1992) et Takahashi et al (1997) : la stimulation de l'hypothalamus ventromédian ou du noyau paraventriculaire engendre une augmentation de la glycolyse hépatique essentiellement médiée par le nerf hépatique. L'utilisation de la technique de retro marquage montre que le noyau paraventriculaire est à l'origine du contrôle de l'innervation sympathique du foie (La Fleur et al, 2000). L'hypothalamus ventromédian reçoit des afférences de récepteurs de la glycémie (aera postrema) mais il est également directement sensible aux variations de glycémie (Peters et al, 2002). La régulation du métabolisme glucidique fait intervenir de nombreux neurotransmetteurs parmi lesquels les monoamines jouent un rôle important (Nonogaki et Iguchi, 1997). Les récepteurs alpha- et beta-adrénergiques au niveau du noyau paraventriculaire intervient dans la régulation de la glycémie (Scheurink et al, 1990).

La régulation de la glycémie n'implique pas que le contrôle de l'innervation sympathique du foie. En effet, une infusion chronique de sérotonine et de noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian modifie la libération d'insuline par les îlots de Langerhans ce qui peut être à l'origine du développement d'un diabète de type 2 (Luo et al, 1999, Liang et al, 1999). De même, l'injection chronique de noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian de rats stimule la sécrétion d'insuline ainsi que la libération de glucagon (Cincotta et al, 2000).

Par rapport au rat Wistar, le rat Lou/C présente une diminution du contenu en noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian ainsi qu'une diminution de l'activité catécholaminergique dans les noyaux A2C2 et A6 qui envoient des projections noradrénergiques dans l'hypothalamus. Cette réduction du tonus noradrénergique pourrait être responsable de la diminution de l'innervation sympathique dans le foie et de la diminution de l'insulinémie chez le rat Lou/C.

## **Rôle des monoamines centrales dans la régulation de la prise alimentaire chez le rat Lou/C**

Alors que Cincotta et al (2000) n'observent pas d'augmentation de la prise alimentaire suite à une injection de noradrénaline dans le noyau ventromédian, d'autres études montrent qu'une infusion chronique de noradrénaline dans ce noyau augmente la prise alimentaire (Shimazu et al, 1986). Par ailleurs, une injection de noradrénaline dans le noyau paraventriculaire est également associée à une hyperphagie (Hajnal et al, 1997, Wellman, 2000).

D'une manière générale, la sérotonine au niveau des noyaux hypothalamiques possède un effet supprimeur sur la prise alimentaire (Leibowitz et Alexander, 1998).

Nous observons chez le rat Lou/C une diminution de la quantité de noradrénaline dans le noyau hypothalamique ventromédian et une diminution de l'activité catécholaminergique dans les groupes cellulaires A2C2 et A6, principales innervations catécholaminergiques des noyaux hypothalamiques. Ces résultats suggèrent que la prise alimentaire plus faible chez les rats Lou/C, pourrait avoir pour origine une diminution de l'activité catécholaminergique centrale. Par contre, le peu de différences observées entre les rats Lou/C et les rats Wistar concernant l'activité sérotoninergique dans les noyaux hypothalamiques, laisse penser une moins grande implication de la sérotonine dans la prise alimentaire particulière du rat Lou/C.

#### **IV. LES RATS LOU/C NE DÉVELOPPENT PAS DE RÉSISTANCE À L'INSULINE EN VIEILLISSANT CONTRAIREMENT AUX RATS WISTAR**

Aussi bien chez les modèles animaux que chez l'homme, le vieillissement est associé à l'augmentation de l'insulinémie. Après 24 heures de jeûne, un groupe d'humain âgés en moyenne de 66 ans présente une insulinémie basale supérieure de 31% par rapport à celle d'un groupe de sujets âgés en moyenne de 24 ans et ayant un index d'obésité comparable (Gumbiner et al, 1989). Une autre étude (Fink et al, 1985) retrouvent cette hyperinsulinémie (+54%) chez des personnes âgées de 70 ans par rapport à des personnes âgées de 35 ans. Des études chez l'animal ont également fait ressortir cette hyperinsulinémie avec l'âge : chez le rat Sprague-Dawley, l'insulinémie est plus que doublée entre 4 et 12 mois d'âges (Reaven et Reaven, 1981).

Au cours de notre étude longitudinale de l'insulinémie chez le rat Wistar, nous retrouvons cette hyperinsulinémie mais elle apparaît plus tardivement. En effet, nous trouvons chez les rats Wistar une augmentation marquée de leur insulinémie à partir de 18 mois (+70%,  $p < 0.05$ , par rapport à 12 mois). Cette augmentation d'insulinémie à 18 mois est suivie d'une diminution qui ne permet plus de distinguer une insulinémie supérieure à 24 mois par rapport à 12 mois. Ce résultat est en accord avec l'étude de McDonald (1990) qui observe même une diminution de l'insulinémie chez le rat Sprague-Dawley entre 12 et 27 mois. Cette diminution d'insulinémie pourrait être plutôt liée à un phénomène de sénescence, les cellules  $\beta$  du pancréas ne pouvant plus assurer leur fonction sécrétrice.

L'augmentation de l'insulinémie à partir de 18 mois est due au développement d'un diabète non-insulino-dépendant qui requiert à la fois un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques et une diminution de l'action de l'insuline sur les organes cibles. En effet, une altération de la transduction du signal limite la stimulation par le glucose de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  (Draznin et al, Wang et al, 1987). Mais cette diminution de la libération d'insuline est compensée par un ralentissement avec l'âge du prélèvement de l'insuline au niveau plasmatique. Cette résistance périphérique se traduit donc par une moins grande fixation de l'insuline sur les organes cibles (DeFronzo, 1979). De plus, une altération avec l'âge de la transduction du signal de l'insuline a également été observée au niveau du système nerveux central (Fernandes et al, 2001).

De nombreuses études montrent que plus que l'effet du vieillissement en soi, le développement de la résistance à l'insuline serait le fait d'une augmentation de la masse

adipeuse chez le rat (Barzilai et Gabriely, 2001) comme chez l'homme (Felber et Golay, 2002). En effet, l'insulinémie est corrélée positivement à la masse adipeuse (Schwartz et al, 1997). L'excision chirurgicale de la masse adipeuse chez le rat empêche le développement de la résistance à l'insuline en diminuant de moitié l'insulinémie. Dans ce modèle, la quantité d'insuline nécessaire pour maintenir le niveau basal de glucose au cours d'un clamp hépato-pancréatique est également diminuée de moitié (Barzilai et al, 1999).

Chez le rat Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty (OLETF), une souche de rat développant spontanément et précocément (dès 23 semaines) un diabète non-insulino-dépendant, la technique du clamp euglycémique a permis de montrer qu'une restriction alimentaire de 30% préserve la sensibilité à l'insuline (Okauchi et al, 1995). Chez cette même souche, l'exercice physique prévient également le développement de la résistance à l'insuline (Shima et al, 1993). Cette absence de diabète chez ces rats entraînés ou restreints caloriquement serait due au maintien d'une masse adipeuse relativement faible. L'équipe de Reaven avait déjà montré au début des années 1980, sur des rats entraînés ou restreints caloriquement le non-développement d'une hyperinsulinémie. Cependant dans leur modèle de rats maigres, le fonctionnement des cellules  $\beta$  n'est pas préservé au cours du vieillissement, mettant en avant les altérations du pancréas propres à l'âge, plutôt qu'un effet de la masse adipeuse sur la sécrétion d'insuline (Reaven et Reaven, 1981, Reaven et al. 1983). Chez des rats Fisher 344, l'insulinémie basale est multipliée par plus de 2 entre 2 et 20 mois, mais une restriction alimentaire de 55% dès l'âge de 2 mois permet de maintenir cette insulinémie constante au cours du vieillissement. La restriction calorique prévient la diminution de l'action de l'insuline sur le foie (Gupta et al, 1995).

Les rats restreints caloriquement présentent une masse de tissus adipeux blancs diminuée d'environ 70% par rapport aux rats nourris *ad libitum*. Les restrictions alimentaires couramment utilisées sont proches de celle présentée spontanément par les rats Lou/C (prise alimentaire inférieure d'environ 30% par rapport aux rats Wistar). Ces rats Lou/C ont une masse de tissus adipeux blancs rétro-péritonéal et épидidymal inférieure d'environ 70% par rapport aux rats Wistar. Or, comme dans les modèles de restriction alimentaire, les rats Lou/C présentent une insulinémie constante au cours du vieillissement alors que les rats Wistar ont une insulinémie multipliée par plus de deux entre 6 et 18 mois. Ces résultats confirment que l'augmentation de l'insulinémie avec l'âge est plus liée à l'accumulation de masse adipeuse qu'à l'effet de l'âge en soi.

Dans ce contexte, il était logique de penser que le rat Lou/C ne développerait pas de diabète avec l'âge. Pour valider cette hypothèse, le non-développement d'une résistance à

l'insuline chez le rat Lou/C à 22 mois a été montré par la technique du clamp euglycémique-hyperinsulinique. L'insulinémie basale était de  $1.68 \pm 0.452$  ng/ml pour les rats Wistar et de  $0.923 \pm 0.119$  ng/ml pour les rats Lou/C (-45%,  $p < 0.05$ ), ce qui confirme les résultats décrits au cours de notre étude longitudinale (-66% observé à 24 mois). La quantité de glucose injectée afin de maintenir une glycémie constante durant une perfusion de 6mU/kg.min d'insuline était de  $30.8 \pm 4.0$  mg/kg.min pour les rats Lou/C et de  $16.7 \pm 2.7$  mg/kg.min pour les rats Wistar ( $p < 0.05$ ). Bien que ce type d'études n'ait pas été effectuée à des âges plus précoces, ces résultats associés à l'insulinémie constante observée au cours du vieillissement confirment que les rats Lou/C ne développent pas de résistance à l'insuline.

L'hyperinsulinémie observée chez les rats Wistar n'engendre pas les modifications de la balance énergétique attendues, ce qui confirme la résistance à l'insuline au niveau central développée par les rats âgés (Fernandes et al, 2001). En effet, l'insuline régule la balance énergétique par son action sur les centres intervenant dans le contrôle de la prise alimentaire et la dépense énergétique. Une injection intracérébrale d'insuline provoque une diminution de la prise alimentaire et du poids (Woods et al, 1979). Au niveau de l'hypothalamus, une diminution de la quantité des récepteurs à l'insuline induite par la technique des oligonucléotides antisens (Obici et al, 2002) ou l'absence de récepteurs à l'insuline dans les neurones chez des souris knock-out (Bruning et al, 2000) s'accompagnent d'une augmentation de la prise alimentaire, de la masse adipeuse ainsi que d'une résistance à l'insuline.

La noradrénaline au niveau des noyaux hypothalamiques influence la sécrétion d'insuline. Le contenu en noradrénaline supérieur dans le noyau hypothalamique ventromédian des rats Wistar par rapport aux rats Lou/C pourrait être en partie responsable de l'insulinémie observée chez les rats Wistar. En effet, une injection chronique de noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian de rats provoque une augmentation de l'insulinémie (Cincotta et al, 2000).

## V. LES RATS LOU/C DÉVELOPPENT UNE RÉSISTANCE À LA LEPTINE MAIS PLUS TARDIVEMENT AU COURS DU VIEILLISSEMENT PAR RAPPORT AUX RATS WISTAR

La leptine, une hormone résultant de l'expression du gène *ob*, est principalement sécrétée par les adipocytes (Zhang et al, 1994) et ce proportionnellement à la masse de tissu adipeux (Lonnqvist et al, 1997, Li et al, 1997). Son rôle principal est d'induire une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique, par son action sur les noyaux hypothalamiques.

L'augmentation de la concentration de leptine plasmatique avec le vieillissement est souvent disproportionnée par rapport à l'augmentation de la quantité de tissu adipeux. Par ailleurs, le développement d'une résistance à la leptine au cours du vieillissement a été mis en évidence. En effet, la leptine provoquant une perte de poids, sa concentration plasmatique élevée trouvée chez les obèses (aussi bien les rongeurs que les humains) n'engendre pourtant pas de modifications de la balance énergétique (Considine et al, 1996, Lonnqvist et al, 1997, Li et al, 1997) et une administration intracérébrale de leptine n'engendre pas les modifications métaboliques attendues chez les rats âgés (Shek et Scarpace, 2000). Une diminution du captage de la leptine, une diminution de l'expression de l'ARNm des récepteurs à la leptine au niveau de l'hypothalamus (le site d'action de la leptine) sont observées chez des rats âgés (Fernandez-Galaz et al, 2001). Scarpace et al (2001) montrent également une altération de la transduction du signal lié à la leptine dans l'hypothalamus ce qui peut être à l'origine du développement de la résistance à la leptine avec l'âge.

Nous avons voulu vérifier quelles étaient les répercussions de l'importante différence de masse de tissus adipeux blancs entre les rats Wistar et les rats Lou/C, sur la quantité de cette hormone plasmatique. Notre étude est la première à montrer l'évolution de la concentration plasmatique de leptine au cours du vieillissement chez le rat Lou/C en comparaison avec le rat Wistar.

Concernant la leptinémie des rats Wistar au cours du vieillissement, nos résultats semblent en accord avec les études précédentes. Ainsi entre 3 et 24 mois, Li et al. (1997, 1998) montrent une leptinémie multipliée par un facteur proche de 4 chez des rats de la souche Fischer-244xBN, qui est un modèle de développement d'obésité avec le vieillissement. Scarpace et al (2001), chez cette même souche, trouvent une leptinémie multipliée par 3 entre 6 et 30 mois et Fernandez-Galaz et al (2002) trouvent une leptinémie

multipliée par 6 entre 3 et 24 mois chez des rats Wistar. Notre étude basée sur une cinétique plus fine permet de mettre en évidence une forte augmentation de la leptinémie chez les rats Wistar entre 1 et 12 mois (multipliée par 22) suivie d'un plateau et une tendance à la diminution à 24 mois. L'augmentation précoce et rapide de la leptinémie entre 1 et 6 mois (multipliée par 9) accrédite l'hypothèse du développement d'une résistance à la leptine dès 3 mois chez le rat Wistar (Iossa et al, 1999). Une injection de leptine chez le rat (Scarpace et al, 1997) ou chez la souris obèse, *ob/ob* (Hwa et al, 1997) induit une augmentation de la dépense énergétique. Une injection intrahypothalamique provoque une diminution de la prise alimentaire alors qu'une déficience en leptine conduit aux effets opposés (Schwartz et al, 2000) et chez les rats âgés une injection intracérébroventriculaire n'augmente pas la dépense énergétique ni ne diminue la prise alimentaire (Shek et Scarpace, 2000). Un traitement à la leptine agit plus sur la dépense énergétique que sur la prise alimentaire en cas de restriction alimentaire alors qu'elle influence plutôt la prise alimentaire lorsque la nourriture est disponible abondamment (Doring et al, 1998). Bien que la leptinémie augmente entre 6 et 12 mois (multipliée par 2) chez les rats Wistar, aucune différence concernant la prise alimentaire ou la dépense énergétique n'a été observée, ce qui confirme l'installation d'une résistance à la leptine chez le rat âgés.

La leptinémie varie en fonction du régime alimentaire et également en fonction de la prise alimentaire (Cha et Jones, 1998). Les rats développant une obésité avec l'âge (Newby et al, 1990), des modèles animaux de restriction alimentaire ont été développés afin de dissocier les effets de l'âge proprement dit et les effets liés à l'accumulation de masse adipeuse. A notre connaissance, l'étude menée par Fenandez-Galaz et al (2002) est une des seules études qui donne des valeurs de concentrations de leptine plasmatique chez des rats âgés suite à une restriction alimentaire de longue durée en comparaison à des rats nourris *ad libitum*. Les auteurs ont réduit de 20% à 25% la prise alimentaire de rats Wistar à partir de 20 mois et ils ont effectué leurs dosages de leptine plasmatique sur des rats âgés de 23 à 24 mois pesant 25% de moins que des rats Wistar nourris *ad libitum*. Les rats Lou/C à 24 mois présentent spontanément une prise alimentaire inférieure de 17% et le poids des rats est inférieur de 44% à celui des rats Wistar. Or, il est intéressant de noter qu'à l'âge de 24 mois, les rats Lou/C présentent une diminution de la concentration plasmatique de leptine par rapport aux rats Wistar (-67%) similaire à celle observée par Fenandez-Galaz et al (2001) chez leur modèle de rat ayant subis une restriction alimentaire par rapport à leurs rats contrôles (-69%). Par ailleurs, les valeurs de concentration de leptine plasmatique observées chez les rats Lou/C âgés de 18 et 24 mois ( $3,71 \pm 0,57$  et  $4,13 \pm 0,70$  ng/ml respectivement) sont proches de celles

observées par Gabriely et al. (2002) chez des rats âgés de 20 mois ayant subis une restriction alimentaire de 45% à partir de l'âge de 3 mois ( $3,4 \pm 0,2$  ng/ml). Au cours de cette étude, Gabriely et al. montrent que l'hyperleptinémie observée au cours du vieillissement serait indépendante de la masse adipeuse et serait également à l'origine des syndromes métaboliques observés chez les sujets âgés (obésité, résistance à l'insuline). Cependant ils reconnaissent que leurs résultats obtenus sur un modèle de rat restreints alimentaires, pourraient être liés aux effets de cette restriction alimentaire elle-même plutôt qu'à une diminution de la masse adipeuse. Nous avons montré que les rats Lou/C présentent spontanément une forte similitude avec ces modèles de restriction alimentaire, notamment concernant la prise alimentaire et l'évolution de leur concentration plasmatique de leptine. **Ainsi le rat Lou/C pourrait être un modèle plus adéquat afin d'étudier les mécanismes d'installation de la résistance à la leptine au cours du vieillissement.**

Ces similitudes de prises alimentaires et de leptinémie avec les modèles de restriction alimentaire indiquent que la concentration de leptine plasmatique plus faible chez les rats Lou/C serait le résultat de la diminution de la prise alimentaire et d'une quantité moindre de tissus adipeux blancs (Gabriely et al, 2002, Fernandez-Galaz et al, 2002). Cependant, les différences de dépense énergétique et de prise alimentaires observées chez les rats Lou/C par rapport aux rats Wistar laissent penser que la leptine aurait un effet propre sur la spécificité de la balance énergétique des rats Lou/C. En effet, par rapport au rat Wistar, le rat Lou/C présente une dépense énergétique supérieure à 6 et 12 mois qui pourrait correspondre à l'action de la leptine. Bien qu'elle n'augmente pas dans les proportions observées chez les rats Wistar, la concentration plasmatique de leptine augmente tout de même chez le rat Lou/C avec l'âge (multipliée par 2,5 entre 1 et 6 mois). Par ailleurs, Iossa et al (1999) observent une diminution de la dépense énergétique jusqu'à 6 mois chez le rat Wistar. Ils attribuent cette diminution au développement précoce d'une résistance à la leptine. Nous observons chez les deux souches une diminution de dépense énergétique entre 1 et 6 mois, mais cette diminution est plus limitée chez les rats Lou/C que celle observée chez les rats Wistar. Cette dépense énergétique plus importante chez les rats Lou/C, est associée à une prise alimentaire plus faible à tous les âges par rapport aux rats Wistar, ce qui pourrait traduire l'effet anorexigène de la leptine. Ainsi, le rat Lou/C conserve au cours du vieillissement une sensibilité à la leptine alors que le rat Wistar développe rapidement, avant 6 mois, une résistance à la leptine (Iossa et al, 1999).

Cependant, la plus grande dépense énergétique des rats Lou/C par rapport aux rats Wistar ne s'observe que jusqu'à l'âge de 12 mois et les différences de prise alimentaire ont

tendance à s'atténuer entre les rats Lou/C et les rats Wistar à partir de 18 mois. Le rat Lou/C développerait quand même une résistance à la leptine mais de manière plus tardive que le rat Wistar. Cette hypothèse est étayée par le fait que chez les rats Lou/C, la masse de tissu adipeux blanc rétropéritonéal, qui est un bon reflet de l'adiposité (Newby et al, 1990), ne varie pas de manière significative entre 6 et 24 mois, alors que la leptinémie est multipliée par 2. Donc, l'expression de la leptine par unité de tissu adipeux blanc est augmentée. On retrouve ainsi chez les rats Lou/C âgés le même type de dissociation entre l'adiposité et la sécrétion de leptine que l'on observe chez les rats développant une résistance à la leptine (Li et al, 1997, 1998).

La leptine provoque une activation du système nerveux sympathique notamment par son action sur l'hypothalamus ventromédian (Satoh et al, 1999). La leptine augmente l'activité sympathique de manière sélective au niveau du tissu adipeux brun, des reins, les glandes medullosurrénales, des membres inférieurs (Dunbar et al, 1997, Haynes et al, 1997, Hausberg et al, 2002). Cette augmentation de l'activité sympathique se fait en partie par l'intermédiaire de l'hypothalamus ventromédian (Satoh et al, 1999). Nous avons observé une augmentation spécifique de l'activité catécholaminergique dans les tissus adipeux blancs et une diminution de cette activité dans le foie des rats Lou/C par rapport aux rats Wistar ainsi qu'une diminution du contenu en catécholamines de la glande surrénale. Notre étude ne permet pas de relier directement les différences d'activité catécholaminergique tissulaire entre les deux souches et la leptinémie, mais on peut penser qu'une différence de sensibilité centrale à la leptine contribue aux variations de l'activité sympathique au niveau périphérique observées chez le rat Lou/C.

Une injection chronique de noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian de rats multiplie par trois la leptinémie par rapport aux rats contrôles (Cincotta et al, 2000). Ainsi, le contenu en noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian supérieure à celui observé chez les rats Lou/C, peut être en partie à l'origine de la leptinémie supérieure observée chez les rats Wistar. Par contre, la leptinémie différente des deux souches ne serait pas à l'origine de la différence de contenu en noradrénaline dans l'hypothalamus ventromédian. En effet, *in vitro*, une injection de leptine n'engendre pas de libération de noradrénaline dans les régions hypothalamiques (Hastings et al, 2002).

## VI. LE RAT LOU/C PEUT SERVIR DE MODÈLE AFIN DE DÉTERMINER LES INTERRELATIONS INSULINÉMIE/LEPTINÉMIE

Les souris *ob/ob* ou *db/db*, déficientes pour le gène codant pour la leptine ou son récepteur, développent très tôt une résistance à l'insuline (Kahn, 2000). Un traitement à la leptine chez ces souris, provoque une diminution de leur insulinémie (Hallas et al, 1995, Muzzin et al, 1996). Une lésion de l'hypothalamus ventromédian, qui est le site d'action principal de la leptine, provoque une hyperinsulinémie (Elmqvist et al, 1998) et la leptine inhibe la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  (Kieffer et Habener, 2000). Ces effets hypoinsulinémisants de la leptine sont discutés car d'autres études ne montrent aucun effet (Leclercq-Meyer et al, 1998) ou bien une stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  suite à un traitement avec de la leptine (Shimizu et al, 1997). Par ailleurs, la leptine augmente la sensibilité périphérique à l'insuline (Sivitz et al, 1997, Chinookoswong et al, 1999, Wang et al, 1999). Au regard de ces données contradictoires, Ceddia et al. (2002), soulèvent la question de l'implication de la leptine, indépendamment de l'adiposité, dans le développement de la résistance à l'insuline.

Nous avons montré chez les rats Wistar que l'hyperleptinémie apparaissait dès 6 mois alors qu'ils ne développaient une hyperinsulinémie qu'à partir de 18 mois. Toutefois, cette observation ne nous permet pas de conclure quant au rôle de la leptine dans le développement de la résistance à l'insuline car nous n'avons pas dissocié l'hyperleptinémie de l'augmentation de la masse adipeuse (pouvant être en soi responsable de l'hyperinsulinémie) chez le rat Wistar. L'insulinémie constante au cours du vieillissement chez les rats Lou/C et l'augmentation limitée de la leptine circulante ne nous permettent pas non plus d'établir un lien de causalité directe entre la leptinémie et le non-développement de la résistance à l'insuline. Etant donné que ces différences par rapport aux rats Wistar, sont associées à une diminution de la masse adipeuse. Des expérimentations complémentaires utilisant le rat Lou/C (traitement à la leptine par exemple) permettraient de déterminer l'effet de la leptine elle-même sur le développement de la résistance à l'insuline.

D'autre part, l'insuline semble jouer un rôle important dans l'expression du gène codant pour la leptine. Sur des adipocytes en culture, l'insuline provoque une libération accrue de leptine (Rentsch et Chiesi, 1996). Des résultats semblables sont obtenus *in vivo* chez l'homme ou les modèles animaux, l'insuline augmente la sécrétion de leptine (Saladin et al, 1995). D'autres études montrent aucun effet de l'insuline sur la sécrétion de leptine (Caprio et al, 1996, Koopmans et al, 1998). La mesure de l'évolution de la leptinémie et de

l'insulinémie chez les mêmes rats Wistar nous permet de montrer que l'hyperinsulinémie est successive à l'hyperleptinémie et non pas l'inverse ce qui laisse penser qu'en tout cas, le développement de la résistance à la leptine n'est pas induit par l'hyperinsulinémie. Etant donné que le rat Lou/C présente au cours du vieillissement une masse adipeuse et une insulinémie constante ainsi qu'une évolution linéaire et modérée de sa leptinémie, des hyperinsulinémies provoquées sur cette souche permettraient de déterminer le rôle exact de l'insuline sur la leptinémie.

## **VII. LE RAT LOU/C EST UN MODÈLE DE VIEILLISSEMENT SAIN AU REGARD DE SA MASSE ADIPEUSE, DE SON INSULINÉMIE ET DE SA LEPTINÉMIE**

Une hyperleptinémie a été associée à une augmentation de la pression artérielle (Shek et al, 1998). La résistance à la leptine est en quelque sorte sélective. La leptine active le système nerveux sympathique même chez des sujets obèses pourtant reconnus comme étant résistants à la leptine (Haynes, 2000, Mark et al, 2002).

Parmi les nombreux effets « bénéfiques » attribués à la restriction calorique, de nombreuses études, aussi bien chez l'homme que chez des modèles animaux, ont montré qu'une restriction alimentaire influençait la plasticité neuronale et pouvait prévenir le développement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Mattson et al, 2003). Toujours au niveau neuronal, L'insuline serait également impliquée dans le développement de nombreuses pathologies du système nerveux central (Schulingkamp et al, 2000). Une restriction alimentaire permet le retour à une tension artérielle normale en partie suite à une diminution de la leptinémie (Swoap, 2001).

Une diminution de la prise alimentaire prévient les altérations de l'ADN dues à un stress oxydatif apparaissant normalement au cours du vieillissement chez des animaux non restreints alimentaires (Merry, 2002).

Le rat Lou/C a été proposé par Alliot et al. (2002) comme bon modèle d'étude du vieillissement. Nos données montrent pour la première fois que le rat Lou/C ne développe ni d'obésité et ni l'hyperleptinémie et la résistance à l'insuline qui lui sont associées. Le rat Lou/C est un modèle de vieillissement sain au regard des nombreuses pathologies associées à ces paramètres métaboliques.

# CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude a permis dans un premier temps de caractériser la balance énergétique du rat Lou/C par rapport au rat Wistar. Le rat Lou/C à tous les âges présente une adiposité (masse de tissus adipeux blancs et index de Lee) nettement inférieure à celle des rats Wistar. Cette adiposité plus faible peut avoir pour origine la dépense énergétique des rats Lou/C supérieure à celle des rats Wistar, et une activité locomotrice supérieure. De plus, la prise alimentaire des rats Lou/C est inférieure à celle des rats Wistar à tous les âges.

La dépense énergétique est en partie stimulée par le système nerveux sympathique qui est en retour inhibé par l'insuline et la leptine, deux marqueurs de la quantité de réserves adipeuses qui agissent également sur la régulation de la prise alimentaire. Dans une deuxième étude, nous avons donc déterminé le rôle de cette boucle de rétrocontrôle dans la balance énergétique. L'activité sympathique est spécifiquement augmentée dans les tissus adipeux blancs et bruns des rats Lou/C par rapport aux rats Wistar ce qui pourrait engendrer une lipolyse accrue ainsi qu'une augmentation de la thermogénèse. Par contre, les rats Wistar présentent une insulïnémie et une leptinémie beaucoup plus élevées au cours du vieillissement que celles des rats Lou/C. Ces concentrations d'hormones plasmatiques n'ont pas les effets physiologiques escomptés chez le rat Wistar ce qui montre l'installation avec le vieillissement d'une résistance à l'insuline et à la leptine. Le non-développement d'une résistance à l'insuline chez le rat Lou/C est confirmé par les taux de perfusion de glucose supérieurs lors du clamp euglycémique-hyperinsulinique.

Les rats Lou/C présentent un profil noradrénergique central diminué notamment au niveau des noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la balance énergétique. Ces modifications pourraient être à l'origine de l'innervation sympathique augmentée dans les tissus adipeux. Par contre le profil sérotoninergique des structures centrales du rat Lou/C semble moins modifié par rapport à celui des rats Wistar, ce qui laisse supposer que la sérotonine n'intervient pas dans la prise alimentaire diminuée du rat Lou/C.

Nous avons ainsi caractérisé la balance énergétique du rat Lou/C et confirmé le non-développement d'obésité chez cette souche. Par ailleurs, nous sommes les premiers à montrer que le rat Lou/C est un bon modèle de vieillissement sain en considérant la régulation de sa balance énergétique et certains paramètres endocrines comme le non-développement d'une résistance à l'insuline.

## PERSPECTIVES

En continuité logique avec les résultats de notre thèse, les hypothèses que nous proposons d'évaluer concernent le métabolisme énergétique, le contrôle monoaminergique et le rétrocontrôle neuroendocrine.

### *Perspectives spécifiques à la **balance énergétique** des rats Lou/C*

L'étude du rat Lou/C pour ces particularités métaboliques et en tant que modèle de vieillissement sain n'en est qu'à ses débuts et de nombreux paramètres physiologiques, tissulaires et cellulaires manquent afin de caractériser le métabolisme énergétique de ce rat.

Le rat Lou/C présente à 6 et 12 mois une dépense énergétique moyenne supérieure à celle des rats Wistar. Une étude de la thermogenèse postprandiale permettrait de déterminer l'une des causes éventuelles de cette dépense énergétique supérieure observée chez le rat Lou/C et d'évaluer le rôle de la thermogenèse postprandiale dans le non-développement de l'obésité sur ce modèle animal. En effet, une mauvaise efficacité de la thermogenèse postprandiale peut être à l'origine du développement de l'obésité chez le rat et dans une moindre mesure chez l'homme (Glick et al, 1984). Cette dépense énergétique s'effectue sous forme de thermogenèse sans frisson activée par l'ingestion de nourriture et ce indépendamment de la densité calorique des aliments. Le tissu adipeux brun est responsable de 35 à 65 % de l'augmentation de la thermogenèse dans différentes situations notamment lors de la thermogenèse postprandiale. La stimulation du tissu adipeux brun est sous le contrôle de l'innervation sympathique. Au cours de notre étude nous avons montré que le rat Lou/C présente une augmentation de l'activité sympathique dans le tissu adipeux brun. De plus ces mesures offrent un indicateur spécifique de la fonctionnalité du tissu adipeux brun et de l'efficacité de son innervation. En pratique, l'évaluation de la thermogenèse postprandiale est réalisée ainsi : les rats sont privés de nourriture pendant 24 h et leur dépense énergétique est mesurée par calorimétrie indirecte toutes les 5 min pendant 45 min après la présentation de 5 g de nourriture (Monda et al, 1997).

Les protéines découplantes (UCP-1, -2, -3) de la membrane des mitochondries permettent une dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Leur expression est stimulée par le système nerveux sympathique dans les tissus adipeux bruns et blancs (Rayner, 2001). Les rats Lou/C présentent une augmentation de l'activité sympathique dans ces tissus ainsi qu'une augmentation de l'activité cytochrome oxydase (enzymes du métabolisme oxydatif

mitochondrial) dans le tissu adipeux blanc. L'évaluation de la quantité de protéines découplantes (UCP-1, -2, -3) dans les différents organes du rat Lou/C (tissu adipeux brun, blanc, muscles...) nous permettrait d'avoir une approche fonctionnelle au niveau tissulaire, supplémentaire afin de déterminer l'origine de la dépense énergétique plus élevée chez le rat Lou/C.

*Perspectives spécifiques au système monoaminergique central et au système sympathique des rats Lou/C*

La seconde partie de notre étude s'est attachée à faire un « état des lieux » concernant 1) l'innervation sympathique des organes impliqués dans la balance énergétique, 2) le profil monoaminergique central du rat Lou/C par rapport au rat Wistar. Afin d'évaluer l'importance relative de nos observations sur le non-développement de l'obésité chez le rat Lou/C, une des perspectives serait de déséquilibrer ces systèmes de contrôle et d'étudier les répercussions fonctionnelles.

Une lésion de l'hypothalamus ventromédian (Figure 37) engendre le développement de l'obésité aussi bien chez le rat que chez l'homme (Bray, 1990). Chez le rat, une lésion de l'hypothalamus ventromédian se traduit à la fois par une augmentation de la prise alimentaire et une diminution du métabolisme de repos et de l'activité locomotrice (Hustvedt et al, 1984). L'hypothalamus ventromédian est une zone privilégiée de l'action anorexigène de la leptine (Schwartz et al, 2000). Les rats ayant subi une lésion de l'hypothalamus ventromédian développent une résistance à la leptine (augmentation de la sécrétion de leptine par les adipocytes mais absence de réponse physiologique, l'hypothalamus ventromédian, zone centrale effectrice, étant détruit). Une lésion de l'hypothalamus ventromédian engendre également une hyperinsulinémie et un dysfonctionnement de la régulation de la glycémie (Dube et al, 1999, Nonogaki, 2000). La diminution de la dépense énergétique chez les animaux lésés s'explique en partie par une altération de la stimulation sympathique du tissu adipeux brun (tissu impliqué dans la thermogenèse) (Nijijima et al, 1984, Monda et al, 1997).

Nos résultats précédents ont montré une réduction du statut noradrénergique dans l'hypothalamus ventromédian chez le rat Lou/C. Une lésion de cette structure chez ces rats permettra 1) de tester la réactivité neuroendocrine des systèmes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Leptinémie, insulinémie...), 2) de déterminer si le rat Lou/C est capable de développer d'autres mécanismes de régulation, 3) de déterminer l'importance relative de l'hypothalamus ventromédian dans la balance énergétique particulière du rat Lou/C.

La sympathectomie a permis chez les animaux développant une obésité, de déterminer les contributions relatives de la prise alimentaire et de la dépense énergétique dans le déséquilibre de la balance énergétique (Levin et Sullivan, 1984, Desautels et al, 1991). Par traitement pharmacologique à la guanéthidine, il est possible de produire chez le rat une sympathectomie permanente sans altérer l'activité des monoamines centrales. Le rat Lou/C présente à 2 et 6 mois des modifications de l'activité sympathique dans les organes périphériques. La sympathectomie permettrait d'évaluer l'importance du rôle de ces modifications dans la spécificité de la balance énergétique du rat Lou/C.

#### *Perspectives spécifiques à la boucle de rétrocontrôle hormonale des rats Lou/C*

Le développement plus tardif d'une résistance à la leptine chez le rat Lou/C n'est que suggéré par nos dosages de leptinémie plasmatique. La mesure de la quantité de leptine dans les tissus adipeux blancs (par dosage radioimmunologique) des rats Lou/C comparés aux rats Wistar déterminerait précisément la production de leptine par les adipocytes. La mesure de la dépense énergétique et de la prise alimentaire suite à une injection de leptine et une étude de l'expression des récepteurs hypothalamiques de la leptine attesteraient du non-développement de la résistance à la leptine chez le rat Lou/C (Scarpace et al, 2000).

D'autres facteurs sécrétés par les adipocytes tels que l'adiponectine (Tsao et al, 2002) ou la résistine (Rajala et al, 2003) interviennent dans l'équilibre métabolique et à ce titre pourraient être étudiés chez les rats Lou/C.

#### *D'autres neurotransmetteurs et d'autres structures centrales pourraient être impliqués dans le particularisme de la balance énergétique du rat Lou/C.*

De nombreux neurotransmetteurs au niveau hypothalamique sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique et sont modulés par les signaux adipocytaires périphériques. La quantité de NPY, de galanine, d'orexine, de BDNF, du peptide Agouti, de la proopiomélanocortine, de la corticolibérine, de la thyrotropine-releasing hormone... ainsi que leurs récepteurs pourraient être étudiés afin de déterminer finement les interrelations entre ces molécules dans les différents noyaux hypothalamiques des rats Lou/C.

*De manière générale, le rat Lou/C est un **nouveau modèle** permettant de **discriminer les effets de l'âge, des effets de l'obésité***

Le non-développement d'une résistance à l'insuline au cours du vieillissement chez les rats Lou/C nous a permis de confirmer les études montrant que l'hyperinsulinémie observée au cours du vieillissement est liée à une augmentation de la masse adipeuse. Certains auteurs remettent en question les modèles de restriction alimentaire utilisés pour obtenir des animaux âgés non-obèses (Gabriely et al, 2002). L'étude du rat Lou/C pourrait servir à déterminer les effets propres du vieillissement des effets dus à l'installation de l'obésité dans de nombreux autres paramètres physiologiques sans avoir à stresser l'animal par une restriction calorique, un exercice prolongé ou une ablation du tissu adipeux.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adachi A, Kobashi M, Miyoshi N, Tsukamoto G.** Chemosensitive neurons in the area postrema of the rat and their possible functions. *Brain Res Bull.* 1991. 26: 137-140.
- Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS.** Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest.* 1997. 99: 391-395.
- Ahima RS.** Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Front Horm Res.* 2000. 26: 42-56.
- Ahima RS, Flier JS.** Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000. 62: 413-437.
- Ahren B, Veith RC, Taborsky GJ Jr.** Sympathetic nerve stimulation versus pancreatic norepinephrine infusion in the dog: 1). Effects on basal release of insulin and glucagon. *Endocrinology.* 1987. 121: 323-331.
- Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW.** Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr.* 2000. 71: 438-442.
- Alliot J, Boghossian S, Jourdan D, Veyrat-Durebex C, Pickering G, Meynial-Denis D, Gaumet N.** The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002. 57: B312-B320.
- Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB.** Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA.* 1999. 282: 1530-1538.
- Amenta F, Ricci A, Tayebati SK, Zaccheo D.** The peripheral dopaminergic system: morphological analysis, functional and clinical applications. *Ital J Anat Embryol.* 2002. 107: 145-167.
- Atgie C, Marette A, Desautels M, Tulp O, Bukowiecki LJ.** Specific decrease of mitochondrial thermogenic capacity in brown adipose tissue of obese SHR/N-cp rats. *Am J Physiol.* 1993. 265: C1674-C1680.
- Atgie C, D'Allaire F, Bukowiecki LJ.** Role of beta1- and beta3-adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. *Am J Physiol.* 1997. 273: C1136-C1142.
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ.** The stomach is a source of leptin. *Nature.* 1998. 20. 394: 790-793.
- Balkan B, Strubbe JH, Bruggink JE, Steffens AB.** Altered sympathetic control of nutrient mobilization during physical exercise after lesions in the VMH. *Am J Physiol.* 1991. 260: R368-R372.
- Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M.** An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res.* 1985. 331: 172-175.

- Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ.** Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol.* 1998. 275: R291-R299.
- Bamshad M, Song CK, Bartness TJ.** CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 1999. 276: R1569-1578.
- Baret G, Peyronnet J, Grassi-Kassisse D, Dalmaz Y, Wiernsperger N, Géoën A.** Increased intraabdominal adipose tissue mass in fructose fed rats: correction by metformin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2002. 110: 298-303.
- Bartness TJ et Bamshad M.** Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am J Physiol.* 1998. 275: R1399-R1411.
- Barzilai N, Rossetti L.** Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat. *Am J Physiol.* 1995. 269: E591-597.
- Barzilai N, She L, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J, Rossetti L.** Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes.* 1999. 48: 94-98.
- Barzilai N, Gabriely I.** The role of fat depletion in the biological benefits of caloric restriction. *J Nutr.* 2001 Mar;131: 903S-906S.
- Basdevant A.** Clinique des obésités de l'adulte. *Médecine/Sciences.* 1998. 14 :925-934.
- Bazin H.** The Louvain (Lou) rats. In : *Rat Hybridomas and rat Monoclonal Antibodies* ; Cleveland, OH : CRC Press ; 1990, p 43-45
- Bergen HT, Mizuno TM, Taylor J, Mobbs CV.** Hyperphagia and weight gain after gold-thioglucose: relation to hypothalamic neuropeptide Y and proopiomelanocortin. *Endocrinology.* 1998. 139: 4483-4488.
- Berthoud HR.** Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002. 26: 393-428
- Bianchini F, Kaaks R, Vainio H.** Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol.* 2002. 3: 565-574.
- Black BJ Jr, McMahan CA, Masoro EJ, Ikeno Y, Katz MS.** Senescent terminal weight loss in the male F344 rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003. 284: R336-342.
- Blanton CA, Horwitz BA, Murtagh-Mark C, Gietzen DW, Griffey SM, McDonald RB.** Meal patterns associated with the age-related decline in food intake in the Fischer 344 rat. *Am J Physiol.* 1998. 275: R1494-1502.
- Bliss M.** La découverte de l'insuline / Michael Bliss ; traduit de l'anglais par J. Chapdelaine Gagnon. Editeur Paris : Payot, 1988. p 402.
- Blouquit MF, Géoën A, Koubi H, Edwards D, Gripois D.** Decreased norepinephrine turnover rate in the brown adipose tissue of pre-obese fa/fa Zucker rats. *J Dev Physiol.* 1993. 19: 247-251.
- Boghossian S, Alliot J.** A moderate swimming exercise regularly performed throughout the life induces age and sex-related modifications in adaptive macronutrients choice. *Mech Ageing Dev.* 2000. 120: 95-109.

- Boghossian S, Nzang Nguema G, Jourdan D, Alliot J.** Old as mature LOU/c/jall rats enhance protein selection in response to a protein deprivation. *Exp Gerontol.* 2002. 37: 1431-1440.
- Borghini N, Dalmaz Y, Peyrin L.** Effect of guanethidine on dopamine in small intensely fluorescent cells of the superior cervical ganglion of the rat. *J Auton Nerv Syst.* 1991. 32: 13-19.
- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP.** Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 1997. 408: 39-42.
- Bray GA.** Obesity--a state of reduced sympathetic activity and normal or high adrenal activity (the autonomic and adrenal hypothesis revisited). *Int J Obes.* 1990. 3: 91-92.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR.** Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 2000. 289: 2122-2125.
- Buijs RM, Chun SJ, Nijijima A, Romijn HJ, Nagai K.** Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J Comp Neurol.* 2001. 19;431: 405-423.
- Caprio S, Tamborlane WV, Silver D, Robinson C, Leibel R, McCarthy S, Grozman A, Belous A, Maggs D, Sherwin RS.** Hyperleptinemia: an early sign of juvenile obesity. Relations to body fat depots and insulin concentrations. *Am J Physiol.* 1996. 271: E626-630.
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV.** Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 1996. 348: 159-161.
- Carulli L, Ferrari S, Bertolini M, Tagliafico E, Del Rio G.** Regulation of ob gene expression: evidence for epinephrine-induced suppression in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999. 84: 3309-3312.
- Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G.** Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J.* 2002. 16: 1163-1176.
- Cha MC, Jones PJ.** Dietary fat type and energy restriction interactively influence plasma leptin concentration in rats. *J Lipid Res.* 1998. 39: 1655-1660.
- Chinookoswong N, Wang JL, Shi ZQ.** Leptin restores euglycemia and normalizes glucose turnover in insulin-deficient diabetes in the rat. *Diabetes.* 1999. 48: 1487-1492.
- Chronwall BM.** Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides.* 1985. 6: 1-11.
- Chu CA, Sindelar DK, Neal DW, Allen EJ, Donahue EP, Cherrington AD.** Comparison of the direct and indirect effects of epinephrine on hepatic glucose production. *J Clin Invest.* 1997. 99: 1044-1056.
- Cincotta AH, Luo S, Zhang Y, Liang Y, Bina KG, Jetton TL, Scislawski PW.** Chronic infusion of norepinephrine into the VMH of normal rats induces the obese glucose-intolerant state. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000. 278: R435-R444.

- Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B.** A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998. 392: 398-401.
- Cohen B, Novick D, Rubinstein M.** Modulation of insulin activities by leptin. *Science*. 1996. 274: 1185-1188.
- Coleman DL.** Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. 1978. 14: 141-148.
- Collins LC, Hoberty PD, Walker JF, Fletcher EC, Peiris AN.** The effect of body fat distribution on pulmonary function tests. *Chest*. 1995. 107: 1298-1302.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al.** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996. 334: 292-295.
- Cousin B, Casteilla L, Lafontan M, Ambid L, Langin D, Berthault MF, Penicaud L.** Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology*. 1993. 133: 2255-2262.
- Couturier K, Servais S, Koubi H, Sempore B, Sornay-Mayet MH, Cottet-Emard JM, Lavoie JM, Favier R.** Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes Res*. 2002. 10: 188-195.
- Cransac H, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Peyrin L.** Monoamines (norepinephrine, dopamine, serotonin) in the rat medial vestibular nucleus: endogenous levels and turnover. *J Neural Transm*. 1996. 103: 391-401.
- Currie PJ.** Differential effects of NE, CLON, and 5-HT on feeding and macronutrient selection in genetically obese (ob/ob) and lean mice. *Brain Res Bull*. 1993. 32: 133-142.
- Currie PJ, Coiro CD, Niyomchai T, Lira A, Farahmand F.** Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002. 71: 709-716.
- D'Allaire F, Atgie C, Mauriege P, Simard PM, Bukowiecki LJ.** Characterization of beta 1- and beta 3-adrenoceptors in intact brown adipocytes of the rat. *Br J Pharmacol*. 1995 114: 275-282.
- Dalmaz Y, Pequignot JM, Cottet-Emard JM, Peyrin L.** Adrenal response to long-term hypoxia is still increased after carotid body denervation in rat. *J Appl Physiol*. 1994. 76: 1049-1054.
- Debons AF, Krinsky I, Maayan ML, Fani K, Jemenez FA.** Gold thioglucose obesity syndrome. *Fed Proc*. 1977. 36: 143-147.
- De Fanti BA, Gavel DA, Hamilton JS, Horwitz BA.** Extracellular hypothalamic serotonin levels after dorsal raphe nuclei stimulation of lean (Fa/Fa) and obese (fa/fa) Zucker rats. *Brain Res*. 2000. 869: 6-14.

- Defronzo RA.** Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. *Diabetes*. 1979. 28: 1095-1101.
- De Luca B, Monda M, Pellicano MP, Zenga A.** Cortical control of thermogenesis induced by lateral hypothalamic lesion and overeating. *Am J Physiol*. 1987. 253: R626-633.
- Depocas F and Hart HS.** Use of the Pauling analyzer for measurement of oxygen consumption of animal in open circuit system and in a shortlag closed circuit apparatus. 1957. *J Appl Physiol*. 10: 388-392.
- Desautels M, Dulos RA.** Effects of neonatal sympathectomy on brown fat development and susceptibility to high fat diet induced obesity in mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991. 69: 1868-1874.
- De Souza CJ, Hirshman MF, Horton ES.** CL-316,243, a beta3-specific adrenoceptor agonist, enhances insulin-stimulated glucose disposal in nonobese rats. *Diabetes*. 1997. 46: 1257-1263.
- Desoye G, Hartmann M, Blaschitz A, Dohr G, Hahn T, Kohlen G, Kaufmann P.** Insulin receptors in syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern. *Histochemistry*. 1994. 101: 277-285.
- De Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B.** Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*. 1995. 270: 15958-15961.
- Dodane V, Chevalier J, Bariety J, Pratz J, Corman B.** Longitudinal study of solute excretion and glomerular ultrastructure in an experimental model of aging rats free of kidney disease. *Lab Invest*. 1991. 64: 377-391.
- Doring H, Schwarzer K, Nuesslein-Hildesheim B, Schmidt I.** Leptin selectively increases energy expenditure of food-restricted lean mice. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998. 22: 838-838.
- Dube MG, Xu B, Kalra PS, Sninsky CA, Kalra SP.** Disruption in neuropeptide Y and leptin signaling in obese ventromedial hypothalamic-lesioned rats. *Brain Res*. 1999. 816: 38-46.
- Duffy PH, Feuers RJ, Leakey JA, Nakamura K, Turturro A, Hart RW.** Effect of chronic caloric restriction on physiological variables related to energy metabolism in the male Fischer 344 rat. *Mech Ageing Dev*. 1989. 48: 117-133.
- Dunbar JC, Hu Y, Lu H.** Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes*. 1997. 46: 2040-2043.
- Dib B, Rompre PP, Amir S, Shizgal P.** Thermogenesis in brown adipose tissue is activated by electrical stimulation of the rat dorsal raphe nucleus. *Brain Res*. 1994 . 650: 149-152.
- Elbers JM, Asscheman H, Seidell JC, Frolich M, Meinders AE, Gooren LJ.** Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997. 82: 3267-3270.
- Elmqvist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS.** Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci*. 1998. 1: 445-450.

**Emilsson V, Summers RJ, Hamilton S, Liu YL, Cawthorne MA.** The effects of the beta3-adrenoceptor agonist BRL 35135 on UCP isoform mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998. 252: 450-454.

**Even PC, Rolland V, Roseau S, Bouthegourd JC, Tome D.** Prediction of basal metabolism from organ size in the rat: relationship to strain, feeding, age, and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001. 280: R1887-1896.

**Faintrenie G, Gélœn A.** Alpha-1 adrenergic regulation of lactate production by white adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996. 277: 235-238.

**Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM.** Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. 94: 7001-7005.

**Felber JP, Golay A.** Pathways from obesity to diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002. 26: S39-45.

**Fernandes ML, Saad MJ, Velloso LA.** Effects of age on elements of insulin-signaling pathway in central nervous system of rats. *Endocrine.* 2001. 16: 227-234.

**Fernandez-Galaz C, Fernandez-Agullo T, Campoy F, Arribas C, Gallardo N, Andres A, Ros M, Carrascosa JM.** Decreased leptin uptake in hypothalamic nuclei with ageing in Wistar rats. *J Endocrinol.* 2001. 171: 23-32.

**Fernandez-Galaz MC, Diano S, Horvath TL, Garcia-Segura LM.** Leptin uptake by serotonergic neurones of the dorsal raphe. *J Neuroendocrinol.* 2002. 14: 429-434.

**Fetissov SO, Meguid MM, Sato T, Zhang LH.** Expression of dopaminergic receptors in the hypothalamus of lean and obese Zucker rats and food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002. 283: R905-910.

**Fink RI, Revers RR, Kolterman OG, Olefsky JM.** The metabolic clearance of insulin and the feedback inhibition of insulin secretion are altered with aging. *Diabetes.* 1985. 34: 275-280.

**Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL.** Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998. 22: 39-47.

**Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS.** Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med.* 1995. 1: 1311-1314.

**Fruhbeck G, Aguado M, Martinez JA.** In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. 24: 590-594.

**Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N.** Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes.* 2002. 51: 2951-2958.

**Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Rossetti L, Barzilai N.** Leptin resistance during aging is independent of fat mass. *Diabetes.* 2002. 51: 1016-1021.

- Gallagher D, Visser M, Sepulveda D, Pierson RN, Harris T, Heymsfield SB.** How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups? *Am J Epidemiol.* 1996. 143: 228-239.
- Gardemann A, Strulik H, Jungermann K.** Nervous control of glycogenolysis and blood flow in arterially and portally perfused liver. *Am J Physiol.* 1987. 253: E238-E245.
- Garofalo MA, Kettelhut IC, Roselino JE, Migliorini RH.** Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J Auton Nerv Syst.* 1996. 60: 206-208.
- Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, Reitman M.** Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997. 272: 30546-30551.
- Géloën A, Collet AJ, Guay G, Bukowiecki LJ.** Beta-adrenergic stimulation of brown adipocyte proliferation. *Am J Physiol.* 1988. 254: C175-C182.
- Géloën A, Collet AJ, Bukowiecki LJ.** Role of sympathetic innervation in brown adipocyte proliferation. *Am J Physiol.* 1992. 263: R1176-R1181.
- Glasow A, Bornstein SR.** Leptin and the adrenal gland. *Eur J Clin Invest.* 2000. 30: 39-45.
- Glick Z, Bray GA, Teague RJ.** Effect of prandial glucose on brown fat thermogenesis in rats: possible implications for dietary obesity. *J Nutr.* 1984. 114: 286-291.
- Gold RM.** Hypothalamic obesity: the myth of the ventromedial nucleus. *Science.* 1973. 182: 488-490.
- Gonzales-Pacheco DM, Buss WC, Koehler KM, Woodside WF, Alpert SS.** Energy restriction reduces metabolic rate in adult male Fisher-344 rats. *J Nutr.* 1993. 123: 90-97.
- Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR, Meier A, Thaete FL.** Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes.* 1999. 48: 839-847.
- Goodrick CL.** Effects of long-term voluntary wheel exercise on male and female Wistar rats. I. Longevity, body weight, and metabolic rate. *Gerontology.* 1980. 26: 22-33.
- Gordon CJ.** 1993. Metabolism. In temperature regulation in laboratory rodents (ed. Chapman and Hall), pp 47-60. Cambridge University Press.
- Gotoh M, Smythe GA, Iguchi A.** Relationship between hypothalamic noradrenergic activity and the sympathetic activity in interscapular brown adipose tissue after cold-swim stress in rats. *Life Sci.* 1992. 51: 1057-1063.
- Greenberg JA, Boozer CN.** Metabolic mass, metabolic rate, caloric restriction, and aging in male Fischer 344 rats. *Mech Ageing Dev.* 2000. 113: 37-48.
- Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG.** Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology.* 2002. 43: 239-246.
- Guillam MT, Dupraz P, Thorens B.** Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes.* 2000. 49: 1485-1491.

**Gumbiner B, Polonsky KS, Beltz WF, Wallace P, Brechtel G, Fink RI.** Effects of aging on insulin secretion. *Diabetes*. 1989. 38: 1549-1556.

**Hajnal A, Mark GP, Rada PV, Lenard L, Hoebel BG.** Norepinephrine microinjections in the hypothalamic paraventricular nucleus increase extracellular dopamine and decrease acetylcholine in the nucleus accumbens: relevance to feeding reinforcement. *J Neurochem*. 1997. 68: 667-174.

**Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995. 269: 543-546.

**Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM.** Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. 94:8878-8883.

**Halford JC, Blundell JE.** Pharmacology of appetite suppression. *Prog Drug Res*. 2000. 54: 25-58.

**Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M, Shimazu T.** Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes*. 1999. 48: 1706-1712.

**Hardie LJ, Rayner DV, Holmes S, Trayhurn P.** Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996. 223: 660-665.

**Hartmann H, Beckh K, Jungermann K.** Direct control of glycogen metabolism in the perfused rat liver by the sympathetic innervation. *Eur J Biochem*. 1982. 123: 521-526.

**Hastings JA, Wiesner G, Lambert G, Morris MJ, Head G, Esler M.** Influence of leptin on neurotransmitter overflow from the rat brain in vitro. *Regul Pept*. 2002. 103: 67-74.

**Hausberg M, Morgan DA, Chapleau MA, Sivitz WI, Mark AL, Haynes WG.** Differential modulation of leptin-induced sympathoexcitation by baroreflex activation. *J Hypertens*. 2002. 20: 1633-1641.

**Hay-Schmidt A, Helboe L, Larsen PJ.** Leptin receptor immunoreactivity is present in ascending serotonergic and catecholaminergic neurons of the rat. *Neuroendocrinology*. 2001. 73: 215-226.

**Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL.** Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension*. 1997. 30: 619-623.

**Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Sivitz WI, Mark AL.** Cardiovascular consequences of obesity: role of leptin. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998. 25: 65-69.

**Haynes WG.** Interaction between leptin and sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2000. 2: 311-318.

**Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, McCamish M.** Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA*. 1999. 282: 1568-1575.

**Himms-Hagen J.** Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989. 67: 394-401.

**Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG.** Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. 94: 11073-11078.

**Holloszy JO, Smith EK, Vining M, Adams S.** Effect of voluntary exercise on longevity of rats. *J Appl Physiol.* 1985. 59: 826-831.

**Honmura A, Yanase M, Saito H, Iguchi A.** Effect of intrahypothalamic injection of neostigmine on the secretion of epinephrine and norepinephrine and on plasma glucose level. *Endocrinology.* 1992. 130: 2997-3002.

**Houstek J, Tvrdek P, Pavelka S, Baudysova M.** Low content of mitochondrial ATPase in brown adipose tissue is the result of post-transcriptional regulation. *FEBS Lett.* 1991. 294: 191-194.

**Howe PR, Costa M, Furness JB, Chalmers JP.** Simultaneous demonstration of phenylethanolamine N-methyltransferase immunofluorescent and catecholamine fluorescent nerve cell bodies in the rat medulla oblongata. *Neuroscience.* 1980. 5: 2229-2238.

**Huang L, Wang Z, Li C.** Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem.* 2001. 276: 6343-6349.

**Hustvedt BE, Jeszka J, Christophersen A, Lovo A.** Energy metabolism in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Am J Physiol.* 1984. 246: E319-26.

**Hwa JJ, Fawzi AB, Graziano MP, Ghibaudi L, Williams P, Van Heek M, Davis H, Rudinski M, Sybertz E, Strader CD.** Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice. *Am J Physiol.* 1997. 272: R1204-1209.

**Ichikawa M, Fujita Y, Ebisawa H, Ozeki T.** Effects of long-term, light exercise under restricted feeding on age-related changes in physiological and metabolic variables in male Wistar rats. *Mech Ageing Dev.* 2000. 113: 23-35.

**Ichikawa M, Fujita Y.** Effects of nitrogen and energy metabolism on body weight in later life of male Wistar rats consuming a constant amount of food. *J Nutr.* 1987. 117: 1751-1758.

**Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G.** Energy intake and utilization vary during development in rats. *J Nutr.* 1999. 129: 1593-1596.

**Jacobs BL, Azmitia EC.** Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* 1992. 72: 165-229.

**Jacob RJ, Dziura J, Medwick MB, Leone P, Caprio S, During M, Shulman GI, Sherwin RS.** The effect of leptin is enhanced by microinjection into the ventromedial hypothalamus. *Diabetes.* 1997. 46: 150-152.

**Jenkins SC, Moxham J.** The effects of mild obesity on lung function. *Respir Med.* 1991. 85: 309-311.

**Jungermann K, Gardemann A, Beuers U, Balle C, Sannemann J, Beckh K, Hartmann H.** Regulation of liver metabolism by the hepatic nerves. *Adv Enzyme Regul.* 1987. 26: 63-88.

**Kahn BB, Flier JS.** Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000. 106: 473-481.

**Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS.** Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991. 88: 10931-10935.

**Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS.** Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 1999. 20: 68-100.

**Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ.** Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature.* 1997. 389: 374-377.

**Kern PA, Marshall S, Eckel RH.** Regulation of lipoprotein lipase in primary cultures of isolated human adipocytes. *J Clin Invest.* 1985. 75: 199-208.

**Kesterson RA, Huszar D, Lynch CA, Simerly RB, Cone RD.** Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome. *Mol Endocrinol.* 1997. 11: 630-637.

**Khachaturian H, Lewis ME, Alessi NE, Watson SJ.** Time of origin of opioid peptide-containing neurons in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1985. 236: 538-46.

**Kiefer LL, Veal JM, Mountjoy KG, Wilkison WO.** Melanocortin receptor binding determinants in the agouti protein. *Biochemistry.* 1998. 37: 991-997.

**Kieffer TJ, Habener JF.** The adipoinular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000. 278: E1-E14.

**Kielar D, Clark JS, Ciechanowicz A, Kurzawski G, Sulikowski T, Naruszewicz M.** Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue. *Metabolism.* 1998. 47: 844-847.

**Kirchgessner TG, Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS.** Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J Clin Invest.* 1997. 100: 2777-2782.

**Kyrkouli SE, Stanley BG, Seirafi RD, Leibowitz SF.** Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides.* 1990. 11: 995-1001.

**Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D.** The uncoupling protein UCP: a membrane mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int J Biochem.* 1991. 23: 791-801.

**Klimaschewski L, Kummer W, Heym C.** Localization, regulation and functions of neurotransmitters and neuromodulators in cervical sympathetic ganglia. *Microsc Res Tech.* 1996. 35: 44-68.

**Koenig SM.** Pulmonary complications of obesity. *J Med Sci.* 2001. 321: 249-279.

- Koopmans SJ, Frolich M, Gribnau EH, Westendorp RG, DeFronzo RA.** Effect of hyperinsulinemia on plasma leptin concentrations and food intake in rats. *Am J Physiol.* 1998. 274: E998-E1001.
- Kopelman PG.** Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000. 404: 635-643.
- Kopin IJ.** Plasma level of catecholamines and dopamine—hydroxylase. *Handbook of Experimental Pharmacology, Catecholamines II.* 1989. p 211-275.
- Kozak UC, Kozak LP.** Norepinephrine-dependent selection of brown adipocyte cell lines. *Endocrinology.* 1994.134: 906-913.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A.** Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* 1998. 19: 155-157.
- Kumer SC, Vrana KE.** Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem.* 1996. 67: 443-462.
- Kurosawa M, Unno T, Aikawa Y, Yoneda M.** Neural regulation of hepatic blood flow in rats: an in vivo study. *Neurosci Lett.* 2002. 321: 145-148.
- Laaban JP, Orvoen-Frija E, Cassuto D, Pascal S, Leger D, Basdevant A, Rochemaure J, Guy-Grand B.** Mechanisms of diurnal hypercapnia in sleep apnea syndromes associated with morbid obesity. *Presse Med.* 1996. 25: 12-16.
- Lachuer J, Buda M, Tappaz M.** Differential time course activation of the brain stem catecholaminergic groups following chronic adrenalectomy. *Neuroendocrinology.* 1992. 56: 125-132.
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM.** Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Res.* 2000. 871: 50-56.
- Lafontan M et Berlan M.** Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res.* 1993. 34: 1057-1091.
- Landsberg L, Saville ME, Young JB.** Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis. *Am J Physiol.* 1984. 247: E181-E189.
- Leclercq-Meyer V, Malaisse WJ.** Failure of human and mouse leptin to affect insulin, glucagon and somatostatin secretion by the perfused rat pancreas at physiological glucose concentration. *Mol Cell Endocrinol.* 1998. 141: 111-118.
- Leibowitz SF.** Hypothalamic paraventricular nucleus: interaction between alpha 2-noradrenergic system and circulating hormones and nutrients in relation to energy balance. *Neurosci Biobehav Rev.* 1988. 12: 101-109.
- Leibowitz SF, Alexander JT.** Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry.* 1998. 44: 851-864.
- Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, d'Amati G, Trimarco B.** Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes.* 2000. 49: 293-297.

- Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, Dani C.** Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem.* 1996. 271:2365-2368.
- Lever JD, Mukherjee S, Norman D, Symons D, Jung RT.** Neuropeptide and noradrenaline distributions in rat interscapular brown fat and in its intact and obstructed nerves of supply. *J Auton Nerv Syst.* 1988. 25: 15-25.
- Levine AS, Billington CJ.** Obesity: progress through genetic manipulation. *Curr Biol.* 1998. 8: R251-252.
- Levin BE, Sullivan AC.** Regulation of thermogenesis in obesity. *Int J Obes.* 1984. 1: 159-180.
- Levy JR, LeGall-Salmon E, Santos M, Pandak WM, Stevens W.** Effect of enteral versus parenteral nutrition on leptin gene expression and release into the circulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. 237: 98-102.
- Li H, Matheny M, Nicolson M, Tumer N, Scarpace PJ.** Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes.* 1997. 46: 2035-2039.
- Li H, Matheny M, Tumer N, Scarpace PJ.** Aging and fasting regulation of leptin and hypothalamic neuropeptide Y gene expression. *Am J Physiol.* 1998. 275: E405-411.
- Liang Y, Luo S, Cincotta AH.** Long-term infusion of norepinephrine plus serotonin into the ventromedial hypothalamus impairs pancreatic isletfunction. *Metabolism.* 1999. 48: 1287-1289.
- Lin YS, Nosaka S, Amakata Y, Maeda T.** Comparative study of the mammalian liver innervation: an immunohistochemical study of protein gene product 9.5, dopamine beta-hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1995. 110: 289-298.
- Liu X, Perusse F, Bukowiecki LJ.** Chronic norepinephrine infusion stimulates glucose uptake in white and brown adipose tissues. *Am J Physiol.* 1994. 266: R914-R920.
- Liu YL, Emilsson V, Cawthorne MA.** Leptin inhibits glycogen synthesis in the isolated soleus muscle of obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett.* 1997. 411: 351-355.
- Lonnqvist F, Wennlund A, Arner P.** Relationship between circulating leptin and peripheral fat distribution in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997. 21: 255-260.
- Luiten PG, ter Horst GJ, Steffens AB.** The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog Neurobiol.* 1987. 28: 1-54.
- Luo S, Luo J, Cincotta AH.** Chronic ventromedial hypothalamic infusion of norepinephrine and serotonin promotes insulin resistance and glucose intolerance. *Neuro Endocrinol.* 1999. 70: 460-465.
- Macaulay SL, Kelada AS, Proietto J.** Isoproterenol inhibits cyclic AMP-mediated but not insulin-mediated translocation of the GLUT4 glucose transporter isoform. *Mol Cell Biochem.* 1994. 141: 27-33.

- Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM.** Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. 92:6957-6960.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al.** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995. 1: 1155-1161.
- Marette A, Geloën A, Collet A, Bukowiecki LJ.** Defective metabolic effects of norepinephrine and insulin in obese Zucker rat brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 1990. 258: E320-E328.
- Mark AL, Correia ML, Rahmouni K, Haynes WG.** Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications. *J Hypertens.* 2002. 20: 1245-1250.
- Martorell R, Khan LK, Hughes ML, Grummer-Strawn LM.** Obesity in women from developing countries. *Eur J Clin Nutr.* 2000. 54: 247-252.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K.** Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med.* 1997. 3: 1029-1033.
- Matschinsky FM.** Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes.* 1990. 39: 647-652.
- Matsumoto AM, Marck BT, Gruenewald DA, Wolden-Hanson T, Naai MA.** Aging and the neuroendocrine regulation of reproduction and body weight. *Exp Gerontol.* 2000. 35: 1251-1265.
- Mattson MP, Duan W, Guo Z.** Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *J Neurochem.* 2003. 84: 417-31.
- McCarter RJ, Palmer J.** Energy metabolism and aging: a lifelong study of Fischer 344 rats. *Am J Physiol.* 1992. 263: E448-452.
- McDonald RB.** Effect of age and diet on glucose tolerance in Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 1990. 120: 598-601.
- Meguid MM, Fetisov SO, Blaha V, Yang ZJ.** Dopamine and serotonin VMN release is related to feeding status in obese and lean Zucker rats. *Neuroreport.* 2000. 11: 2069-2072.
- Meister B, Hokfelt T.** Peptide- and transmitter-containing neurons in the mediobasal hypothalamus and their relation to GABAergic systems: possible roles in control of prolactin and growth hormone secretion. *Synapse.* 1988. 2: 585-605.
- Meister B, Ceccatelli S, Hokfelt T, Anden NE, Anden M, Theodorsson E.** Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res.* 1989. 76: 343-368.

- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ, Trayhurn P.** Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 1996. 8: 733-735.
- Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A.** Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol.* 1993. 40: 711-769.
- Merry BJ.** Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002. 34: 1340-1354.
- Michalik L, Desvergne B et Wahli W.** Les bases moléculaires de l'obésité: vers de nouvelles cibles thérapeutiques? *Médecine/Sciences.* 2000. 16: 1030-1039.
- Miller MW, Duhl DM, Vrieling H, Cordes SP, Ollmann MM, Winkes BM, Barsh GS.** Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes Dev.* 1993. 7: 454-467.
- Minokoshi Y, Okano Y, Shimazu T.** Regulatory mechanism of the ventromedial hypothalamus in enhancing glucose uptake in skeletal muscles. *Brain Res.* 1994. 649: 343-347.
- Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH, Bowman BA, Marks JS, Koplan JP.** The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. *JAMA.* 1999. 282: 1519-1522.
- Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP.** The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA.* 2001. 286: 1195-1200.
- Monda M, Sullo A, De Luca B.** Lesions of the ventromedial hypothalamus reduce postingestional thermogenesis. *Physiol Behav.* 1997. 61: 687-691.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S.** Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 1997. 387: 903-908.
- Moore RY, Bloom FE.** Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci.* 1979. 2: 113-168.
- Moran TH, Katz LF, Plata-Salaman CR, Schwartz GJ.** Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *Am J Physiol.* 1998. 274: R6186-25.
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E.** Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology.* 1999. 140: 5995-5998.
- Moriame M, Beckers A, Bazin H.** Decrease in the incidence of malignant ileo-caecal immunocytoma in LOU/C rats after surgical removal of the ileo-caecal lymph nodes. *Cancer Lett.* 1977. 3: 139-143.
- Morton GJ, Schwartz MW.** The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001. 25: S56-62.
- Muller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G.** Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.* 1997. 272: 10585-10593.

**Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC, Woo SL.** Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. 93: 14804-14808.

**Newby FD, DiGirolamo M, Cotsonis GA, Kutner MH.** Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. *Am J Physiol.* 1990. 259: R1117-R1125.

**Nicholls DG, Locke RM.** Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.* 1984. 64: 1-64.

**Nielsen S, Guo Z, Albu JB, Klein S, O'Brien PC, Jensen MD.** Energy expenditure, sex, and endogenous fuel availability in humans. *J Clin Invest.* 2003. 111: 981-988.

**Nijjima A, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B.** Role of ventromedial hypothalamus on sympathetic efferents of brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 1984. 247: R650-654.

**Nisoli E, Tonello C, Memo M, Carruba MO.** Biochemical and functional identification of a novel dopamine receptor subtype in rat brown adipose tissue. Its role in modulating sympathetic stimulation-induced thermogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992. 263: 823-829.

**Nnodim JO et Lever JD.** Neural and vascular provisions of rat interscapular brown adipose tissue. *Am J Anat.* 1988. 182: 283-293.

**Nonogaki K.** New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia.* 2000. 43: 533-549.

**Nonogaki K.** Obesity: autonomic circuits versus feeding. *Nat Med.* 1999. 5: 742-743.

**Nonogaki K, Iguchi A.** Role of central neural mechanisms in the regulation of hepatic glucose metabolism. *Life Sci.* 1997. 60: 797-807.

**Nuseir K, Proudfit HK.** Bidirectional modulation of nociception by GABA neurons in the dorsolateral pontine tegmentum that tonically inhibit spinally projecting noradrenergic A7 neurons. *Neuroscience.* 2000. 96: 773-783.

**Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L.** Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci.* 2002. 5: 566-572.

**Okauchi N, Mizuno A, Zhu M, Ishida K, Sano T, Noma Y, Shima K.** Effects of obesity and inheritance on the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima fatty rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 1995. 29: 1-10.

**Oppert JM et Rolland-Cachera MF.** Prévalence, évolution dans le temps et conséquences économiques de l'obésité. *Médecine/Sciences.* 1998. 14: 939-943.

**Orosco M, Nicolaidis S.** Spontaneous feeding-related monoaminergic changes in the rostromedial hypothalamus revealed by microdialysis. *Physiol Behav.* 1992. 52: 1015-1019.

**Pacak K, McCarty R, Palkovits M, Cizza G, Kopin IJ, Goldstein DS, Chrousos GP.** Decreased central and peripheral catecholaminergic activation in obese Zucker rats. *Endocrinology.* 1995. 136: 4360-4367.

**Palkovits M.** Catecholamines in the hypothalamus: an anatomical review. *Neuroendocrinology*. 1981. 33: 123-128.

**Penicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L.** The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition*. 2000. 16: 903-908.

**Pequignot JM, Cottet-Emard JM, Dalmaz Y, Peyrin L.** Dopamine and norepinephrine dynamics in rat carotid body during long-term hypoxia. *J Auton Nerv Syst*. 1987. 21: 9-14.

**Peters A, Schweiger U, Fruhwald-Schultes B, Born J, Fehm HL.** The neuroendocrine control of glucose allocation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002. 110: 199-211.

**Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF.** Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet*. 1996. 13: 18-19.

**Poon TK, Cameron DP.** Measurement of oxygen consumption and locomotor activity in monosodium glutamate-induced obesity. *Am J Physiol*. 1978. 234: E532-534.

**Powley TL, Keesey RE.** Relationship of body weight to the lateral hypothalamic feeding syndrome. *J Comp Physiol Psychol*. 1970. 70: 25-36.

**Pradines-Figueres A, Vannier C, Ailhaud G.** Short-term stimulation by insulin of lipoprotein lipase secretion in adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988. 154: 982-990.

**Prunet-Marcassus B, Moulin K, Carmona MC, Villarroya F, Penicaud L, Casteilla L.** Inverse distribution of uncoupling proteins expression and oxidative capacity in mature adipocytes and stromal-vascular fractions of rat white and brown adipose tissues. *FEBS Lett*. 1999. 464: 184-188.

**Pugazhenti S, Khandelwal RL.** Regulation of glycogen synthase activation in isolated hepatocytes. *Mol Cell Biochem*. 1995. 149-150: 95-101.

**Quintela M, Senaris R, Heiman ML, Casanueva FF, Dieguez C.** Leptin inhibits in vitro hypothalamic somatostatin secretion and somatostatin mRNA levels. *Endocrinology*. 1997. 138: 5641-5644.

**Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L.** Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest*. 2003. 111: 225-230.

**Ravussin E, Lillioja S, Anderson TE, Christin L, Bogardus C.** Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. *J Clin Invest*. 1986. 78: 1568-1578.

**Rayner DV.** The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. *Pro Nutr Soc*. 2001. 60: 357-364.

**Reaven EP, Reaven GM.** Structure and function changes in the endocrine pancreas of aging rats with reference to the modulating effects of exercise and caloric restriction. *J Clin Invest*. 1981. 68: 75-84.

- Reaven GM, Moore J, Greenfield M.** Quantification of insulin secretion and in vivo insulin action in nonobese and moderately obese individuals with normal glucose tolerance. *Diabetes*. 1983. 32: 600-604.
- Rebuffe-Scrive M.** Neuroregulation of adipose tissue: molecular and hormonal mechanisms. *Int J Obes*. 1991. 2: 83-86.
- Rehmark S, Nechad M, Herron D, Cannon B, Nedergaard J.** Alpha- and beta-adrenergic induction of the expression of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes differentiated in culture. *J Biol Chem*. 1990. 265: 16464-16471.
- Rehorek A, Kerecsen L, Muller F.** Measurement of tissue catecholamines of obese rats by liquid chromatography and electrochemical detection. *Biomed Biochim Acta*. 1987. 46: 823-827.
- Rentsch J, Chiesi M.** Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 1996. 379: 55-59.
- Robinson SW, Dinulescu DM, Cone RD.** Genetic models of obesity and energy balance in the mouse. *Annu Rev Genet*. 2000;34: 687-745.
- Rohlf s EM, Daniel KW, Premont RT, Kozak LP, Collins S.** Regulation of the uncoupling protein gene (Ucp) by beta 1, beta 2, and beta 3-adrenergic receptor subtypes in immortalized brown adipose cell lines. *J Biol Chem*. 1995. 270: 10723-10732.
- Rosell S.** Release of free fatty acids from subcutaneous adipose tissue in dogs following sympathetic nerve stimulation. *Physiol Scand*. 1966. 67: 343-351.
- Rosenbaum M, Leibel RL.** The role of leptin in human physiology. *N Engl J Med*. 1999. 341: 913-915.
- Rothwell NJ, Stock MJ.** Effects of denervating brown adipose tissue on the responses to cold, hyperphagia and noradrenaline treatment in the rat. *J Physiol*. 1984. 355: 457-463.
- Saito M, Minokoshi Y, Shimazu T.** Accelerated norepinephrine turnover in peripheral tissues after ventromedial hypothalamic stimulation in rats. *Brain Res*. 1989. 481: 298-303.
- Sakaguchi T, Bray GA.** Effect of norepinephrine, serotonin and tryptophan on the firing rate of sympathetic nerves. *Brain Res*. 1989. 492: 271-280.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J.** Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 1995. 377: 527-529.
- Saladin R, Staels B, Auwerx J, Briggs M.** Regulation of ob gene expression in rodents and humans. *Horm Metab Res*. 1996. 28: 638-641.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Tsuji T, Hayase M, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Yoshimasa Y, Nakao K.** Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes*. 1999. 48: 1787-1793.
- Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Tumer N.** Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol*. 1997. 273: E226-230.
- Scarpace PJ, Matheny M, Moore RL, Tumer N.** Impaired leptin responsiveness in aged rats. *Diabetes*. 2000. 49: 431-435.

- Scarpance PJ, Matheny M, Tumer N.** Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats. *Neuroscience*. 2001. 104: 1111-1117.
- Schemmel R, Mickelsen O, Gill JL.** Dietary obesity in rats: Body weight and body fat accretion in seven strains of rats. *J Nutr*. 1970. 100: 1041-1048.
- Scheurink AJ, Steffens AB, Gaykema RP.** Hypothalamic adrenoceptors mediate sympathoadrenal activity in exercising rats. *Am J Physiol*. 1990. 259: R470-477.
- Scheurink AJ, Steffens AB, Gaykema RP.** Paraventricular hypothalamic adrenoceptors and energy metabolism in exercising rats. *J Physiol*. 1990. 259: R478-R484.
- Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB.** Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000. 24: 855-872.
- Schwartz DH, Hernandez L, Hoebel BG.** Serotonin release in lateral and medial hypothalamus during feeding and its anticipation. *Brain Res Bull*. 1990. 25: 797-802.
- Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al.** Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*. 1992. 130: 3608-3616.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG.** Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 1996. 98: 1101-1106.
- Schwartz MW, Prigeon RL, Kahn SE, Nicolson M, Moore J, Morawiecki A, Boyko EJ, Porte D Jr.** Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms. *Diabetes Care*. 1997. 20: 1476-1481.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG.** Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000. 404: 661-671.
- Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI.** Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989. 86: 114-118.
- Seydoux J, Rohner-Jeanrenaud F, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B, Girardier L.** Functional disconnection of brown adipose tissue in hypothalamic obesity in rats. *Pflugers Arch*. 1981. 390: 1-4.
- Seydoux J, Benzi RH, Shibata M, Girardier L.** Underlying mechanisms of atrophic state of brown adipose tissue in obese Zucker rats. *Am J Physiol*. 1990. 259:R61-R69.
- Shek EW, Brands MW, Hall JE.** Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension*. 1998. 31: 409-414.
- Shek EW, Scarpance PJ.** Resistance to the anorexic and thermogenic effects of centrally administered leptin in obese aged rats. *Regul Pept*. 2000. 92: 65-71.
- Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB.** Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem*. 1993. 268: 22243-2246.

- Shibata H, Bukowiecki LJ.** Regulatory alterations of daily energy expenditure induced by fasting or overfeeding in unrestrained rats. *J Appl Physiol.* 1987. 63: 465-470.
- Shimizu Y, Kielar D, Minokoshi Y, Shimazu T.** Noradrenaline increases glucose transport into brown adipocytes in culture by a mechanism different from that of insulin. *Biochem J.* 1996. 314: 485-490.
- Shimizu H, Ohtani K, Tsuchiya T, Takahashi H, Uehara Y, Sato N, Mori M.** Leptin stimulates insulin secretion and synthesis in HIT-T 15 cells. *Peptides.* 1997. 18: 1263-1266.
- Shimizu H, Shimomura Y, Hayashi R, Ohtani K, Sato N, Futawatari T, Mori M.** Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997. 21: 536-541.
- Shima K, Shi K, Sano T, Iwami T, Mizuno A, Noma Y.** Is exercise training effective in preventing diabetes mellitus in the Otsuka-Long-Evans-Tokushima fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus? *Metabolism.* 1993. 42: 971-977.
- Shimazu T, Fukuda A, Ban T.** Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature.* 1966. 210: 1178-1179.
- Shimazu T, Ishikawa K.** Modulation by the hypothalamus of glucagon and insulin secretion in rabbits: studies with electrical and chemical stimulations. *Endocrinology.* 1981. 108: 605-611.
- Shimazu T, Noma M, Saito M.** Chronic infusion of norepinephrine into the ventromedial hypothalamus induces obesity in rats. *Brain Res.* 1986. 369: 215-23.
- Shimazu T.** Innervation of the liver and glucoregulation: roles of the hypothalamus and autonomic nerves. *Nutrition.* 1996. 12: 65-66.
- Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J, Meier CA.** Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest.* 1997. 100: 2858-2864.
- Sivitz WI, Walsh SA, Morgan DA, Thomas MJ, Haynes WG.** Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology.* 1997. 138: 3395-3401.
- Smythe GA, Pascoe WS, Storlien LH.** Hypothalamic noradrenergic and sympathoadrenal control of glycemia after stress. *Am J Physiol.* 1989. 256: E231-235.
- Stamler R, Stamler J, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH.** Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans. *JAMA.* 1978. 240: 1607-1610.
- Stanley BG, Leibowitz SF.** Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985. 82: 3940-3943.
- Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, et al.** The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature.* 1995. 377: 530-532.
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD.** A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet.* 1998. 18: 213-215.

**Swoap SJ.** Altered leptin signaling is sufficient, but not required, for hypotension associated with caloric restriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001. 281: H2473-479.

**Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y.** Effects of ventromedial hypothalamus stimulation on glycogenolysis in rat liver using in vivo microdialysis. *Metabolism.* 1997. 46: 897-901.

**Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G.** Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002. 111: 305-317.

**Tanaka K, Shimada M, Nakao K, Kusunoki T.** Hypothalamic lesion induced by injection of monosodium glutamate in suckling period and subsequent development of obesity. *Exp Neurol.* 1978. 62: 191-199.

**Thompson MP.** Meal-feeding specifically induces obese mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996. 224: 332-337.

**Thompson D, Edelsberg J, Colditz GA, Bird AP, Oster G.** Lifetime health and economic consequences of obesity. *Arch Intern Med.* 1999. 159: 2177-2183.

**Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA.** Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology.* 1997. 138: 5063-5066.

**Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV.** Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J.* 1995. 311: 729-733.

**Tsao TS, Lodish HF, Fruebis J.** ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur J Pharmacol.* 2002. 440: 213-221.

**Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR Jr.** Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest.* 1997. 99: 385-390.

**Veyrat-Durebex C, Alliot J.** Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol Behav.* 1997. 62: 1273-1278.

**Veyrat-Durebex C, Boghossian S, Alliot J.** Age-related changes in adaptive mechanisms of macronutrient self-selection: evidence for a sexual dimorphism. *Mech Ageing Dev.* 1998. 103: 223-234.

**Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L.** A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature.* 1998. 393: 684-688.

**Wang JL, Chinookoswong N, Scully S, Qi M, Shi ZQ.** Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization in vivo. *Endocrinology.* 1999. 140: 2117-2124.

**Weiss GF, Rogacki N, Fueg A, Buchen D, Leibowitz SF.** Impact of hypothalamic d-norfenfluramine and peripheral d-fenfluramine injection on macronutrient intake in the rat. *Brain Res Bull.* 1990. 25: 849-859.

- Wellman PJ, Davies BT.** Suppression of feeding induced by phenylephrine microinjections within the paraventricular hypothalamus in rats. *Appetite*. 1991. 17: 121-128.
- Wellman PJ.** Norepinephrine and the control of food intake. *Nutrition*. 2000. 16: 837-842.
- White CR, Seymour RS.** Mammalian basal metabolic rate is proportional to body mass<sup>2/3</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100: 4046-4049.
- Whittaker J, Sorensen H, Gadsboll VL, Hinrichsen J.** Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor. *J Biol Chem*. 2002. 277: 47380-47384.
- Williams LM, Adam CL, Mercer JG, Moar KM, Slater D, Hunter L, Findlay PA, Hoggard N.** Leptin receptor and neuropeptide Y gene expression in the sheep brain. *J Neuroendocrinol*. 1999. 11: 165-169.
- Williamson DF, Pamuk E, Thun M, Flanders D, Byers T, Heath C.** Prospective study of intentional weight loss and mortality in overweight white men aged 40-64 years. *Am J Epidemiol*. 1999. 149: 491-503.
- Willoughby JO, Blessing WW.** Links Origin of serotonin innervation of the arcuate and ventromedial hypothalamic region. *Brain Res*. 1987. 418: 170-173.
- Wilson CA, Bekele G, Nicolson M, Ravussin E, Pratley RE.** Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin. *Br J Haematol*. 1997. 99: 447-451.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr.** Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*. 1979. 282: 503-505.
- Wu-Peng XS, Chua SC Jr, Okada N, Liu SM, Nicolson M, Leibel RL.** Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (Lepr): evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat. *Diabetes*. 1997. 46: 513-518.
- Xu B, Kalra PS, Farmerie WG, Kalra SP.** Daily changes in hypothalamic gene expression of neuropeptide Y, galanin, proopiomelanocortin, and adipocyte leptin gene expression and secretion: effects of food restriction. *Endocrinology*. 1999. 140: 2868-2875.
- Yanovski SZ, Yanovski JA.** Obesity. *N Engl J Med*. 2002. 346: 591-602.
- Yoshida T, Nishioka H, Nakamura Y, Kondo M.** Reduced norepinephrine turnover in mice with monosodium glutamate-induced obesity. *Metabolism*. 1984. 33: 1060-1063.
- Yoshimatsu H, Egawa M, Bray GA.** Sympathetic nerve activity after discrete hypothalamic injections of L-glutamate. *Brain Res*. 1993. 601: 121-128.
- York DA, Marchington D, Holt SJ, Allars J.** Regulation of sympathetic activity in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Am J Physiol*. 1985. 249: E299-E305.

**Yoshimatsu H, Nijima A, Oomura Y, Katafuchi T.** Lateral and ventromedial hypothalamic influences on hepatic autonomic nerve activity in the rat. *Brain Res Bull.* 1988. 21: 239-244.

**Youngstrom TG, Bartness TJ.** Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am J Physiol.* 1995. 268: R744-R751.

**Youngstrom TG et Bartness TJ.** White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increases fat pad mass and fat cell number. *Am J Physiol.* 1998. 275: R1488-R1493.

**Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994. 372: 425-432.

**Zheng D, Jones JP, Usala SJ, Dohm GL.** Differential expression of ob mRNA in rat adipose tissues in response to insulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996. 218: 434-437.

**Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N.** Nutritional control of aging. *Exp Gerontol.* 2003. 38:47-52.

**Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman, MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB.** Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med.* 2000. 6: 924-928.

## **Characterisation of energy balance and its central and peripheral monoaminergic control in an obesity-resistant rat (Lou/C rat)**

The Lou/C rat is presented both as an obesity-resistant rat with a low fat accumulation and as a model of healthy ageing. To characterise the mechanisms underlying obesity resistance in this strain, we measured adiposity, food intake and energy expenditure by indirect calorimetry at 1, 6, 12, 18, and 24 months of age in comparison with Wistar rat. The role of brain monoamines in the different energy balance of Lou/C rats was evaluated by assessing the monoamine contents and the activity of rate-limiting enzymes in monoamine biosynthesis, in brainstem noradrenergic and serotonergic cell groups and in two hypothalamic nuclei. The sympathetic nerve activity was measured in target organs storing fuel substrates or implicated in energy expenditure. Moreover, plasma insulin and leptin concentrations two hormones providing rewards of energy stores to brain were determined throughout life span in Wistar and Lou/C rats. At each age, compared to Wistar rats, Lou/C rats presented a lesser food intake and exhibited higher energy expenditure at 6 and 12 months of age. The Lou/C rats exhibit an enhanced sympathetic outflow restricted to the white and brown adipose tissue, associated with a reduced noradrenergic pattern in brainstem and hypothalamic areas involved in energy balance regulation. From the age of 6 months, the plasma leptin concentrations in Wistar rats were higher than in Lou/C rats of the same age. Plasma insulin concentration increased markedly in elderly Wistar rats, but in contrast remained stable during ageing in Lou/C rats. Lou/C rats did not develop insulin resistance as confirmed by the hyperinsulinemic-euglycemic clamp.

The sympathetic nervous system and the brain monoamines seem to be involved in the particular energy balance exhibited by the Lou/C rat. Lou/C rats display a healthy ageing considering fat accretion, leptin and insulin resistance.

---

## RÉSUMÉ

Le rat Lou/C ne développe pas d'obésité et est présenté comme un modèle de vieillissement sain. Afin de caractériser la balance énergétique de ces rats, leur adiposité, leur prise alimentaire ainsi que leur dépense énergétique ont été mesurées à 1, 6, 12, 18 et 24 mois en comparaison avec des rats Wistar. Le rôle des monoamines centrales dans la balance énergétique particulière des rats Lou/C a été évalué en mesurant les contenus en monoamines et l'activité des enzymes limitantes de leur synthèse dans les noyaux bulbo-pontiques noradrénergiques, sérotoninergiques et dans les noyaux hypothalamiques. L'activité sympathique a été mesurée dans les tissus périphériques impliqués dans la mise en réserve et la dépense énergétique. Les concentrations plasmatiques de leptine et d'insuline, deux hormones informant les centres de l'état des réserves énergétiques, ont été déterminées au cours du vieillissement chez les deux souches.

Le rat Lou/C présente à tous les âges une prise alimentaire inférieure au rat Wistar et une dépense énergétique supérieure à 6 et 12 mois. Les rats Lou/C ont une activité sympathique spécifiquement augmentée dans les tissus adipeux blancs et brun associée à une diminution du profil catécholaminergique central dans certaines structures bulbo-pontiques et dans les noyaux hypothalamiques régulant la balance énergétique. Dès 6 mois, la leptinémie des rats Wistar est supérieure à celle des rats Lou/C. L'insulinémie augmente fortement chez les rats Wistar âgés, alors qu'elle reste stable au cours du vieillissement chez les rats Lou/C. L'absence de résistance à l'insuline chez les rats Lou/C est confirmée par le test euglycémique-hyperinsulinique.

Ainsi, le système nerveux sympathique et le contrôle monoaminergique central sont impliquées dans le déterminisme énergétique du rat Lou/C et cette souche est un modèle de vieillissement sain au regard de sa balance énergétique, de son adiposité, de la résistance à la leptine et à l'insuline.

---

## THÈSE DE PHYSIOLOGIE

### *MOTS-CLÉS :*

**obésité, vieillissement, dépense énergétique, prise alimentaire, tissus adipeux, noyaux hypothalamiques, noradrénaline, sérotonine, leptine, insuline.**

Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, UMR-CNRS 5123, Université Claude Bernard, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France.