

UNIVERSITE DROIT ET SANTE DE LILLE II

Ecole Doctorale Biologie – Santé

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Spécialité: Neurosciences

**Altérations périphériques et centrales dans un
modèle murin de restriction alimentaire chronique :
rôle de la ghréline**

Présentée et soutenue publiquement par

Mathieu MEQUINION

Devant le jury ci-dessous :

Président :

Pr Luc Pénicaud, Directeur de Recherche CNRS, UMR1324, Dijon.

Rapporteurs :

Pr Bruno Estour, Professeur Univ.-Praticien Hosp. CHU - Hôpital Nord, Saint Etienne

Dr Virginie Tolle, Chargé de Recherche Inserm, UMR894, Paris.

Examineurs :

Dr Serge Luquet, Chargé de Recherche CNRS, UMR8251 Paris

Pr Christophe Breton, Lille-1/EA4489, Villeneuve d'Ascq

Dr Vincent Prévot, Directeur de Recherche Inserm, Inserm UMR837, Lille

Directeur et co-directeur de thèse

Dr Odile Viltart, Maître de conférences, Lille-1/Inserm UMR837, Lille

Dr Christophe Chauveau, Maître de conférences, Ulco/EA4490, Boulogne-sur-Mer

Table des matières

Remerciements	4
Listes des figures et tableaux	6
Listes des abréviations	9
Introduction bibliographiques	11
Préambule	12
I. Homéostasie énergétique et prise alimentaire	14
1.1. Assimilation et utilisation des substrats énergétiques	15
1.1.1. Sélection des aliments	15
1.1.2. Digestion et stockage	16
1.1.3. Dépenses énergétiques	20
a) Métabolisme de base	20
b) Digestion	20
c) Thermorégulation	21
d) Activité physique	21
1.2. Evaluation du métabolisme énergétique	22
1.2.1. Calorimétrie directe et indirecte	22
a) Historique	22
b) Définitions	23
c) Calorimétrie indirecte	24
1.3. Régulation de la prise alimentaire	27
1.3.1. Régulation homéostatique de la prise alimentaire	29
a) Le noyau arqué (ARC)	30
b) Le noyau paraventriculaire (PVN)	32
c) L'aire hypothalamique latérale (LHA)	34
d) Le noyau dorsomédian (DMN)	35
e) Le noyau ventromédian (VMN)	36
1.3.2. Régulation homéostatique de la prise alimentaire : hormones périphériques	37
a) Signaux gastro-intestinaux	37
b) Signaux pancréatiques	43
c) Adipocytokines	45
d) Nutriments :	50
e) Autres signaux	52
f) Accès des signaux périphériques dans le SNC	54
1.3.3. Régulation non homéostatique de la prise alimentaire	56
a) Aire tegmentale ventrale (VTA)	56
b) Noyau accumbens	58
II. Dérégulation de la prise alimentaire : cas de l'anorexie mentale et apports des modèles animaux	60
2.1. L'anorexie mentale	61
2.1.1. Critères de diagnostic	61
2.1.2. Données épidémiologiques et mortalité	63
2.1.3. Anorexie mentale : un comportement addictif?	64
2.1.4. Altérations endocriniennes et métaboliques	64
2.1.5. Altérations du métabolisme énergétique	70
2.1.6. Perturbations centrales	71
2.2. Modèles animaux	73
2.2.1. Modèles génétiques	73
2.2.2. Modèles environnementaux	76

a) Restriction alimentaire	76
b) Modèles de stress	77
c) Modèles d'activité physique	77
Objectifs	82
Chapitre 1 Caractérisation du phénotype d'un modèle "Activity-based Anorexia" modifié : Impact de l'activité Physique	82
I. Introduction	84
II. Activité physique : avantage ou désavantage dans les adaptations métaboliques dans un modèle murin de restriction alimentaire chronique ?	86
III. Résultats complémentaires : phase de récupération après un déficit énergétique sévère sur le long terme	102
3.1. Récupération du poids corporel et de la fonction reproductrice	102
3.2. Récupération des altérations tissulaires et endocriniennes	104
3.3. Discussion générale	107
Chapitre 2 Altérations centrales induites à court terme dans un modèle murin de restriction alimentaire chronique : implication de la ghréline	110
I. Introduction	111
II. Procédures expérimentales	113
2.1. Animaux	113
2.2. Protocoles expérimentaux	113
2.2.1. Expérience 1 : impact de la ghréline sur l'axe somatotrope	114
2.2.2. Expérience 2 : impact de la ghréline au niveau central	115
2.3. Dosages sanguins	116
2.4. Mesure de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel	116
2.5. Dosage des monoamines et leurs métabolites par HPLC	117
2.6. Immunohistochimie et observation microscopique.	118
2.7. Représentations graphiques et analyses statistiques	118
III. Résultats	120
3.1. Expérience 1 : Impact de la ghréline sur l'axe somatotrope	120
3.1.1. Variation des concentrations plasmatiques de la ghréline au cours de la journée	120
3.1.2. Impact du protocole sur l'axe somatotrope : sécrétion de GH et d'IGF-1	121
3.1.3. Impact sur la glycémie	124
3.1.4. Effet de la ghréline sur la sécrétion de GH et sur la glycémie	124
a) Sécrétion de GH	124
b) Glycémie	126
3.1.5. Conclusion/discussion	127
3.2. Expérience 2 : impact de la ghréline au niveau central	130
3.2.1. Impact du protocole court terme sur les peptides orexigènes/anorexigènes de l'hypothalamus	130
3.2.2. Altérations dopaminergiques et sérotoninergiques	134
3.2.3. Effet de la ghréline sur la prise alimentaire et l'activation centrale	136
a) Prise alimentaire	136
b) Activation centrale	137
3.1.4. Conclusion/discussion	138
Discussion générales et perspectives	143
Références bibliographiques	151
Annexes	190

Remerciements

J'exprime mes plus sincères remerciements au Docteur Virginie Tolle et au Professeur Bruno Estour d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je souhaite également les remercier de la patience dont ils ont fait preuve.

J'exprime aussi mes profonds remerciements aux examinateurs de mon travail de thèse : le Professeur Christophe Breton, le Docteur Serge Luquet et le Professeur Luc Pénicaud d'avoir accepté d'apporter leur regard sur cette thèse

Je remercie les membres de mon Comité de suivi de thèse, les docteurs Virginie Tolle et Serge Luquet qui m'ont suivi et conseillé durant ces trois ans de thèse.

Je voudrai également remercier le Docteur Vincent Prévot pour sa participation à mon jury de thèse et surtout de m'avoir accueilli pendant ces quatre dernières années dans son laboratoire.

J'exprime ma plus sincère et ma plus profonde gratitude aux Docteurs Odile Viltart et Christophe Chauveau qui m'ont encadré, conseillé et soutenu durant ces quatre années durant lesquelles j'ai eu la chance de travailler avec eux. Grâce à votre soutien, je suis arrivé au terme de ma thèse. Finalement, quatre ans ça passe décidément très vite et durant toutes ces années vous à toujours été là pour m'encourager et m'aider.

Il y a de très nombreuses personnes que je souhaite également remercier et j'espère n'oublier personne.

J'exprime mes remerciements dans un premier temps aux personnes avec qui j'ai travaillé durant ma thèse.

J'exprime toute ma gratitude au Docteur Carole Rovère et son étudiante Ophélia ainsi qu'aux Docteurs Nicolas Chartrel et David Alexandre (je suis bien conscient qu'à chaque fois que je vous ai contacté c'était plus pour vous embêter que demander de vos nouvelles). Mes remerciements aussi au Docteur Philippe Zizzari (je sais, tu as beaucoup détesté mes myriades de tubes parfois mals annotés)

Je remercie le Docteur Stéphanie Lucas avec qui j'ai eu un énorme plaisir à travailler mais aussi pour tes conseils professionnel et personnel (tu vas me faire regretter de ne plus venir à Boulogne même si j'étais moins présent qu'au début).

Mes remerciements vont aussi au Docteur Emilie Caron que j'ai embêté plus d'une fois pour mes souris mais aussi pour m'avoir initié à la calorimétrie au point d'apprécier énormément ça (je te souhaite un bon courage et gare aux fuites, tu comprendras).

Je remercie également Aliçia Stievenard qui a toujours été là pour m'aider. Ton aide m'aura été très précieuse et j'espère t'aider autant en retour que tu as pu le faire pour moi (je sais, je ne pourrai pas remplacer ton étudiante Erasmus que tu as fait participer à mes derniers sacrifices). Bon courage pour la suite de ta thèse, je pense que tu en auras besoin. Je profite par la même occasion de dire un grand merci au Docteur Christel Vanbesien à qui je dois également une profonde reconnaissance, car elle t'a toujours donné le feu vert pour m'aider. Je veux aussi la remercier pour tous les TE que nous avons faits ensemble et qui m'ont beaucoup appris.

Je remercie également les membres du labo:

- à Irene Cimino et Gustav Colldén, j'ai adoré passer ces trois années de thèse avec vous, comme tu le dis Irene le trio poubelle ; je n'oublierai pas le bon weekend passé en Normandie.
- les italiens: Andrea (j'ai beaucoup squatté ton canapé pour dormir, j'ai sûrement testé tous les endroits où tu as emménagé sur Lille) mais aussi à Filippo et Paolo pour leurs regards bienveillants; je

n'aurai pas retenu beaucoup de choses de vos conversations en italien dans le bureau mis à part quelques mots agréables pour voyager en Italie ^^

- le trio des filles: oui, je pense à vous Charlotte (la nouvelle qui est arrivée après moi), Sarah (que j'avais croisé furtivement avant qu'elle ne fasse son retour) et enfin Nadia (je ne serai plus là pour te proposer un coup de main avec pour les papiers de l'Ecole doctorale)

- merci à Anne (ça m'a toujours fait plaisir de discuter avec vous le matin en arrivant) et Danièle qui sont réellement indispensables au labo- les nouveaux que je n'aurai vu que très peu : Sam, Giuliana, Manon.

- un grand merci également aux Docteurs Bénédicte Dehouck et Ariane Sharif pour leur soutien, toujours là pour aider dès qu'elles le peuvent.

- ceux qui n'ont fait que passer plus brièvement: Julien, Rémi, Aude, Hélène, Romain, (aussi la petite Sophie et Guillaume arrivés avant moi au labo et avec qui j'ai été content de partager les galères du M2) sans oublier Naresh et JP (mon meilleur cuisinier indien, j'espère que l'on pourra se revoir), Ida et Niki sans oublier la petite Anne (toujours prête à rendre service).

- remerciement spécial à Fanny (je pense que tu as anticipé la lecture que j'ai faite de ta thèse, tu as bien aimé embêter le petit nouveau que j'étais quand je suis arrivé. Je ne sais pas si j'arriverai à passer des soirées d'Halloween aussi amusantes que celles que l'on a passées tous ensemble).

Je n'oublie pas non plus les gens que j'ai parfois la chance de revoir en congrès : Sophie S, Sophie C et Eglantine.

Je remercie aussi le Professeur Pierre Hardouin pour son accueil au sein du laboratoire PMOI (si j'avais eu plus de temps, j'aurais souhaiter continuer à travailler un peu plus dans votre laboratoire et compléter un peu plus mes connaissances sur l'os); je n'oublie pas de dire un gros merci aux personnes avec qui j'ai travaillé, discuté et rit: Damien, Stéphanie, Séverine (toujours à courir à droite, à gauche; prends le temps de souffler), Flore (bon courage avec ta grande famille), Anne, Céline, Aline, Odile B, Olfa, Marie France et aussi aux membres de l'UMT : Irina, Philippe, Perrine, Sylvain et à ceux que j'oublie de nommer. Je garde une pensée pour le PMOI de Lille entre autre au Professeur Guillaume Penel, au Professeur Bernard Cortet (merci pour vos conseils avisés et votre point de vue sur mon premier article original), au Docteur Isabelle Legroux, Odile O, Guillaume F

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des membres de l'équipe 6 : Aliçia, Aurore, Amélie, Diana, Christel, Karim, Pierre, Thomas, Marie-Christine (et ceux que j'oublie) chez qui j'ai beaucoup squatté ces derniers temps et qui m'ont toujours accueilli chaleureusement malgré le peu de place que vous avez.

Je n'oublie pas les membres de l'animalerie: Delphine T., Mélanie, Ludovic, Romain, Delphine C, Ingrid, Julien, Yann et Christian qui m'ont beaucoup appris, je ne compte plus le nombre de fois où je vous ai dérangé parfois pour pas grand chose.

Un grand merci à toute l'équipe du secrétariat qui a toujours répondu quand j'avais besoin de quelque chose: Céline (je vous rassure, ce n'est pas moi qui ai causé toutes les fuites d'eau que l'on a épongé), Nathalie (que j'ai beaucoup embêté pour tous les colis que j'ai envoyés), Sophie (je sais, je ne suis pas le meilleur pour organiser le départ en congrès de toute l'équipe 2) mais aussi Michèle et Staëlle.

Je n'oublie pas non plus les gens qui lorsqu'ils ne sont pas présents font sentir qu'ils sont indispensables pour faire tourner le centre: Thomas, Karim, Renaud et Christine.

Une pensée à ceux que j'ai oublié, j'espère qu'ils ne m'en voudront pas d'avoir oublié de les citer.

Listes des figures et des tableaux

Introduction bibliographique

Figure 1. Réaction de l'organisme au stress : de la réaction d'alarme à la mort par épuisement.

Figure 2. Résumé des processus physiques et chimiques qui se produisent dans le tractus gastro-intestinal.

Figure 3. Représentation schématique des différentes hormones intestinales impliquées dans les processus de digestion

Figure 4. Schéma récapitulant les différentes voies de stockage de l'énergie après un repas.

Figure 5. Voies métaboliques majeures de la phase absorptive

Figure 6. Différents composants du budget énergétique total.

Figure 7. Découpage de l'énergie brute de la nourriture.

Figure 8 Interrelation entre les systèmes homéostatiques et non homéostatique centraux et les signaux périphériques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.

Figure 9 Localisation des principaux noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle homéostatique de la prise alimentaire

Figure 10. Cibles centrales de la ghréline dans la régulation du comportement alimentaire.

Figure 11 Organisation du gène de la ghréline/obestatine, de son transcrit et de la préproghréline.

Figure 12 Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance

Figure 13 Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes.

Figure 14 Influence des signaux périphériques provenant du tractus gastro-intestinal, des tissus adipeux et du pancréas sur les circuits centraux

Figure 15 Localisation des différents organes circumventriculaires

Figure 16 Circuit méso-cortico-limbique de la récompense.

Figure 17 : Projections topographiques des neurones dopaminergiques du mésencéphale sur le striatum ventral.

Tableau 1 Facteurs calorifiques des glucides

Tableau 2. Analyse de l'oxydation des mélanges de glucides et de lipides

Tableau 3 Effet de la GH endogène hypophysaire sur le métabolisme énergétique

Tableau 4 Action de la leptine sur les organes périphériques

Tableau 5 Adipokines et leurs effets métaboliques

Tableau 6 Actions métaboliques de l'IGF-1

Tableau 7 Gènes sensibles aux glucocorticoïdes et impliqués directement ou indirectement dans les voies métaboliques

Tableau 8 Principales altérations endocriniennes centrales. Comparaison entre des patients anorexiques (AM) et des sujets contrôles (CT)

Tableau 9 Principales altérations des hormones périphériques régulant la prise alimentaire. Comparaison entre des patients anorexiques (AM) et des sujets contrôles (CT)

Tableau 10 Synthèse de l'apport des modèles existants

Chapitre I

Figure 1. Study design for the short- and long-term protocols.

Figure 2. Effect of food restriction associated or not with activity (wheel running).

Figure 3. Effects of food restriction on wheel running activity in the home cages for ALW and FRW groups.

Figure 4. Effects of food restriction on locomotor activity in the metabolic cages for the four groups.

Figure 5. Impact of food restriction associated or not with physical activity on oestral cycles.

Figure 6. Impact of food restriction associated or not with physical activity on body composition measured by X-Ray CT scan at D15 and D55.

Figure 7. Time course of effect of the short- and long-term protocols on energy expenditure.

Figure 8. Time course of effect of protocol on respiratory exchange ratio and fat oxidation measured in metabolic cages (n=1 per cage) at different times of the experiment (D15 and D45)..

Figure 9. Impact of food restriction associated or not with physical activity on intraperitoneal glucose tolerance.

Tableau 1 Impact of food restriction associated or not with physical activity on lean mass, fat mass and bone mineral content.

Tableau 2 Alterations in metabolic and reproductive tissues. Impact of food restriction associated or not with physical activity on the weight of liver, triceps, uterus and on the ovaries.

Tableau 3 Impact of food restriction associated or not with physical activity on plasma metabolites and hepatic glycogen.

Tableau 4 Impact of food restriction associated or not with physical activity on plasma hormones.

Chapitre I : Résultats complémentaires

Figure 1. Weight evolution, body weight gain, daily and cumulative food intake of mice submitted to 3-weeks of recovery of food restriction protocol.

Figure 2. Estrous cycle recovery.

Figure 3. Leptin and ghrelin.

Figure 4. Intraperitoneal glucose tolerance test in mice after 3 weeks recovery.

Tableau 1 Weight and size of different tissues impacted by the protocol of 3 weeks recovery.

Tableau 2 Impact of 3 weeks recovery after 10 weeks of food restriction protocol with or without wheel running access on fasted and basal glycemia.

Chapitre II

Figure 1. Protocole de mesure de la pulsativité de la GH.

Figure 2. Chronologie des sacrifices.

Figure 3. Measures of plasma ghrelin secretion in basal conditions.

Figure 4. Plasma measures of mean GH secretion in four groups in basal conditions.

Figure 5. Measure of blood GH in four groups extract from pulsatility secretion

Figure 6. Area under curve from GH assays.

Figure 7. Measures of plasma IGF-1 levels.

Figure 8. Measures of mean GH plasma concentrations following saline or ghrelin ip injections.

Figure 9. Measures of glycemia in four groups in basal conditions.

Figure 10. AgRP immunostaining in the arcuate nucleus (ARC) in basal condition.

Figure 11. Relative expression of main orexigenic hypothalamic neuropeptides in the morning and the afternoon.

Figure 12. Relative expression of main anorexigenic hypothalamic neuropeptides in the morning and the afternoon.

Figure 13. Relative expression of main orexigenic hypothalamic neuropeptide receptors in the afternoon.

Figure 14. Relative expression of ghrelin and leptin receptors in hypothalamus.

Figure 15. Measure of dopamine and its metabolites (DOPAC and HVA) content by HPLC..

Figure 16. Measure of serotonin (5HT) and 5-Hydroxyindoleacetic acid (5HIA) by HPLC.

Figure 17. Effect of saline or ghrelin injection on cumulative food intake.

FIGURE 18. Effect of ghrelin and saline solution on cFos immunoreactivity in mice in the ARC, PVN and LHA.

Tableau 1 Measure of mean GH secretion in four groups in basal conditions.

Tableau 2 Measure of blood glycemia in four groups in basal conditions.

. Discussion générale / perspectives

Tableau 1 Synthèse de l'apport des modèles existants.

Listes des abréviations

5HT Sérotonine	FR Food restriction
α-MSH Alpha-melanocyte stimulating hormone	FRW Food restriction and Wheel
ABA Activity-Based Anorexia	FSH Follicle-stimulating Hormone
ACTH Adrenocorticotropin Hormone	GABA Gamma-aminobutyric acid
AgRP Agouti Related Peptide	GAL Galanine
Akt Protéine kinase B	GE Glucose-Excité
AL <i>Ad libitum</i>	GH Growth Hormone
ALW <i>Ad libitum</i> and Wheel	GHRH Growth Hormone Releasing Hormone
AM Anorexie Mentale	GHSR Growth Hormone Secretagogue Receptor (récepteur de la ghréline)
AM-P Anorexie mentale avec purge	GI Glucose-Inhibé
AMPK AMP-activated protein kinase	GIP Gastric inhibitory peptide
AM-R Anorexie mentale restrictive	GLP Glucagon-Like-Peptide
AP Area postrema	GLP-R Glucagon-like-peptide récepteur
ApoE Apolipoprotein E	GluT Glucose Transporteur
ARC Noyau arqué hypothalamique	GnRH Gonadotrophin-releasing hormone
ARFID Avoidant / Restrictive Food Intake Disorder	GOAT Ghréline O-Acyltransferase
ASP acylation stimulating protein	HCRT / ORX Hypocrétine / Oréxines
ATP Adénosine triphosphate	Icv Intracérébroventriculaire
BAT Brown Adipose tissue	IGF-1 Insulin-like Growth Factor-1
BDNF Brain Derived Neurotrophic	IL Interleukine
CART Cocaine and amphetamine regulated transcript	IMC Indice de masse corporelle
CCK Cholécystokinine	InsR Insulin Receptor
CCK-1 Récepteur de la cholécystokinine	Ip Intrapéritonéal
CETP Cholesterol ester transfer protein	IRS Insulin Receptor Substrate
CRH Corticotropin-Releasing Hormone	JAK Janus-family tyrosine kinase
CVO Circumventricular organ	KO Knock-out
DA Dopamine	LH Luteinizing Hormone
DMN Noyau dorso-médian hypothalamique	LHA Lateral Hypothalamique Area
EDNOS Eating disorder not otherwise specified	LPL lipoprotein lipase
EE Energy Expenditure	M Chaleur métabolique
FA Fatty acid	MCH Melanin-Concentrating Hormone
FGF Fibroblast Growth Factor	MCH R Melanin-Concentrating Hormone Receptor
	MCP-1 Monocyte Chemoattractant Protein-1

MCR Melanocortin Receptor	PVN Noyau paraventriculaire hypothalamique
MIF Macrophage migration in-hibitory factor	PYY Peptide YY
mTor Mammalian Target Of Rapamycin	RBP-4 Retinol binding protein 4
mTORC1 Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1	SBA Separation-Based Anorexia
Ndufaf1 NADHdehydrogenase (ubiquinone) 1a-subcomplex, assembly factor 1	SF-1 Steroidogenic Factor-1
NMDA N-Methyl-D-aspartic acid	SRIF Somatostatine
NPY Neuropeptide Y	STAT Signal Transducer and Activator of Transcription
NTS Noyau du tractus solitaire	TG Triglycérides
ObR Récepteur à la leptine	TGFβ Transforming growth factor beta
OMS Organisation Mondiale de la Santé	TLR4 Toll-like receptor 4
ORPD Opioid receptor delta 1	TNFα Tumor Necrosis Factor alpha
OVL Organe vasculaire de la lame terminale	TRH Thyrotropin-Releasing -Hormone
OX-R Récepteur de l'orexine	TSH Thyroid-Stimulating-Hormone
OXM Oxyntomoduline	UCP Uncoupling Protein
OXT Ocytocine	VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
PAI-1 plasminogen activator inhibitor-1	VLDL Very low-density lipoprotein
PEPCK Phosphoenolpyruvate carboxykinase	VMN Noyau ventro-médian hypothalamique
PI3K Phospho-inositol 3 kinase	WAT White Adipose tissue
PKA Phospho-kinase A	Y Récepteur NPY
POMC Pro-opiomelanocortin	
PP Polypeptide Pancréatique	

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

PREAMBULE

Le projet développé durant ma thèse concerne la restriction alimentaire, l'une des caractéristiques principales observées dans l'anorexie mentale (AM). Cette maladie, largement connue du grand public, classée dans le DSM-5 comme un trouble du comportement alimentaire, est souvent réduite à un trouble psychiatrique où seul le malade est responsable de son comportement. En réalité, cette maladie est extrêmement complexe avec une étiologie mal définie mêlant des influences aussi bien génétiques qu'environnementales. A ce jour, les cliniciens sont confrontés à des problèmes d'efficacité des traitements envisagés qu'ils soient psychologiques/psychiatriques ou psychopharmacologiques, probablement dus à la multiplicité des altérations susceptibles d'être impliquées dans la chronicisation et/ou dans l'aggravation de la maladie. Ainsi, les médecins sont souvent confrontés à des malades présentant des perturbations aussi bien psychiques, qu'endocriniennes, neuroendocriniennes ou métaboliques.

Comparativement au surpoids et à l'obésité qui constituent l'objet de nombreux projets de recherche aussi bien cliniques que fondamentaux, les études menées sur l'anorexie mentale sont beaucoup plus rares et concernent davantage des données cliniques que fondamentales. Le nombre de références puisé dans PubMed est de 12 907 résultats pour le mot clé « anorexia nervosa » contre 142 833 avec « overweight and obesity ». Cette différence peut être attribuée en partie à la difficulté d'accéder à des cohortes de patients et au manque de modèles animaux pertinents.

Dans les deux situations, on se trouve face à des altérations de l'homéostasie énergétique dont l'un des points communs est d'être plus particulièrement observées dans les pays industrialisés et dans les pays en voie de développement (Makino *et al.*, 2004 ; Hoek *et al.*, 2003 ; Qian *et al.*, 2013). Toutefois, à la différence du surpoids et de l'obésité qui se définissent en particulier par un indice de masse corporelle supérieur à 25 et 30 kg/m² respectivement, aucune étude épidémiologique portant sur l'AM n'a permis de déterminer précisément le nombre de personnes touchées dans le monde en fonction de certaines catégories (âge, milieu socio-professionnel, pays...). L'étude récente de Garcia *et al.*, de 2011 chiffre à entre 1.9 et 2.6 le pourcentage des adolescentes qui souffrent d'anorexie mentale dans les pays industrialisés.

La première partie de ce manuscrit présentera dans l'introduction bibliographique les mécanismes impliqués dans la régulation/dérégulation de la prise alimentaire lors d'une restriction alimentaire chronique. Dans ce but, je ferai, dans un premier temps un rappel sur la régulation physiologique de la prise alimentaire ; dans un deuxième temps, je ferai le point sur les altérations observées dans l'AM, puis je terminerai par un bilan des outils dont nous

disposons pour mieux comprendre cette maladie, en faisant notamment un focus sur les modèles animaux décrits dans la littérature. Après une présentation des objectifs de la thèse, je présenterai dans une deuxième partie (chapitres I et II) les résultats obtenus et les comparerai à ces objectifs. La troisième et dernière partie concernera la discussion générale sur les apports scientifiques des résultats obtenus et leurs perspectives.

Comme indiqué dans le préambule, l'anorexie mentale est un trouble du comportement alimentaire complexe qui se traduit par une altération de plusieurs systèmes périphériques et centraux. L'objectif de cette introduction bibliographique sera de décrire les principaux acteurs impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique.

I. Homéostasie énergétique et prise alimentaire

L'homéostasie énergétique se définit comme un ensemble de processus qui vise à maintenir l'équilibre énergétique de l'organisme afin de maintenir une stabilité des paramètres physiologiques impliqués dans la survie de l'organisme par la conservation d'un poids corporel stable. Cet équilibre fait intervenir d'un côté les apports sous la forme d'aliments et de boissons et, de l'autre, les dépenses énergétiques avec notamment le métabolisme de base, la thermorégulation et l'activité physique.

Un déséquilibre de cette balance généré par des apports alimentaires trop conséquents vs insuffisants ou par des dépenses excessives vs une sédentarité importante peut avoir des conséquences néfastes pour l'organisme. En effet, une alimentation excessive et/ou trop calorique souvent associée à une sédentarité conduit généralement au développement d'une surcharge pondérale et dans les cas les plus graves d'une obésité pouvant être morbide (avec les comorbidités qui lui sont associées). A son opposé, des apports caloriques insuffisants (régime restrictif, famine, grève de la faim, anorexie, cachexie) associés ou non à des dépenses énergétiques trop importantes par rapport aux apports génèrent une perte de poids parfois dramatiques et de nombreuses adaptations physiologiques.

Dans ces deux cas de figures, l'organisme se retrouve dans un état de déséquilibre transitoire considéré comme une situation de stress aigu. En condition physiologique (jeûne postprandial, par exemple), l'organisme met en place un ensemble de systèmes qui régule la prise alimentaire et les dépenses énergétiques afin de retrouver une situation stable. Ce passage entre l'état d'équilibre (homéostasie) et de déséquilibre transitoire correspond à l'allostasie, terme souvent utilisé dans les situations de stress aigu et des stratégies de coping mises en place pour le réduire (Mc Ewen et *al.*, 2003). Toutefois, quand les déséquilibres persistent dans le temps, créant ainsi une situation de stress alimentaire chronique, l'organisme se retrouve en surcharge allostatique dont les conséquences physiologiques, souvent dramatiques, peuvent conduire à un épuisement progressif et *in fine* à la mort (**Fig.1**) (McEwen et Stellar 1993).

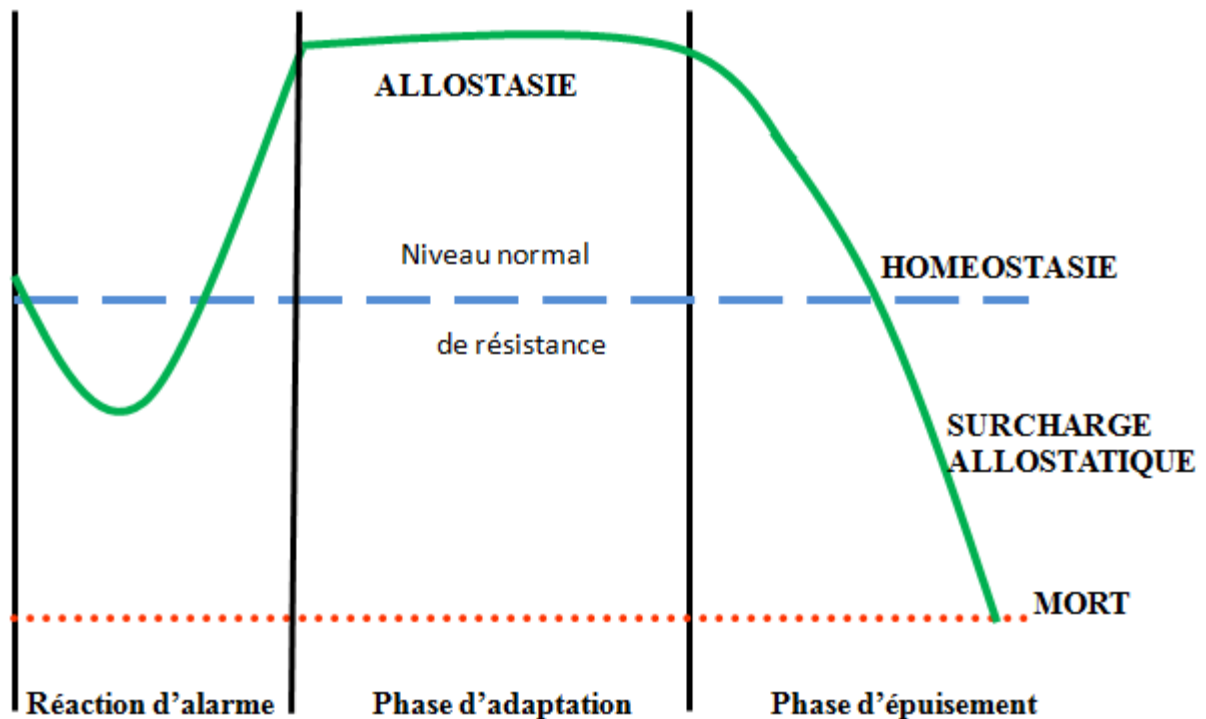


Figure 1 Réaction de l'organisme au stress : de la réaction d'alarme à la mort par épuisement.

1.1. Assimilation et utilisation des substrats énergétiques

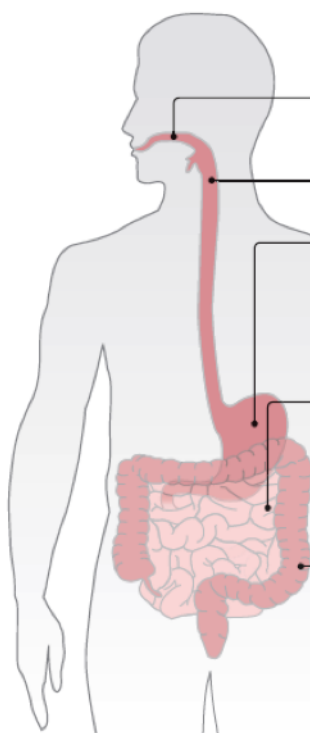
1.1.1. Sélection des aliments

La faim est définie comme un phénomène biologique inné et non conditionné. Elle se manifeste par la mise en place d'un comportement de prise alimentaire, qui est un comportement motivé primaire. L'appétit en revanche se teinte de fortes connotations émotionnelles et correspond essentiellement à une réponse à un apprentissage et est intimement associé à la mémoire et aux expériences passées liées à la nourriture (Fomon *et al.*, 1964). Ainsi, au cours des repas, trois types de macronutriments majoritairement contenus dans les aliments sont absorbés par l'organisme : les lipides, les protides et les glucides et plus minoritairement par la boisson, en particulier dans le cas de l'alcool ou des boissons enrichies en sucres ou protéines. Toutefois, le choix des aliments est influencé, voire altéré, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal, par l'état de jeûne (Piquard *et al.*, 1977 ; Griffioen-Roose *et al.*, 2012), l'état émotionnel (Gibson *et al.*, 2006) ainsi que par la perception des goûts et des odeurs. De plus, les traits de personnalité, les préférences alimentaires, la présence ou non d'activité physique (Keeley *et al.*, 2014), les réserves énergétiques ou encore l'expression de certains gènes ont aussi un impact sur la mise en place du comportement alimentaire et le choix des aliments. A ceci, on peut ajouter l'aspect motivationnel de la prise alimentaire. En effet, la prise de nourriture ne répondrait pas seulement à une nécessité biologique, mais aussi au plaisir qui lui est associé. Ainsi, la quantité de nourriture ingérée varie aussi au cours

du repas avec une diminution de la perception agréable des aliments au cours du repas (Cabanac *et al.*, 1971 ; Berridge *et al.*, 2004).

1.1.2. Digestion et stockage

La digestion de la nourriture est assurée par le système gastro-intestinal et par les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas. La décomposition de la nourriture en molécules de petite taille met en jeu une multitude de mécanismes enzymatiques et mécaniques pour permettre aux composants et aux nutriments alimentaires d'être pleinement disponibles pour l'absorption (Bornhorst et Singh, 2014). (**Fig. 2**) Les molécules issues de la digestion transitent dans les cellules épithéliales de l'intestin pour atteindre la circulation sanguine ou lymphatique.



Organe	Processus physique	Processus chimique
Cavité oral (bouche)	Mastication But: transport du bol alimentaire	Hydrolyse enzymatique But: a-amylase: digestion de l'amidon Lipase linguale: digestion des lipides
Oesophage	Péristaltisme But: transport du bol alimentaire	
Estomac	Péristaltisme But: continue le fragmentation de la nourriture	Hydrolyse enzymatique But: Pepsin: digestion des protéines Lipase: digestion des lipides Hydrolyse acide But: acide gastrique (pH~2): ramollissement de la texture de la nourriture
Intestin grêle	Péristaltisme But: transport du digesta Segmentation But: mélange pour faciliter l'absorption Diffusion (active/passive) But: absorption des nutriments	Hydrolyse enzymatique But: lipase, phospholipase A: digestion des lipides; amylase, amyloglucosidase: digestion des sucres; trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase, elastase: digestion des protéines
Gros intestin (côlon)	Péristaltisme But: transport du digesta Segmentation But: mélange pour faciliter l'absorption Diffusion (active/passive) But: absorption des produits dérivés de la fermentation et de l'eau	Fermentation But: production d'acides gras à chaînes courtes et d'autres produits dérivés

Figure 2. Résumé des processus physiques et chimiques qui se produisent dans le tractus gastro-intestinal (D'après Bornhorst et Singh, 2014)

La plus grande partie de l'absorption des nutriments se produit au niveau de l'intestin grêle où les glucides, les lipides et les protéines sont hydrolysés par des enzymes spécifiques en monosaccharides (amylases), en acides gras (lipases) et en acides aminés (pepsines, trypsines, chymotrypsines, carboxypeptidases et aminopeptidases).

Différentes hormones sont libérées par le système gastro-intestinal et sécrétées par des cellules parsemées au sein de l'épithélium stomacal et intestinal et par le pancréas (**Fig. 3**)

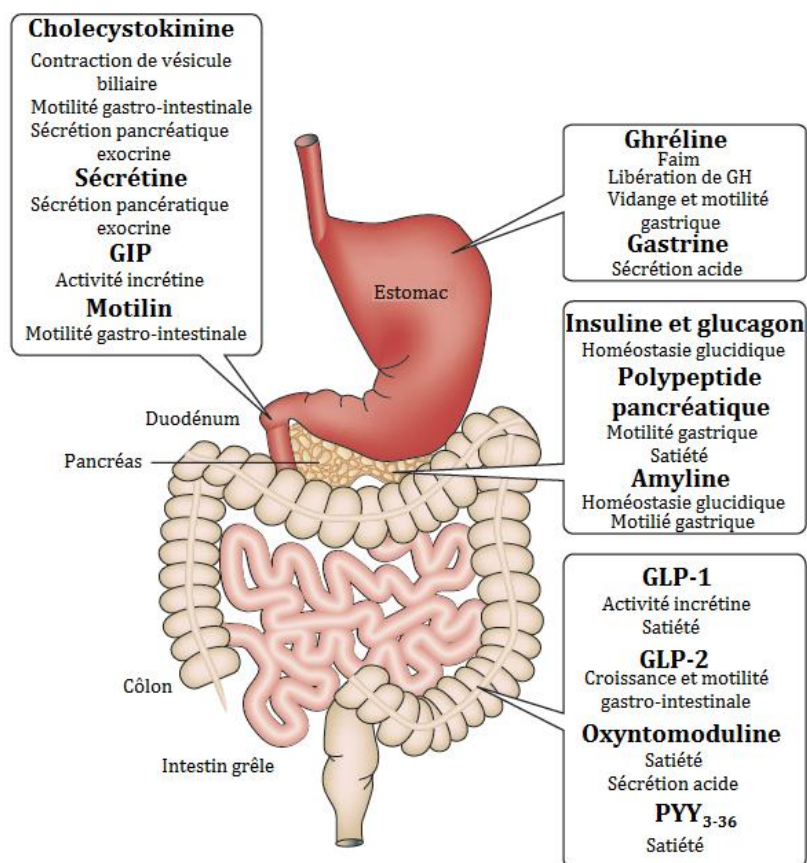


Figure 3. Représentation schématique des différentes hormones intestinales impliquées dans les processus de digestion (D'après Murphy *et al.*, 2006)

La régulation des différentes fonctions du tractus gastro-intestinal met également en jeu et de manière non négligeable le système nerveux entérique et le système nerveux autonome, composé des plexus myentériques et sous-muqueux et impliquant différents neuromédiateurs tels que l'acétylcholine, les catécholamines et la sérotonine (Gershon, 1998).

Enfin, le rôle essentiel du microbiote intestinal dans les processus de digestion, bien que connu depuis longtemps, est de nouveau mis en avant par des données récentes montrant son implication dans le dialogue « intestin-cerveau ». Il intervient de manière essentielle dans la dégradation des polysaccharides, mais aussi dans l'absorption des acides gras à chaînes courtes et dans la lipogenèse. Ces microorganismes ont une influence notable sur l'homéostasie énergétique. En effet, des souris élevées en absence de microbiote présentent une diminution de 40% des dépôts adipeux et mangent 30% de moins que des souris contrôle (Bäckhed *et al.*, 2004). De plus, il apparaît une influence du microbiote intestinal dans la

survenue de plusieurs maladies dont le syndrome métabolique, le diabète de type 2 (Turnbaugh *et al.*, 2006). Il n'existe en revanche que peu de données, dans l'AM ; il a, toutefois, été observé une modification de la flore intestinale (Armougom *et al.*, 2009 ; Gouba *et al.*, 2014). Il existe un lien entre les populations bactériennes et l'IMC avec une variation dans la proportion de ces populations et plus précisément une augmentation des *Lactobacillus* et une réduction des *Bacteroidetes* chez les obèses par rapport aux personnes minces et aux anorexiques (Armougom *et al.*, 2009 ; Million *et al.*, 2013). De plus, il a été émis l'hypothèse que ces microorganismes seraient impliqués dans les troubles du comportement alimentaire (Fetissov *et al.*, 2008).

Une fois dans le flux sanguin, les différents métabolites énergétiques ciblent plusieurs tissus et organes impliqués dans le métabolisme énergétique qui régissent le stockage ou la libération de molécules énergétiques, telles que les triglycérides (TG) ou le glucose selon les besoins de l'organisme (**Fig. 4**).

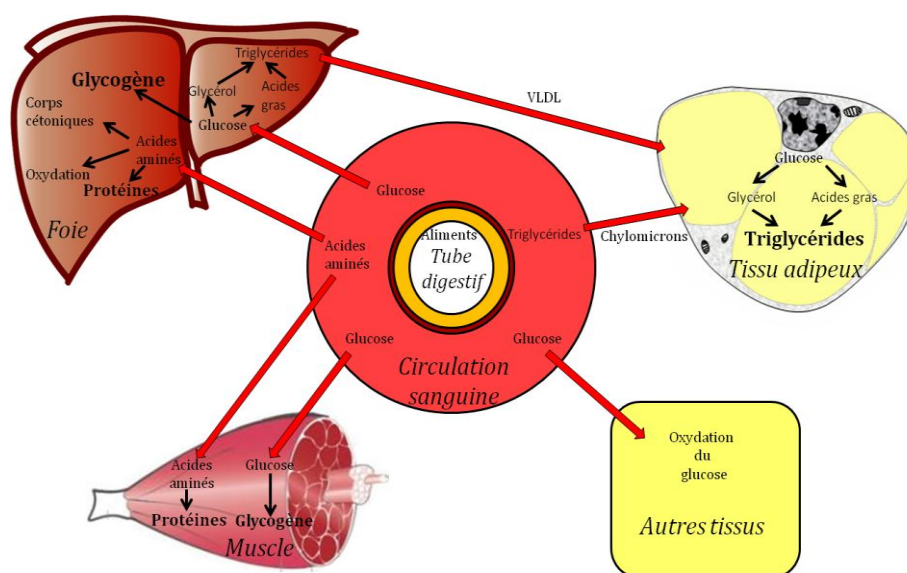


Figure 4. Schéma récapitulant les différentes voies de stockage de l'énergie après un repas.

Pour un fonctionnement optimal des cellules, l'organisme doit puiser dans les aliments consommés les nutriments énergétiques nécessaires au métabolisme énergétique cellulaire. **Le glucose** nécessaire pour produire de l'ATP est stocké sous forme de glycogène dans le foie et le muscle squelettique. L'entrée du glucose s'effectue de manière passive par diffusion facilitée qui implique différents transporteurs, comme le GluT2 sur les hépatocytes, le GluT4 au niveau des muscles squelettiques, les tissus adipeux et le cœur ou encore les GluT3 et GluT5 au niveau du cerveau et plus spécifiquement GluT1 pour le passage des barrières tissulaires

comme la barrière hémato-encéphalique (Mueckler, 1994 ; Impson *et al.*, 1999 ; Richter et Hargreaves, 2013). Le glucose sert aussi de substrat à la synthèse des **triglycérides** ou lipogénèse. Ce métabolite également capté de l'alimentation sous forme de chylomicron est principalement stocké par les tissus adipeux (Griffiths *et al.*, 1994 ; Hussain, 2000 ; Beigneux *et al.*, 2007). Le stockage des lipides par l'organisme varie en fonction du type de tissu adipeux brun (BAT) ou blanc (WAT) qui se distinguent par leurs différences fonctionnelles avec un rôle prépondérant du BAT dans la thermogénèse et la thermorégulation et un rôle majeur des différents dépôts de WAT dans le métabolisme énergétique (Montague *et al.*, 1998 ; Atzmon *et al.*, 2002 ; Casteilla *et al.*, 2007). La troisième source de métabolites énergétiques provient des **protéines**. Les acides aminés issus de l'alimentation sont capturés par le foie et par les muscles squelettiques et servent de substrats pour la synthèse protéique. Ils sont aussi à la base de la production d'acide cétonique, après déamination qui entre dans le cycle de Krebs ou participent aussi à la synthèse de lipides. Toutefois, si l'alimentation apporte un excès d'acides aminés, il n'y a pas de mécanismes de stockage à l'image de ce qui se passe pour le glucose et les acides gras (**Fig. 5**).

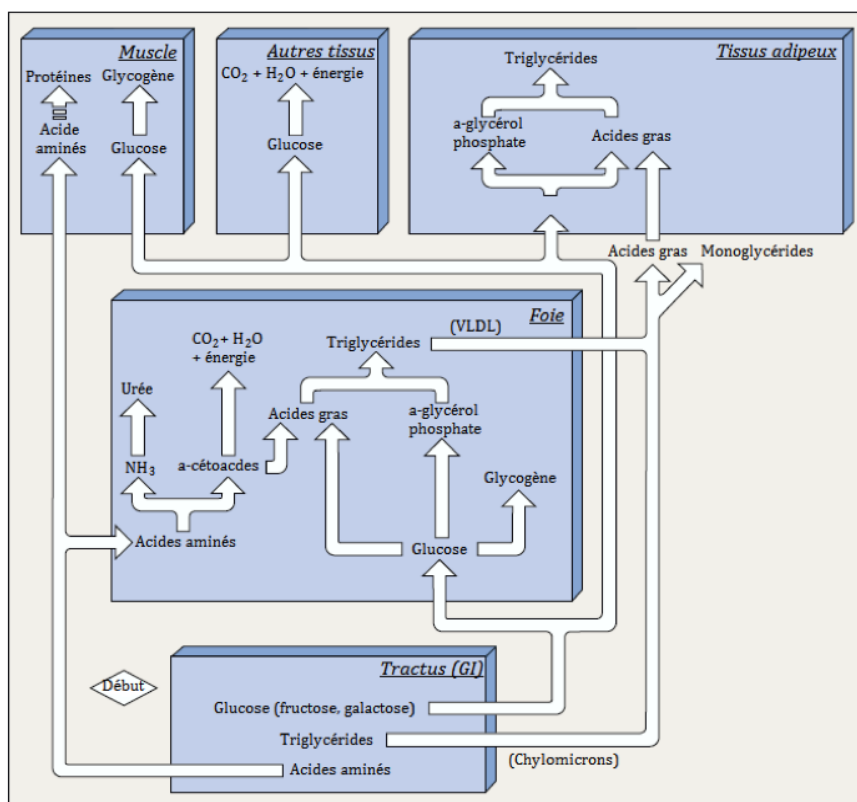


Figure 5. Voies métaboliques majeures de la phase absorbative. La flèche en pointillés entre les acides aminés et les protéines dans le muscle indique le fait que l'excès d'acides aminés n'est pas stocké sous forme de protéines. Toutes les flèches entre les boîtes indiquent un transport de substances *via* le sang (D'après Human physiology 8^{ème} édition 2001)

1.1.3. Dépenses énergétiques

Les dépenses énergétiques regroupent l'ensemble des actions volontaires ou involontaires entraînant une déperdition d'énergie et faisant basculer dans l'autre sens la balance énergétique. Plusieurs éléments entrent dans la composition de ces dépenses et peuvent être résumés par l'équation suivante

Energie brute = énergie des fèces + énergie excrétée par l'urine + énergie du méthane + énergie du méthane + énergie retenue + énergie issue du travail + production métabolique de chaleur

a) Métabolisme de base

Selon la définition de Harris et Benedict (1918), la production de chaleur chez un individu au repos musculaire complet, 12 à 14 heures après son dernier repas, c'est-à-dire en phase post absorptive, est appelée métabolisme de base. Cette chaleur représenterait 60 à 75% de la dépense énergétique nécessaire au maintien des fonctions vitales de l'organisme incluant le bon fonctionnement des organes cœur, cerveau, respiration, digestion et le maintien de la température du corps (**Fig. 6**). Pour la déterminer, Harris et Benedict ont utilisé des méthodes de calorimétrie indirecte afin d'établir différentes équations linéaires chez l'homme et la femme (Harris et Benedict, 1918) qui toutefois ne semblent pas être applicables pour l'ensemble de la population mondiale. En effet, le métabolisme de base en plus d'être influencé par l'âge, le sexe, le poids, le régime alimentaire (Shetty, 1999 ; Livingston). C'est pourquoi l'interprétation des résultats obtenus et des études utilisant ce type d'équation doit être prises avec précaution.

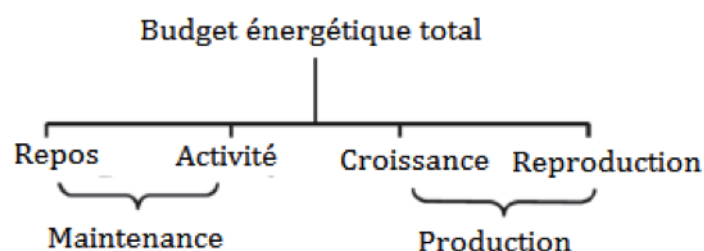


Figure 6. Différents composants du budget énergétique total. Equilibre entre la maintenance ou énergie respiratoire nécessaire pour préserver l'individu en vie et production concernant l'énergie nécessaire à la croissance, le développement et la reproduction (D'après Leonard, 2010)

b) Digestion

Une partie non négligeable de la dépense énergétique encore appelé « effet thermique de la nourriture » est liée à la digestion. La chaleur ainsi perdue correspondrait au résultat de la digestion, à l'absorption et au stockage de la nourriture et compterait pour 10 à 15% de la

dépense énergétique totale chez l'Homme (d'Allassio *et al.*, 1988 ; Donahoo *et al.*, 2004). Il apparait également que la taille et la composition des repas et notamment la proportion en protéines affecteraient la chaleur dégagée et donc la dépense énergétique (Reed et Hill, 1996 ; Mikkelsen *et al.*, 2000). En effet, les régimes hyperprotéinés sont associés à une augmentation du métabolisme énergétique.

c) Thermorégulation

Une autre partie plus variable de la dépense énergétique est liée à la thermorégulation qualifiée également « production métabolique de chaleur ». La température de neutralité thermique est la température à laquelle l'organisme étudié ne dépense pas d'énergie pour maintenir sa température corporelle. Chez les rongeurs, il a été montré que cette dépense varie en fonction de différents facteurs. Ainsi, des oscillations circadiennes de la production de chaleur chez le rat ont été observées (Refinetti, 2003). Le climat et la température ambiante influencent également cette dépense énergétique : une diminution de la température entraîne une augmentation de la dépense énergétique (Kirov *et al.*, 1996 ; Lovegrove, 2003). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la diminution de cette dépense énergétique serait un stratagème permettant d'économiser de l'énergie dans les périodes de restriction alimentaire et que cette stratégie serait grandement associée au poids corporel (Koizumi *et al.*, 1992 ; Geiser, 2004 ; Gordon, 2012). Dans les cas extrêmes de déprivation de nourriture, il a été observé une entrée en état de torpeur (Koizumi *et al.*, 1992) qui se traduit par une chute de la température corporelle et du rythme cardiaque. Cet état est considéré comme une réponse de protection pour conserver les ressources énergétiques de l'organisme (Gordon, 2012). Le tissu adipeux brun (BAT) est l'un des tissus majeurs intervenant dans ces régulations, par la production de protéines de découplage (UCP : uncoupling protein) qui permettraient une dissipation de l'énergie cellulaire sous forme de chaleur (Bouillaud *et al.*, 1988 ; Kirov *et al.*, 1996). Il est à noter que l'expression de ces protéines est influencée par une dénutrition chronique avec, en particulier, une augmentation de l'expression de la protéine UCP1 (Zgheib *et al.*, 2014).

d) Activité physique

L'activité physique entraîne une hausse de la température corporelle et de la dépense énergétique (Bolles *et al.*, 1968 ; Gleeson *et al.*, 1980 ; Refinetti, 1999 ; 2003). Au niveau du métabolisme énergétique, quelque soit la durée de l'exercice pratiqué, il est associé à une augmentation de la consommation d'oxygène associée à une augmentation du métabolisme de base et à une réduction de la masse grasse (Yoshioka *et al.*, 2001 ; Speakman et Selman

2003) qui n'est pas corrélée à une perte de poids corporel même si à court terme l'exercice induit une diminution de la prise alimentaire (Woods, 1991 ; Scheurink *et al.*, 1999). A plus long terme, un comportement de compensation se met en place avec une augmentation de la faim pour pallier à l'augmentation des besoins énergétiques (Staten, 1991 ; Speakman et Selman 2003 ; Westerterp, 2003 ; Sasaki *et al.*, 2014). Dans le cas où la nourriture n'est pas disponible, plusieurs types de réponses ont été observés. En cas de jeûne aigu, une augmentation de l'activité physique est observée chez plusieurs espèces laissant supposer un comportement de recherche de nourriture accru (Lynn *et al.*, 2003; Novak *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2002). Lorsque l'absence de nourriture se maintient sur un plus long terme, une diminution de l'activité physique est observée permettant une conservation des réserves énergétiques (Novak *et al.*, 2005; Severinsen et Munch, 1999). Toutefois, il faut noter que la restriction calorique partielle n'a pas les mêmes effets que la restriction complète ; chez les rongeurs, elle va entraîner une diminution de l'activité nocturne et une augmentation de l'activité diurne (Williams *et al.*, 2002 ; Overton et Williams, 2004). Ces comportements sont tout particulièrement exploités dans les modèles d'anorexie qualifiés d'« Activity-Based Anorexia » chez les rongeurs (Exner *et al.*, 2000 ; Hillebrand *et al.*, 2005a,b,c,d ;Verhagen *et al.*, 2009 ; Pardo *et al.*, 2010) qui seront plus amplement présentés dans le point II.

Il y a plus de 200 ans, les premières tentatives de mesures de la chaleur dégagée par les animaux ont été tentées et ont ouvert le chemin aux mesures réalisées par calorimétrie dont les résultats servent encore aujourd'hui de repère en particulier dans les désordres métaboliques.

1.2. Evaluation du métabolisme énergétique:

1.2.1. Calorimétrie directe et indirecte

a) Historique

La calorimétrie correspond à la mesure de la chaleur. La mesure de cette chaleur est utilisée pour estimer les coûts de la survie d'un organisme. Adair Crawford et Lavoisier ont été les premiers à tenter de mesurer cette chaleur (Blaxter, 1978 ; Beretta, 2012) en comparant par exemple la quantité de chaleur dégagée par des animaux à celle dégagée par une bougie. Lavoisier montra alors qu'il existait une relation entre le dioxyde de carbone produit par un animal et la quantité de chaleur dégagée par le même animal placé dans son calorimètre. Despretz, dès 1824, et Dulong en 1841 mesurèrent la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone et ils conclurent que l'oxydation n'est pas la seule source de chaleur des animaux qu'ils ont étudiés. En 1842, von Mayer formula le principe de

conservation de l'énergie connue comme étant la première loi de la thermodynamique qui permet alors de relier la chaleur d'un animal à l'énergie chimique de la nourriture et des excréments. Le premier système de mesures des gaz respiratoires en circuit fermé fut décrit pour la première fois par Regnault et Reiset en 1849. Il faudra attendre 1905 et les multiples améliorations du système de Regnault et Reiset pour voir un système avec un renouvellement de l'air permettant le calcul de la chaleur à partir du quotient respiratoire (Atwater et Benedict, 1905). Le ratio de dioxyde de carbone sur l'oxygène était connu pour être de 0,7 pour le métabolisme lipidique, de 1,0 pour le métabolisme glucidique et de 0,83 pour le métabolisme protéique (McLean et Tobin, 1987).

A cette époque, les bases de la calorimétrie étaient posées. Les systèmes de mesures se sont par la suite améliorés aussi bien pour l'Homme que les autres espèces animales. Les appareils de mesures sont devenus plus précis et une automatisation a été rendue possible avec l'avènement de l'informatique.

b) Définitions

Tous les processus vitaux utilisent de l'énergie puisée majoritairement dans la nourriture consommée pour produire de l'ATP et permettre comme décrit précédemment un fonctionnement optimum de l'organisme. Une grande partie de l'énergie acquise par l'organisme est gaspillée sous forme de chaleur. La calorimétrie directe va donc consister à mesurer directement, par des méthodes physiques cette déperdition de chaleur. En revanche, la calorimétrie indirecte va déduire cette déperdition à partir de mesures quantitatives d'une partie des dérivés du métabolisme. ***Nous détaillerons uniquement cette méthode, car elle sera utilisée dans la première partie (chapitre I) de la thèse.***

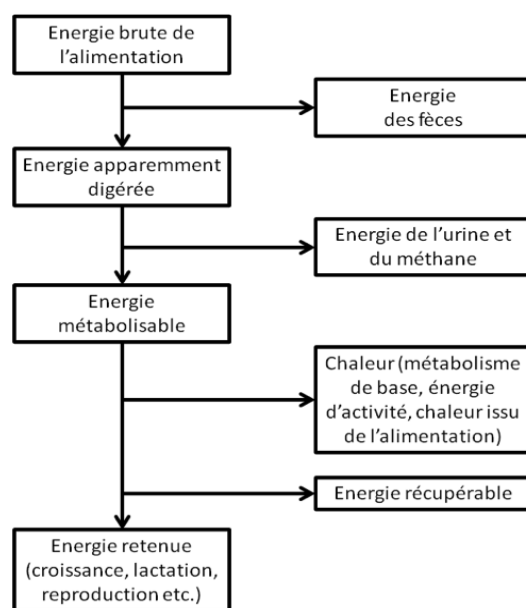


Figure 7. Découpage de l'énergie brute de la nourriture. (D'après McLean et Tobin 1987).

Conformément aux lois de la thermodynamique et la loi de Hess, un équilibre complet

doit exister entre les différentes catégories énergétiques (cf équation précédente).

La partie digestible de l'énergie présente dans l'alimentation est absorbée dans le flux sanguin et les déchets issus de leur métabolisme sont éliminés avec l'urine et les fèces. L'énergie restante/résiduelle est appelée énergie métabolisable qui est l'énergie nécessaire au maintien de la respiration, la circulation sanguine et d'autres fonctions vitales (**Fig. 7**). Le taux minimal de l'utilisation de l'énergie utilisée chez un individu au repos est connu comme étant le métabolisme de base (Basal Metabolic Rate). Au métabolisme de base, il faut rajouter le coût énergétique lié au repas et toute énergie qui est nécessaire à l'activité, la thermorégulation et les autres travaux musculaires. Dans le cas où l'énergie issue du métabolisme de la nourriture est insuffisante par rapport à la demande, le corps peut consommer ses propres réserves. Normalement, la prise alimentaire est régulée de façon à s'équilibrer avec les demandes ; toutefois un excès de prise alimentaire donc d'apport énergétique conduit à une prise de poids et une déficience à un amaigrissement.

La calorimétrie estime et mesure les besoins nutritionnels. C'est un outil pertinent pour étudier les processus vitaux nutritionnels et physiologiques fondamentaux et pour estimer les efforts imposés par des environnements sévères ou anormaux. Elle est également utilisée comme outil diagnostique pour la recherche de désordres métaboliques (McLean et Tobin 1987).

e) Calorimétrie indirecte

La mesure de la production de chaleur métabolique (**M**) qualifiée aussi de dépense énergétique repose sur deux hypothèses :

1) le résultat final de l'ensemble des réactions biochimiques qui se produisent au sein de l'organisme revient à l'ensemble de la combustion ou de la synthèse des glucides, lipides et protéines ;

2) pour chacune de ces molécules, lorsqu'elles sont oxydées dans le corps, des ratios entre la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone et de chaleur sont calculés.

Ces informations de bases sont fournies grâce à l'utilisation de bombes calorimétriques qui donnent la relation entre la quantité d'oxygène consommée et la quantité de chaleur, de dioxyde de carbone et d'eau produites ainsi que des déchets azotés résultant de la combustion de protéines, de lipides. Ainsi, la combustion/l'oxydation de ces différents composés présents dans les aliments ont pu être mesurées.

Pour les **glucides**, l'oxydation de chaque atome de carbone résulte à sa combinaison avec une molécule d'oxygène pour former une molécule de dioxyde de carbone. Dans le cas du glucose, sucre directement assimilable par l'organisme, 6 molécules d'oxygène sont

nécessaires pour permettre son oxydation. Cette oxydation dans une bombe calorimétrique libère de la chaleur appelée chaleur de combustion (Q) qui correspond à 2817kJ/mole ou 15,64kJ/g d'énergie.



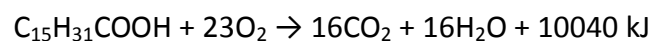
Le quotient respiratoire (r) issu de cette oxydation est égal à **r= 6/6, soit 1**. Les valeurs obtenues de r pour la plupart des glucides présents dans l'alimentation montrent une certaine uniformité alors que la chaleur de combustion est variable (**Tableau 1**).

Tableau 1 Facteurs calorifiques des glucides

	Q =Chaleur de combustion (kJ/g)	a = Oxygène consommé (l/g)	q = Q/a (kJ/l)	r = Quotient respiratoire
<i>Monosaccharides</i> (C ₆ H ₁₂ O ₆)	15,64	0,746	20,95	1,00
<i>Disaccharides</i> (C ₆ H ₂₂ O ₁₁)	16,51	0,786	21,02	1,00
<i>Polysaccharides</i> (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	17,50	0,830	21,11	1,00

(D'après McLean et Tobin, 1987)

Les **triglycérides** présentent une composition des acides gras qui peut être très variable, principalement constituée d'acides saturés ou mono-insaturés. Dans le cas de l'acide palmitique (C18, triglycéride le plus représentatif de l'alimentation), la chaleur de combustion dégage 10 040 kJ/mol ou 39,16 kJ/g.



Le quotient respiratoire est de **r= 16/23 soit 0,69** dans le cas de l'acide palmitique. Toutefois, les variations existantes de ces facteurs entre les différents acides gras est plus grande que celle existant entre les glucides. Ainsi, la valeur communément retenue est **r = 0,71**.

Il est ainsi possible de mesurer l'oxygène consommé et le dioxyde de carbone produit afin d'estimer la chaleur dégagée et la composition du mélange. Ce type de calcul forme la base des tables de valeurs pour l'analyse des mélanges de lipides et de glucides (Lusk 1928) (**Tableau 2**).

L'explication de l'obtention de cette valeur « r » nous semble essentielle pour mieux appréhender les données métaboliques présentées dans le chapitre I.

Tableau 2. Analyse de l'oxydation des mélanges de glucides et de lipides

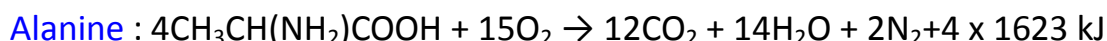
Quotient respiratoire	Pourcentage de l'oxygène total consommé par :		Pourcentage de la chaleur totale produite par :		Chaleur par litre d'oxygène (kJ et kcal)
	Les glucides (%)	Les lipides (%)	Les glucides (%)	Les lipides (%)	
0,707	0	100,0	0	100,0	19,62 / 4,6862
0,75	14,7	85,3	15,6	84,4	19,84 / 4,7337
0,80	31,7	68,3	33,4	66,6	20,10 / 4,8008
0,85	48,8	51,2	50,7	49,3	20,35 / 4,8605
0,90	65,9	34,1	67,5	32,5	20,61 / 4,9226
0,95	82,9	17,1	84,0	16,0	20,87 / 4,9847
1,00	100,0	0	100,0	0	21,13 / 5,0468

(D'après McLean et Tobin, 1987 converti à partir de la table de Lusk, 1928)

A partir de cette table, l'oxydation des acides gras est calculable en appliquant l'équation suivante, où 0.293 (1-0,707) est la différence entre les quotients respiratoires pour l'oxydation totale des glucides et des lipides (Lusk, 1924):

$$\text{FA oxidation (kcal/h)} = \text{EE} \times ((1-\text{RER})/0.293)$$

A la différence des glucides et des lipides, les **protéines** ne sont pas totalement oxydées en dioxyde de carbone et en eau. L'azote qui les compose est principalement converti en urée éliminée par voie urinaire. La mesure de l'azote urinaire peut être utilisée pour estimer la quantité de protéines métabolisées. On peut prendre l'exemple de l'oxydation de l'alanine et de l'urée :



La soustraction de ces deux équations donne:



La résultante de cette équation est la consommation de 4 moles d'alanine et de 12 moles d'oxygène, et la production de 2 moles d'urée et 10 moles de dioxyde de carbone. Dans ce cas le quotient respiratoire est de **r= 10/12 soit 0,83**.

Au final, la production de chaleur peut être exprimée sous la forme d'une équation linéaire dans laquelle VO_2 correspond à la consommation d'oxygène, VCO_2 à la production de dioxyde de carbone et N à l'azote urinaire.

$$M = \alpha VO_2 + \beta VCO_2 + \gamma N$$

En résumé, l'estimation de la chaleur produite (M) à partir de l'analyse des gaz respiratoires repose sur les chaleurs de combustion et de la composition élémentaire de glucides, de lipides et de protéines. Les valeurs α , β et γ peuvent varier légèrement en fonction du régime alimentaire, de l'activité et de la croissance du sujet. Ainsi en situation physiologique, l'équation suivante est utilisée chez l'Homme (Abramson, 1943).

$$M = 16,0 \times VO_2 + 5,15 \times VCO_2 - 7,8 \times N \text{ kJ}$$

Dans la littérature, la plupart des auteurs travaillant chez les rongeurs utilisent des valeurs de coefficients calorifiques dérivées des tables de Lusk (1928) (Bruss *et al.*, 2010 ; Morton *et al.*, 2010 ; Brunett *et al.*, 2013 ; 2014). Ces valeurs ont permis de déterminer graphiquement l'équation donnant les valeurs des coefficients.

$$M = 3,815 \times VO_2 \text{ kcal} + 1,232 \times VCO_2 \text{ kcal}$$

ou

$$M = 15,968 \times VO_2 \text{ kJ} + 5,1447 \times VCO_2 \text{ kJ}$$

1.3. Régulation de la prise alimentaire

La régulation de la prise alimentaire est complexe, elle met en jeu des structures centrales et périphériques qui entretiennent un dialogue étroit. Ainsi, la sélection des aliments que nous consommons se fait non seulement à partir leurs apports caloriques selon les besoins de l'organisme, mais également par le plaisir qu'ils procurent et l'expérience passée. Le contrôle de ces deux aspects met en jeu au niveau central deux types de circuits. Un circuit « homéostatique » qui met en jeu plusieurs structures hypothalamiques est impliqué dans la régulation de l'équilibre entre la consommation et les dépenses. Un circuit « non homéostatique » ou hédonique, faisant intervenir les circuits méso-limbiques autrement appelé circuit de récompense, régule les aspects motivationnels de la prise de nourriture (plaisir, apprentissage, stress, facteurs socioculturels....). Ces régions sont étroitement connectées et sont la cible commune de signaux périphériques.

La description des interrelations entre la régulation centrale et périphérique de la prise alimentaire nous a semblé nécessaire pour adopter un point de vue intégré utile à la compréhension des données obtenues dans les chapitres I et II. En effet, l'anorexie mentale, comme déjà souligné, se caractérise par des dérégulations affectant l'ensemble de ces systèmes (Fig. 8)

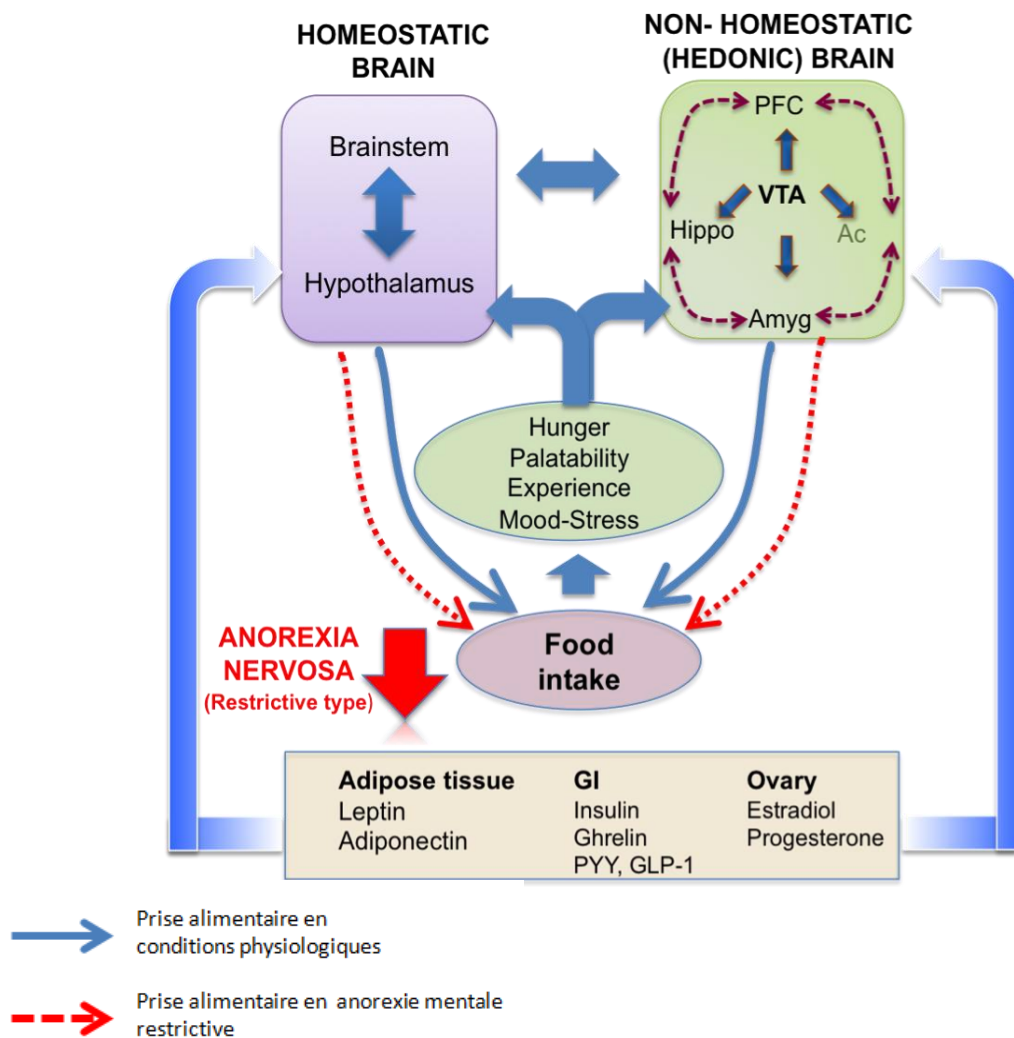


Figure 8 Interrelation entre les systèmes homéostatique et non homéostatique centraux et les signaux périphériques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Cas de l'anorexie mentale. Ac: Accumbens nucleus; Amyg: amygdale; GI: tractus gastro-intestinal; GLP-1: glucagon-like peptide 1; hippo: hippocampe; PFC: cortex préfrontal; PYY: peptide YY; VTA: aire tegmentale ventrale (d'après Méquinion *et al.*, 2013).

1.3.1. Régulation homéostatique de la prise alimentaire

La régulation homéostatique de la prise alimentaire fait intervenir plusieurs noyaux hypothalamiques (**Fig. 9**). L'hypothalamus est une petite structure du diencephale localisée sous le thalamus qui s'étend du long du troisième ventricule sous le sillon hypothalamique jusqu'au plancher du ventricule impliquée dans la régulation d'autres fonctions comme le stress, la thermorégulation, la balance électrolytique et hydrique ou encore le comportement sexuel. La régulation de la prise alimentaire fait intervenir plusieurs populations neuronales interconnectées et localisées dans le noyau arqué (ARC), le noyau paraventriculaire (PVN), l'aire hypothalamique latérale (LHA), le noyau dorsomédian (DMN) et le noyau ventromédian (VMN).

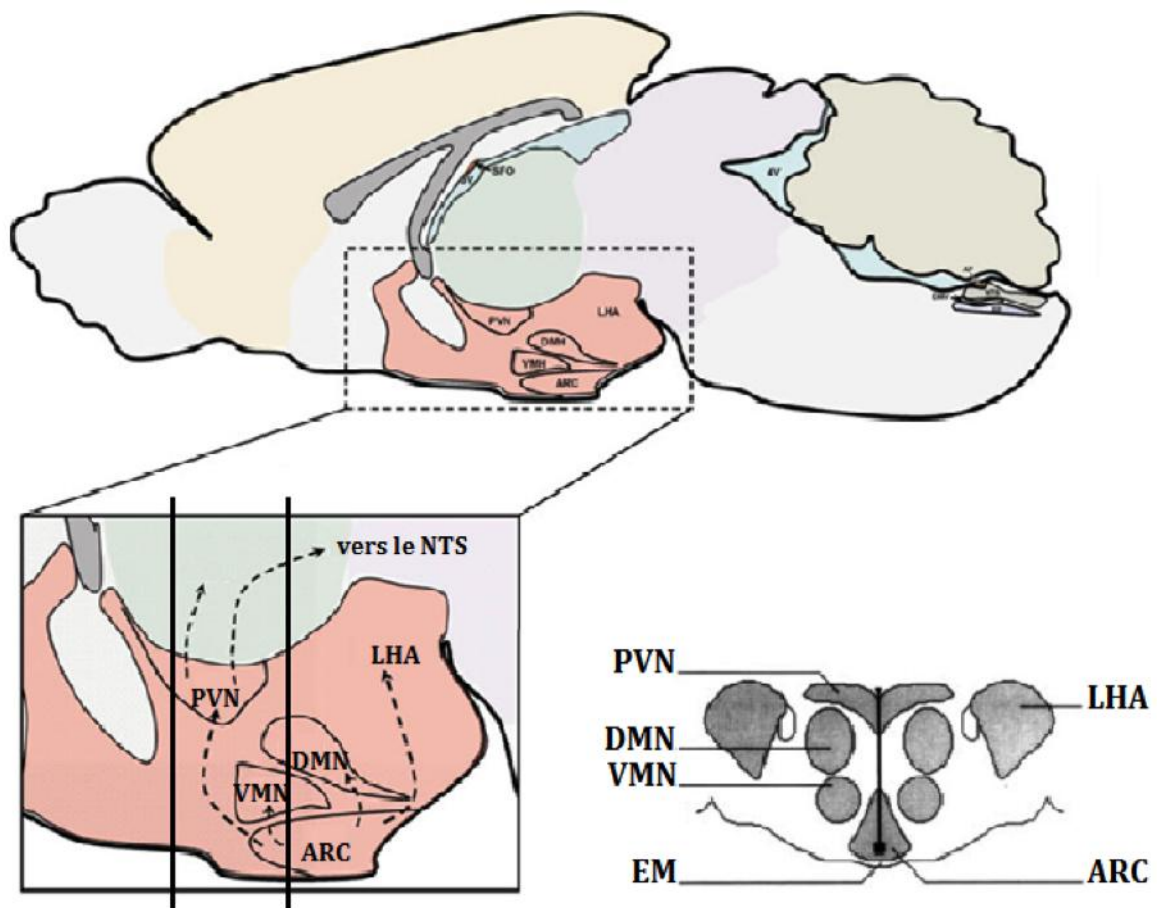


Figure 9 Localisation des principaux noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle homéostatique de la prise alimentaire (ARC : noyau arqué ; DMN : noyau dorsomédian ; EM : éminence médiane ; LHA : aire hypothalamique latérale ; NTS : noyau du tractus solitaire ; PVN : noyau paraventriculaire ; VMN : noyau ventromédian ;) (D'après Smith et Ferguson, 2008)

a) Le noyau arqué (ARC)

Le noyau arqué est situé à la base du 3^{ème} ventricule à proximité de l'éminence médiane, l'un des organes circumventriculaires. Cette situation privilégiée lui permet un accès facilité avec les facteurs circulants périphériques (Langlet *et al.*, 2013). Les neurones de l'ARC sont ainsi considérés comme des neurones de premier ordre, cibles préférentielles des hormones périphériques. Ils envoient leur projection vers des cibles hypothalamiques comme le PVN, la LHA, le DMN et le VMN, mais aussi extra-hypothalamiques comme l'amygdale, le thalamus, l'aire ventrale tegmentale (VTA) ou encore le noyau du tractus solitaire (Fetissov *et al.*, 2003 ; Bouret *et al.*, 2004). L'ARC comprend plusieurs populations neuronales. Les principales impliquées dans la prise alimentaire sont ici décrites.

* **Les neurones co-exprimant l' α -MSH (melancortin stimulating hormone) et la CART (cocaïne- and amphetamine-regulated transcript)**. La stimulation de ces neurones conduit à une diminution de la prise alimentaire. Ils sont la cible de la leptine et de l'insuline (voir *infra*). Ainsi l'injection de leptine ou d'insuline entraîne une dépolarisation de ces neurones (Cowley *et al.*, 2003 ; Williams *et al.*, 2010). La leptine se fixe sur le récepteur Ob-rb et active la voie JAK-STAT3 (Janus kinase - Signal transducer and activator of transcription 3), ce qui conduit à une stimulation de l'expression du gène de la pro-opiomelanocortine (POMC). De même, l'insuline se fixe sur le récepteur InsR qui active l'insulin receptor substrate (IRS), qui converge avec la signalisation de la leptine pour permettre l'activation de phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pour moduler en particulier l'homéostasie glucidique. La POMC correspond à un précurseur protéique qui va donner après clivage différents peptides dont l' α melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) qui est l'un des neuropeptides impliqué directement dans la réduction de la prise alimentaire, du poids corporel et dans l'augmentation de la dépense énergétique (Voir revue Gao 2007). L'action de l' α -MSH met en jeu les récepteurs à mélanocortine MC3R et MC4R fortement exprimés dans l'hypothalamus. Le récepteur MC3R est retrouvé plus particulièrement dans l'ARC, alors que le récepteur MC4R est exprimé dans l'ARC, le PVN, la LHA et le DMN (Jégou *et al.*, 2000 ; Cone, 2005) et aussi au niveau du NTS (Zheng *et al.*, 2005). Des souris déficientes pour la POMC, le MC3R ou le MC4R deviennent obèses (Huszar *et al.*, 1997 ; Yaswen *et al.*, 1999 ; Butler *et al.*, 2000) ce qui soulignent l'implication de ce système dans la régulation de la prise de poids. De même, l'activation ou l'inhibition des neurones POMC par des techniques d'optogénétique ou DREADD (Designer receptor exclusively activated by a designer drug) entraîne respectivement une réduction ou une augmentation de la prise alimentaire. Ces modifications soulignent le rôle de ces neurones dans une régulation à long terme du comportement alimentaire (Aponte

et al., 2011 ; Atasoy *et al.*, 2012). Il apparaît aussi une réduction de la prise alimentaire chez des souris à jeun recevant des injections icv de CART dont le récepteur et le mode d'action restent à ce jour à préciser (Lakatos *et al.*, 2005).

*** les neurones qui co-expriment le NPY (Neuropeptide Y) et l'AgRP (Agouti-related peptide).**

Ces neurones sont essentiels également à la régulation de la prise alimentaire. Lorsqu'ils sont stimulés par des hormones périphériques telles que la ghréline, l'adiponectine, la corticostérone ou encore par une chute de la glycémie, une augmentation de la prise alimentaire voire une augmentation du poids corporel sont notées (Cowley *et al.*, 2003 ; Leibowitz et Wortley, 2004 ; Aponte *et al.*, 2011). La fixation de la ghréline sur son récepteur GHSR-1a stimule la voie de signalisation Akt-AMPK aboutissant à l'activation des différents facteurs de transcription et conduisant à l'augmentation de l'expression du NPY et de l'AgRP (Lodeiro *et al.*, 2011 ; Velásquez *et al.*, 2011). Des souris adultes déficientes pour ces deux peptides ou l'ablation de leurs expressions deviennent hypophagiques et montrent une diminution de la prise alimentaire, du poids corporel et des dépôts graisseux (Luquet *et al.*, 2005 ; Bewick *et al.*, 2005 ; Gropp *et al.*, 2005 ; Aponte *et al.*, 2011). Ces différents résultats soulignent le rôle prédominant de l'AgRP dans la régulation du comportement alimentaire, alors que celui du NPY reste un peu moins spécifique. En effet, l'ablation de l'expression du NPY chez des souris adultes n'a pas d'effet notable sur la prise alimentaire, bien qu'une diminution du poids corporel à long terme est observée (Ste Marie *et al.*, 2005). L'activation des neurones AgRP/NPY augmente la motivation dans des expériences de conditionnement opérant pour la recherche de nourriture (Krashes *et al.*, 2011 ; Pandit *et al.*, 2014). Les projections des neurones AgRP/NPY sont très similaires à celles des neurones POMC/CART. Ainsi, l'AgRP se fixe également sur les récepteurs MC3R et MC4R et antagonise les effets de l' α -MSH (Haskell-Luevano *et al.* 1999 ; Hagan *et al.*, 2000). Toutefois, les fonctions de ces deux récepteurs apparaissent distinctes ; des souris déficientes pour MC4R deviennent hyperphagiques et obèses alors que des souris déficientes pour MC3R présentent une augmentation de leur masse grasse avec un poids corporel comparable aux souris contrôles (Huszar *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 2000 ; Atalayer *et al.*, 2009). Le NPY, quant à lui, exerce son action au niveau central par l'intermédiaire de cinq récepteurs Y1, Y2, Y4, Y5 et y6 (Higushi, 2012) et ce avec des affinités variables. Ainsi, Y1 et Y5 que l'on retrouve plus particulièrement au niveau de l'ARC et du PVN sont régulés positivement par le comportement alimentaire et on peut noter que l'injection icv d'antagonistes dirigés contre ces récepteurs réduit les effets orexigènes du NPY (Marsh *et al.*, 1998 ; Pedrazzini *et al.*, 1998). Ces neurones NPY/AgRP libèrent également du GABA qui exerce une action inhibitrice sur les neurones POMC/CART

(Cowley *et al.*, 2001). De plus, l'action orexigène des neurones NPY/AgRP ferait également intervenir des projections GABAergiques vers le noyau parabrachial (PBN). Enfin, il a été montré que le NPY en plus de stimuler la prise alimentaire et de réduire la dépense énergétique intervient également dans la régulation de la thermogenèse via les récepteurs Y1 des neurones du PVN. Au final, le NPY réduit l'innervation sympathique vers le tissu adipeux brun entraînant une baisse de la température (Shi *et al.*, 2013).

* **les neurones à GHRH (growth-hormone releasing hormone).** Ces neurones stimulent la sécrétion de l'hormone de croissance (GH, Growth Hormone) *via* leurs projections vers l'adénohypophyse (Fodor *et al.*, 1994) et sont sous le contrôle inhibiteur des neurones à somatostatine (SRIF) de l'aire périventriculaire. La GH conduit à la libération d'IGF-1 par le foie (*cf* 1.3.2). L'ensemble forme l'axe somatotrope (Brazeau *et al.*, 1973 ; Rivier *et al.*, 1982 ; Fodor *et al.*, 1994). Le NPY exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de GHRH par une action stimulatrice sur les neurones SRIF *via* les récepteurs Y1 (Raposinho *et al.* 2001 ; Fodor *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2014) et de la CART qui exerce un effet stimulateur (Stanley *et al.*, 2001). Par ailleurs, les IGFs périphériques exercent un rétrocontrôle négatif sur les neurones GHRH, alors que la ghréline, sécrétagogue naturel de GH, exerce un effet stimulateur (Kojima *et al.*, 1999 ; Seoane *et al.*, 2003 ; Osterstock *et al.*, 2010). L'activation de cet axe module indirectement la prise alimentaire par une action sur le métabolisme énergétique (*cf* 1.3.2).

b) Le Noyau Paraventriculaire (PVN)

Le Noyau Paraventriculaire (PVN) est localisé dans la partie supérieure adjacente au troisième ventricule. Il est composé de deux grandes populations distinctes : les neurones parvocellulaires (« petites cellules ») et les neurones magnocellulaires (« grande cellules »).

Les neurones parvocellulaires comprennent en particulier les neurones à corticolibérine (CRH, corticotropin releasing hormone) et les neurones à TRH (thyrotropin-releasing hormone). Les cibles des neurones parvocellulaires sont le NTS, le noyau moteur dorsal du nerf vague et la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière (Saper *et al.*, 1976 ; Swanson, 1977). Ils participent ainsi indirectement à la régulation sympathique des tissus adipeux blanc et brun, du pancréas et du foie (voir revue Hill, 2012). Ils reçoivent les projections des neurones POMC/CART et NPY/AgRP qui mettent en jeu les récepteurs MC4R et Y1 (Cone *et al.*, 2001 ; Bouret *et al.*, 2004). Alors que l' α -MSH agit aussi bien sur les neurones parvo et magnocellulaires, les neurones NPY innervent directement les neurones parvocellulaires (Cone, 2005 ;). Des expériences de lésions réalisées chez des rats ont montré que ce noyau joue un rôle essentiel dans le contrôle de la prise alimentaire (Leibowitz *et al.*, 1981), car les animaux

deviennent obèses et hyperphagiques. Ce contrôle met en jeu différents circuits longtemps considérés comme secondaires dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Dans ce cadre, les neurones à CRH et TRH participent de manière directe à ce type de régulation.

* **Les neurones à CRH** font partie intégrante de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HHS) impliqué dans la réponse métabolique à la situation de stress et par conséquent dans la régulation de la prise alimentaire. L'injection de CRH en intracérébroventriculaire diminue la prise alimentaire, la dépense énergétique et la thermogenèse et augmente l'activité locomotrice (Heinrichs et Richard, 1999 ; Richard *et al.*, 2002 ; Cerri et Morrison, 2006). La ghréline est capable d'activer, par un mécanisme qui reste à déterminer, les neurones à CRH conduisant à une augmentation des concentrations de glucocorticoïdes plasmatiques (Cabral *et al.*, 2012). Les neurones à CRH sont également stimulés par des afférences catécholaminergiques du tronc cérébral en réponse entre autre à l'hypoglycémie (Khan *et al.*, 2011). Les actions du CRH sur la prise alimentaire font intervenir les récepteurs CRH1 et 2 que l'on retrouve dans de nombreuses régions du cerveau (Van Pett *et al.*, 2000) ; en effet, des injections intracérébroventriculaire d'antagonistes pour ces récepteurs annulent la réduction de la prise alimentaire induite par le stress (Sekino *et al.*, 2004).

* **Les neurones à TRH** participent au contrôle du métabolisme *via* l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien. Des injections intracérébroventriculaires de TRH inhibent la prise alimentaire soulignant leur rôle anorexigénique dans l'homéostasie énergétique (Gotoh *et al.*, 2007). Les hormones thyroïdiennes sont essentielles dans le contrôle de la thermogenèse, elles aident à maintenir la synthèse protéique et l'activité métabolique des tissus périphériques. L'absence totale d'hormones thyroïdiennes entraîne une diminution de 30% de la thermogenèse obligatoire (Silva, 2003). Le NPY réduit l'expression et la libération de TRH alors que la leptine, l' α MSH et CART augmentent son expression (Ghamari-Langroudi *et al.*, 2010 ; Vella *et al.*, 2011). La leptine agirait directement sur l'expression et la libération de TRH. En effet, des animaux à jeun traités par des injections systémiques de leptine montrent des concentrations de TRH et d'hormones thyroïdiennes similaires à celles d'animaux nourris *ad libitum* (Légradi *et al.*, 1997 ; Chan *et al.*, 2002) soulignant l'implication de la leptine dans le métabolisme énergétique *via* différentes structures hypothalamiques.

Les neurones magnocellulaires comprennent les neurones à vasopressine et les neurones à ocytocine. Ces derniers sont surtout décrits pour moduler certains processus en lien avec la fonction de reproduction (naissance, lactation et comportement maternel). Ces actions font intervenir son récepteur que l'on retrouve dans de nombreuses régions cérébrales dont

l'amygdale, le VMN, le DMN et le NTS (Gould et Zingg, 2003). Les neurones à ocytocine projettent vers la neurohypophyse où l'ocytocine est libérée dans la circulation générale. Un autre groupe de neurones à ocytocine se projette vers le NTS et l'area postrema et participe à la régulation de la balance énergétique (Arletti *et al.*, 1990 ; de Kock *et al.*, 2003 ; Onaka *et al.*, 2012). En effet, des injections intrapéritonéales ou intracérébroventriculaires d'ocytocine induisent une diminution de la prise alimentaire (Arletti *et al.*, 1990 ; Blevins *et al.*, 2003). Cet effet semble faire intervenir la cholecystokinine (CCK), car l'injection d'antagoniste du récepteur de l'ocytocine en intracérébroventriculaire réduit l'effet satiétogène de la CCK et augmente le nombre et la taille des repas (Blevins *et al.*, 2003).

c) L'aire hypothalamique latérale (LHA)

L'aire hypothalamique latérale est une région hypothalamique moins structurée que les noyaux précédents. Elle est localisée au niveau de la partie latérale de la région tubérale médiane de l'hypothalamus (entre le fornix et le 3^{ème} ventricule). Les expériences de lésions ciblant la LHA ont montré son implication dans le comportement alimentaire. En effet, les animaux lésés deviennent hypophagiques. Cela a conduit à qualifier cette région de « centre de la faim » (Anand et Brobeck, 1951 ; Stellar, 1954). Au sein de cette zone vont se distinguer deux populations neuronales impliquées dans l'homéostasie énergétique. Ces deux populations neuronales envoient des projections vers de nombreuses régions cérébrales pour moduler diverses réponses comportementales liées à l'apprentissage, à la mémoire, aux émotions, à la motivation et aussi des réponses motrices liées aux changements de l'état énergétique (Broberger *et al.*, 1998). La LHA comprend deux populations neuronales impliquées directement ou indirectement dans le contrôle de la prise alimentaire.

* **les neurones à orexines ou hypocretines (ORX).** Il existe deux formes peptidergiques d'orexine, l'orexine A (ou hypocréline 1) et l'orexine B (ou hypocréline 2) dérivés du gène de la prepro-orexine (de Lecea *et al.*, 1998 ; Sakurai *et al.*, 1998). L'expression de ces peptides est stimulée par le jeûne, les neurones NPY/AgRP et les signaux orexigènes comme la ghréline (Sakurai *et al.*, 1998 ; Yamanaka *et al.*, 2003). Ces peptides exercent leurs actions *via* les récepteurs OX1R et OX2R qui sont largement exprimés dans le cerveau (Tsujino et Sakurai, 2009), mais avec une distribution sensiblement différente. Ainsi, l'OX1R est décrit dans le VMN, l'hippocampe, le noyau dorsal du raphé et le locus coeruleus, alors que l'OX2R est retrouvé au niveau du PVN, dans les circuits mésolimbiques (VTA et noyau accumbens) ou encore dans le thalamus (Trivedi *et al.*, 1998 ; Narita *et al.* 2006). L'action des orexines sur le comportement alimentaire inclut également la stimulation des neurones à mélanocortines (MCH) et l'inhibition des neurones glucosensibles du VMN (Shiraishi *et al.*, 2000 ; van den Pol *et al.*,

2004). Outre le rôle stimulateur des orexines sur les circuits homéostatiques de la prise alimentaire, elles interviennent également dans les comportements de récompense alimentaire et de motivation alimentaire qui font appel aux circuits hédoniques. Cette action fait intervenir la projection des neurones orexines de la LHA vers la VTA qui apparaissent indispensables à l'action de la ghréline sur les circuits hédoniques (Fadel et Deutch, 2002 ; Choi *et al.*, 2010 ; Perello *et al.*, 2010). Les neurones à orexines modulent également la dépense énergétique en stimulant l'activité locomotrice. En effet, des injections intracérébroventriculaires d'orexines stimulent l'activité locomotrice par une action indirecte sur les récepteurs dopaminergiques D1 et D2, la libération de sérotonine et les récepteurs centraux $\alpha 1$ adrénergiques (Hagan *et al.*, 1999; Ida *et al.*, 1999 ; Nakamura *et al.*, 2000 ; Duxon *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 2002).

*** les neurones à MCH (melanin-concentrating hormone).** A l'image des neurones ORX, les neurones MCH sont modulés par les neurones POMC/CART du noyau arqué et par la diminution de la glycémie (Ellias *et al.*, 1998 ; Bouret *et al.*, 2004). La MCH est impliquée dans de plusieurs fonctions dont l'homéostasie énergétique, le cycle veille-sommeil ou les émotions (Yumiko *et al.*, 2008 ; Torterolo *et al.*, 2009). Elle agit par l'intermédiaire des récepteurs MCH1R et MCH2R (Hill *et al.*, 2001 ; Sailer *et al.*, 2001). Les études utilisant des souris transgéniques ont montré que ce neuropeptide est non seulement impliqué dans la régulation de la prise alimentaire, le poids corporel, le métabolisme de base mais également l'activité physique. En effet, les souris déficientes pour le gène montrent une hypophagie nocturne, une diminution des dépôts adipeux, une augmentation du métabolisme de base et une activité physique nocturne accrue (Shimada *et al.*, 1998 ; Whiddon et Palmiter, 2013). Au contraire, l'injection intracérébroventriculaire de MCH chez le rat entraîne une augmentation de la prise alimentaire en particulier une augmentation de la motivation à consommer du glucose (Qu *et al.*, 1996 ; Sakimaki *et al.*, 2005). Cette action souligne l'implication des neurones à MCH dans l'élaboration des comportements motivés, ce qui est soutenu par les projections qu'entretiennent ces neurones avec le noyau accumbens (Guyon *et al.*, 2009 ; Sears *et al.*, 2010).

d) Le noyau dorsomédian (DMN)

Le noyau dorsomédian (DMN) est situé dans la région tubérale médiane dorsalement par rapport au VMN et caudalement par rapport au PVN. Dès 1963, les expériences de lésions du noyau dorsomédian (DMN) ont montré que ce noyau intervenait dans l'homéostasie énergétique, car elles conduisent à une hypophagie, une perte de poids, une hypodipsie et une diminution de la croissance linéaire (Bernardis *et al.*, 1963). La stimulation électrique de

ce noyau a montré qu'il est aussi impliqué dans la régulation de la température corporelle impliquant le tissu adipeux brun (Freeman et Wellman, 1987). Le DMN contient plusieurs populations neuronales synthétisant plusieurs neuropeptides tels que le NPY, la CCK ou encore le CRH et exhibant les récepteurs tels que CCK-1, MC4R, Y1, Y5 ou le récepteur de la leptine (voir Revue Bi *et al.*, 2012). Toutefois, il apparaît que les neurones exprimant le NPY soient les plus abondants et qu'ils projettent au niveau de différents noyaux hypothalamiques (Guan *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 2013). Bien qu'exprimant le même neuropeptide que certains neurones de l'ARC, ils se distinguent par le fait qu'ils sont indépendants la leptine circulante pour laquelle ils n'expriment pas le récepteur (Bi *et al.*, 2003). De plus, l'expression du NPY dans le DMN est augmentée dans certains modèles de rongeurs obèses, mais pas chez des souris déficientes pour la leptine (Kesterson *et al.*, 1997 ; Guan *et al.*, 1998). Des expériences de knockdown chez des rats ont montré que ces neurones sont impliqués dans la prise alimentaire nocturne et cette fonction implique les projections des neurones à MCH vers le NTS et le noyau dorsal moteur du nerf vague (Moran et Kinzig, 2004 ; Yang *et al.*, 2009). Ces expériences ont également montré que l'implication des neurones NPY du DMN dans la thermogenèse fait intervenir une innervation sympathique du tissu adipeux brun (Chao *et al.*, 2012). Enfin, la diminution de son expression entraîne une plus grande sensibilité à l'insuline et une meilleure tolérance au glucose associée à une transformation des adipocytes bruns en adipocytes blanc (Chao *et al.*, 2012).

e) Le noyau ventromédian (VMN)

Le noyau ventromédian (VMN) adjacent à l'ARC dans la zone tubérale constitue le plus grand ensemble cellulaire de cette zone. Il a longtemps été qualifié de centre de satiété. Des lésions plus ou moins étendues sont responsables d'une hyperphagie qualifiée de voracité (les rats mangent deux à trois fois les rations normales dans les jours suivant les lésions). Ce rôle, toutefois, a été remis en question par le fait que ce phénotype impliquerait plus particulièrement les neurones plus dorsaux localisés dans le PVN. (King *et al.*, 2006). Le DMN est innervé aussi bien par des neurones hypothalamiques du PVN et de la LHA que par des neurones extrahypothalamiques incluant provenant le noyau parabrachial et le NTS. De plus, différents récepteurs hormonaux sont exprimés incluant les récepteurs à la leptine (ObRb), à la ghréline (GHSR1a) ou au glucagon-like peptide 1 (Elmqvist *et al.*, 1998 ; López *et al.*, 2008 ; Skibicka, 2013). Ce noyau contient des neurones sensibles au glucose (glucose-excited GE et glucose-inhibited GI) très bien caractérisés ainsi que des neurones exprimant des peptides comme le glutamate, le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ou le facteur stéroïdogénique 1 (SF-1) (Borg *et al.*, 1997 ; Kernie *et al.*, 2000 ; Dhillon *et al.*, 2006 ; Wang *et*

al., 2007 ; Tong *et al.*, 2007 ; Vong *et al.*, 2011). Ainsi, il a été montré des projections glutamatergiques vers les neurones POMC de l'ARC permettant leur régulation en fonction de l'état de la balance énergétique (Sternson *et al.*, 2005 ; Vong *et al.*, 2011). Le BDNF est lui aussi impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Les études utilisant des injections centrales de BDNF et celles utilisant des souris déficientes pour le BDNF ou son récepteur TrkB ont permis de montrer que ce neuropeptide est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire, du poids corporel mais aussi dans la dépense énergétique et la thermogenèse ; l'ensemble de ces actions ferait intervenir ces projections sur le PVN (Xu *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2007).

1.3.2. Régulation homéostatique de la prise alimentaire : hormones périphériques

La régulation du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire met en jeu différents types de signaux se distinguant non seulement par leur fonction spécifique, mais aussi leur origine. Ainsi nous détaillerons dans les points suivants les peptides issus du tractus gastro-intestinal. Puis nous détaillerons l'implication des hormones pancréatiques, des adipocytokines et d'autres hormones périphériques impliquées dans l'axe somatotrope et l'axe HHS.

a) Signaux gastro-intestinaux

Il existe de nombreux signaux gastro-intestinaux. Nous nous focaliserons en particulier sur la ghréline. Cette hormone est particulièrement évaluée sur le plan clinique dans l'anorexie mentale et constitue pour notre travail de thèse la cible hormonale sur laquelle nous nous sommes focalisés. Elle cible en particulier différentes structures centrales potentiellement impliquées dans la maladie (Fig. 10). Nous détaillerons plus succinctement le rôle de deux autres facteurs mis en avant dans la maladie mais moins étudiés : la cholecystokinine et le peptide YY.

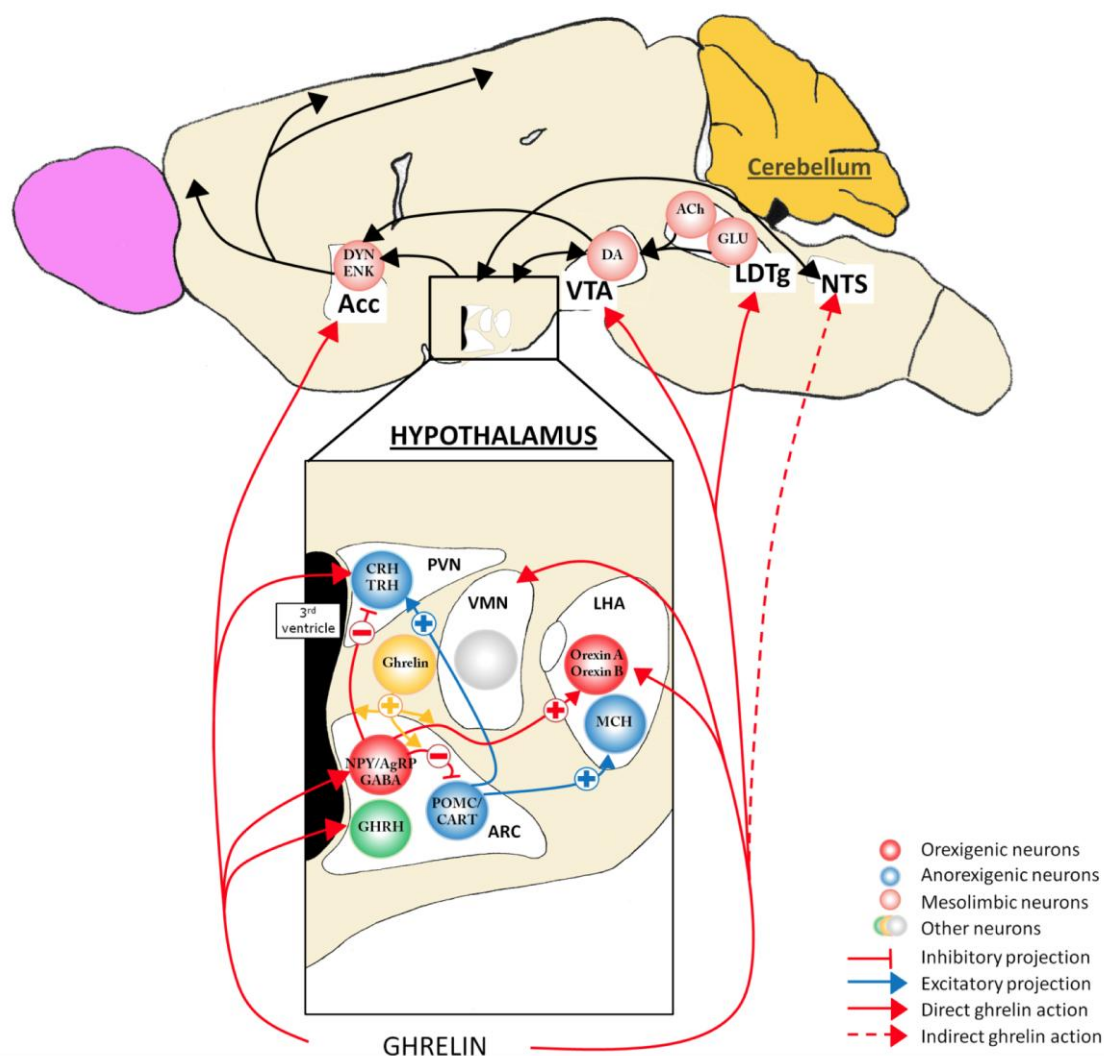


Figure 10. Cibles centrales de la ghréline dans la régulation du comportement alimentaire. Ac : Accumbens nucleus; ACh acétylcholine; AgRP agouti related peptide; ARC arcuate nucleus; CART cocaine- and amphetamine-regulated transcript; CRH corticotropin-releasing hormone; DA dopamine; DYN dynorphin; ENK enkephalin; GABA γ -aminobutyric acid; GHRH growth-hormone-releasing hormone; GLU glutamate; LDTg laterodorsal tegmental area; LHA lateral hypothalamic area; MCH melanin-concentrating hormone; NPY neuropeptide Y; NTS nucleus tractus solitarius; POMC pro-opiomelanocortin; PVN paraventricular nucleus; TRH thyrotropin releasing hormone; VMH: ventromedial nucleus; VTA: ventral tegmental area. (d'après Méquinion *et al.*, 2013).

*** La Ghréline : acyl-ghréline, des-acyl-ghréline et obestatine** La ghréline, principale hormone orexigène connue, est un peptide de 28 acides aminés exprimé majoritairement par les cellules glandulaires oxyntiques X/A localisées au niveau de la muqueuse du fundus stomacal sous la forme d'un ARNm : la préproghréline (Kojima *et al.*, 1999 ; Bordi *et al.*, 2000). La préproghréline constituée de 117 acides aminés est tout d'abord clivée par une

signal-peptidase puis sous l'action de la prohormone convertase 1/3 (PC 1/3), donne naissance à deux peptides : l'obestatine et la des-acylghréline (Zhu *et al.*, 2006). La des-acylghréline subit une modification post-traductionnelle consistant à l'ajout d'un groupement octanoyl sur le troisième acide aminé, habituellement une sérine. Cette modification est réalisée par la ghréline octanoyl-acyltransferase (GOAT) (Yang *et al.*, 2008) et donne la forme active de l'hormone capable de se fixer sur son récepteur GHSR (growth hormone secretagogue receptor) (Kojima *et al.*, 1999) (**Fig. 11**). Les pourcentages respectifs d'acylghréline et la des-acylghréline dans la circulation sanguine varient entre 10 à 25% et 75 à 95% (Pemberton et Richards, 2007 ; Hassouna *et al.*, 2014).

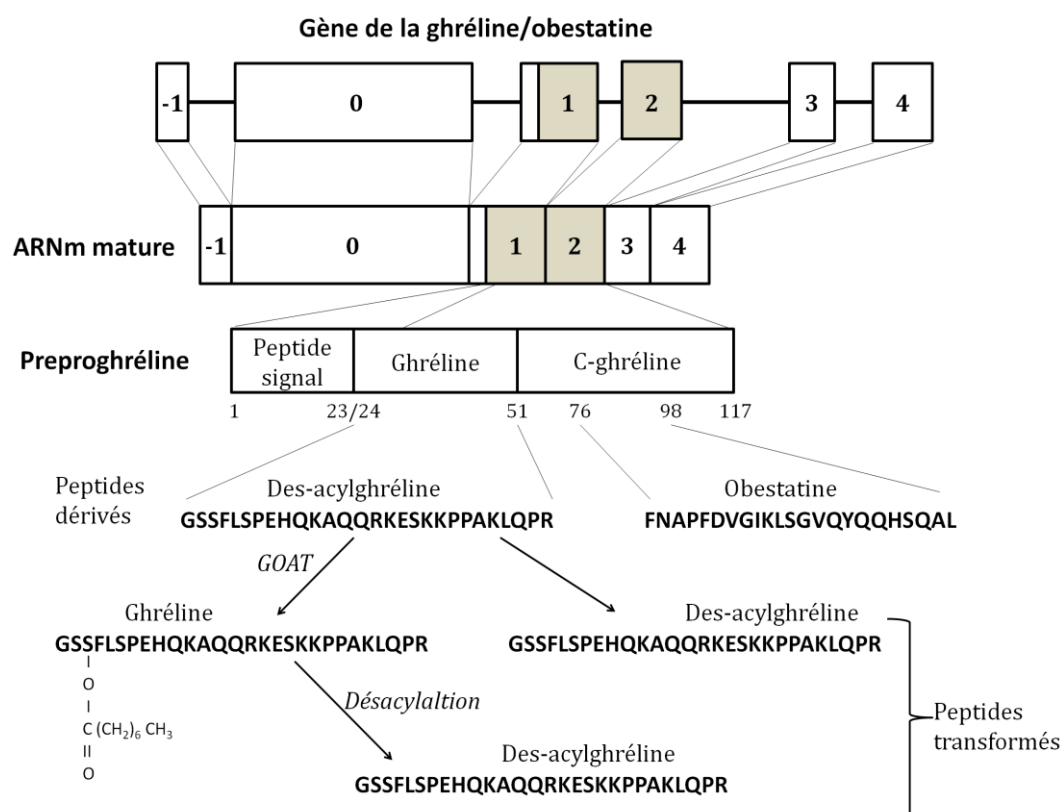


Figure 11 Organisation du gène de la ghréline/obestatine, de son transcrit et de la préproghréline. Les domaines protéolytiques donnant les fragments biologiquement actifs sont représentés. La ghréline subit une octanoylation par la ghrelin O-acyl transferase (GOAT). (D'après Perret *et al.*, 2014).

L'acyl-ghréline est la forme quantitativement minoritaire dans la circulation. Elle se fixe de manière spécifique sur les récepteurs GHSR qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés à une protéine G (G-protein coupled receptor family, GPCR). Le récepteur GHSR possède deux variants d'épissage : GHSR-1a, une forme longue (à sept domaines transmembranaires) capable de lier l'acyl-ghréline, et GHSR-1b, une forme tronquée

(possédant cinq domaines transmembranaires) (Howard *et al.*, 1996, Holst and Schwartz 2006 ; Gutierrez *et al.*, 2008). Comme beaucoup de GPCR, GHSR-1a et GHSR-1b sont capables de former des homo- et des hétéro-dimères pour exercer leur fonctions (Chow *et al.*, 2012). Le récepteur GHSR-1a est abondamment exprimé au niveau des organes et tissus périphériques et dans le système nerveux central. Les neurones exprimant le GHSR-1a sont localisés dans les circuits impliqués dans la régulation du comportement alimentaire (*cf supra*) et dans les structures méso-limbiques (Guan *et al.*, 1997; Gnanapavan *et al.*, 2002; Camiña 2006; Harrold *et al.*, 2008). Quant au récepteur GHSR1b, il présente une distribution comparable, mais intervient davantage dans la régulation de la translocation de GHSR1a vers la membrane (Howard *et al.*, 1996, Holst and Schwartz 2006).

L'acyl-ghréline est impliquée dans de multiples fonctions biologiques. La première fonction qui lui a été attribuée est sa capacité à stimuler la sécrétion de GH; elle est d'ailleurs considérée comme un sécrétagogue majeur de cette hormone hypophysaire. (Kojima *et al.*, 1999), elle-même impliquée dans l'homéostasie glucidique et la balance énergétique (**Tableau 3**).

Tableau 3 Effet de la GH endogène hypophysaire sur le métabolisme énergétique

Organe	Effets métaboliques
Actions directes	
Foie	Augmente la gluconéogenèse Augmente la protéolyse
Tissu adipeux	Diminue la lipogenèse Diminue la sensibilité à l'insuline Diminue la réponse à l'adénosine Augmente la lipolyse
Actions indirectes via IGF-1	
Muscles	Diminue l'utilisation du glucose Augmente l'utilisation des acides gras libres Induit une réduction de l'utilisation des acides aminés

(voir revue Renaville et Portetelle, 2002)

La fonction la plus connue de l'acyl-ghréline est la fonction orexigène par une action directe au niveau des neurones de l'ARC où elle stimule l'expression du NPY et de l'AgRP (Dickson et Luckman, 1997; Nakazato *et al.*, 2001 ; Cowley *et al.*, 2003). L'acyl-ghréline agit également directement et indirectement sur les neurones du PVN, du VMN et la LHA ainsi que sur le circuit méso-limbique pour moduler la prise alimentaire ainsi que la balance énergétique (Lopez *et al.*, 2008; Mano-Otagiri *et al.*, 2009; Skibicka *et al.*, 2011 ; Lamont *et al.*, 2012).

En périphérie, elle agit sur différents organes impliqués dans le métabolisme énergétique dont

le tissu adipeux blanc, le foie, le pancréas ou les muscles squelettiques. Ainsi, elle favorise le stockage des graisses, régule la glycémie et la sécrétion d'insuline (Cummings *et al.*, 2001 ; Tschop *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 2014). La ghréline agit directement sur le foie pour favoriser la glycogénolyse et l'augmentation de triglycérides, mais aussi sur le tissu adipeux blanc et les muscles squelettiques où elle stimule les enzymes impliquées dans la synthèse d'acides gras (Thompson *et al.*, 2004; Barazzoni *et al.*, 2005). Cette hormone apparaît indispensable dans le maintien de la glycémie chez les souris déficientes pour la ghréline, pour la GOAT ou le GHSR placées dans des conditions de restriction alimentaire (Grove et Cowley, 2005 ; Sun *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2010, McFarlane *et al.*, 2014). La ghréline est aussi impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la motilité gastro-intestinale, le rythme cardiaque et la pression artérielle ou l'inflammation, le sommeil, l'apprentissage, la mémoire, les comportements motivés, sur la prolifération cellulaire, la reproduction et la physiologie osseuse (voir revues Ferrini *et al.*, 2009 ; Veldhuis et Bowers, 2010 ; Stengel *et al.*, 2010)

La des-acyl-ghréline est la forme majoritaire dans la circulation sanguine. Son rôle exact est encore très débattu et fait l'objet de nombreuses polémiques. De nombreux arguments scientifiques supportent néanmoins le fait que cette forme serait métaboliquement active. Delhanty *et al.*, (2012) ont montré que la co-administration de des-acylghréline et d'acylghréline contrecarre les effets de l'acylghréline sur la sécrétion d'insuline et le métabolisme glucidique. Le mode d'action de la des-acyl-ghréline reste discuté car, à ma connaissance, aucun récepteur n'a pour le moment été identifié, bien qu'en condition supra-physiologique, il ait été montré une action *via* GHSR-1a (Delhanty *et al.*, 2012). Ainsi, plusieurs études contradictoires ont présenté des effets soit orexigènes, soit anorexigènes (Asakawa *et al.*, 2005). Toutefois, devant la multiplicité des protocoles tels que le type d'injection (intraveineux, intrapéritonéal, intracérébroventriculaire), l'état de satiété des animaux, le moment de l'injection et les doses utilisées, il reste à ce jour difficile à identifier le rôle exact de la des-acyl-ghréline sur la prise alimentaire. Concernant les autres actions de la des-acylghréline, elle serait associée à la régulation de la libération d'insuline et donc au contrôle de la glycémie (Broglia *et al.*, 2004 ; Gauna *et al.*, 2005; Qader *et al.*, 2008) et responsable d'une augmentation de l'adiposité médullaire et de l'accumulation de graisse viscérale (Thompson *et al.*, 2004 ; Rodriguez *et al.*, 2009). Comme la forme acylée, la des-acyl-ghréline est associée à la régulation de nombreuses fonctions, même si son rôle précis reste à déterminer dans la motilité gastrique (Asakawa *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2005b), la reproduction (Ariyasu *et al.*, 2005 ; Martini *et al.*, 2006) et dans la régulation cardiovasculaire (Tsubota *et al.*, 2004 ; Kleinz *et al.*, 2006).

L'obestatine est un peptide de 23 acides aminés issu de la maturation de la preprogréline suite à l'action de la PC 1/3 (**Figure 11**). Comme pour la de-acyl-gréline, ce peptide fait encore débat pour déterminer sa ou ses fonctions dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Il agirait *via* le récepteur GRP 39 qui appartient à la même sous famille que GHSR-1a (Zhang *et al.*, 2004 ; Chartrel *et al.*, 2007 ; Mokrosiński et Holst, 2010). Toutefois, aucune étude n'a montré l'activation de ce récepteur (Stengel *et al.*, 2009; Hassouna *et al.*, 2010; Mokrosiński et Holst, 2010; Veldhuis et Bowers, 2010). L'obestatine en plus de son effet controversé sur l'inhibition de la prise alimentaire (Zhang *et al.*, 2005 ; Hassouna *et al.*, 2012), agirait, également sur l'inhibition de la soif, la motilité gastrique, la survie cellulaire, la sécrétion d'hormones pancréatiques, la sommeil, la thermorégulation, la mémoire et l'anxiété (Szentirmai *et al.*, 2009; Hassouna *et al.*, 2010; Veldhuis et Bowers 2010).

* **La cholecystokinine (CCK)**. La CCK est synthétisée par les cellules endocrines de la partie proximale de l'intestin grêle, elle correspond à une autre hormone majeure impliquée dans la régulation de la prise alimentaire. La sécrétion de cette hormone est stimulée par le chyme alimentaire et plus précisément par les lipides et les protéines détectés par des récepteurs à la surface des cellules I (Douglas *et al.*, 1990 ; Lewis et Williams, 1990). La CCK est sécrétée principalement sous 2 formes : CCK-33 et CCK-8 (Polak *et al.*, 1975). Une sécrétion centrale de CCK-8 a également été montrée (Beinfeld *et al.* 1981). Ces peptides agissent par l'intermédiaire de 2 récepteurs CCK-1 et CCK-2 qui se distinguent par leur localisation. Le récepteur CCK-1 est retrouvé principalement au niveau du système gastro-intestinal alors que le récepteur CCK-2 est retrouvé au niveau du cerveau (Beinfeld et Palkovits, 1982 ; Wank *et al.*, 1992). La CCK exerce différentes fonctions au niveau du tractus gastro-intestinal (**Fig. 3**). Son rôle le plus connu est un effet anorexigène sur la prise alimentaire. Dès 1973, Gibbs *et al.*, montrent que des administrations de CCK-8 ou de CCK purifiée causent une diminution de la taille du repas, de manière dose dépendante, et que cet effet n'est observé que lorsque la CCK est injectée au début du repas (Gibbs *et al.*, 1997). Toutefois, cette hormone n'a pas d'effet à long terme sur le poids corporel. Des études comportementales ont ainsi montré que des traitements chroniques entraînent une réduction de la taille des repas associée à une augmentation de leurs fréquences (Crawley et Beinfeld, 1983 ; West *et al.*, 1987), effets également retrouvés lorsque les injections sont faites en intracérébroventriculaire. De plus, il a été montré que l'effet de la CCK transite *via* le nerf vague pour être transmis au NTS par activation de récepteurs CCK-1 au niveau du nerf vague et CCK-2 au niveau de l'area postrema. De plus, il a été montré que la CCK entraîne une activation des neurones POMC du NTS. A côté de ces actions de modulation de la prise alimentaire, la CCK a également des effets sur le

fonctionnement gastro-intestinal, sur le système cardiovasculaire mais aussi sur l'anxiété (Lovick, 2009 ; Daugé et Léna, 1998).

* **Le peptide YY (peptide tyrosine tyrosine, PYY)** est un autre peptide majeur sécrété par les cellules L de l'iléon et du colon (Adrian *et al.*, 1985). Il appartient à la famille des polypeptides pancréatiques dans laquelle on trouve aussi le neuropeptide Y (NPY) et le polypeptide pancréatique (PP). Deux isoformes du PYY ont été détectées dans la circulation sanguine : PYY₁₋₃₆ et PYY₃₋₃₆ (Grandt *et al.*, 1994) obtenues par un clivage par la dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) (Grandt *et al.*, 1994). Ces deux peptides vont se distinguer par l'affinité avec laquelle ils vont se fixer sur leurs récepteurs. En effet, PYY₁₋₃₆ se lie préférentiellement aux récepteurs Y1, Y2 et Y5 et PYY₃₋₃₆ aux récepteurs Y2 et Y5 (Holliday *et al.*, 2000 ; Keire *et al.*, 2000). Les effets de cette hormone sont doubles : soit une augmentation, soit une diminution de la prise alimentaire selon le site d'injection. Ainsi, il a été montré que des injections intracérébroventriculaires de PYY causent une augmentation de la prise alimentaire (Morley *et al.*, 1985 ; Hagan, 2002), alors que des injections périphériques conduisent à une diminution de la prise alimentaire (Marsh *et al.*, 1999 ; Riedigier *et al.*, 2004 ; Koda *et al.*, 2005) bien que ce dernier effet soit sujet à controverse (Tschöp *et al.*, 2004). Les actions de cette hormone feraient intervenir l'hypothalamus où l'on trouve le récepteur Y2 au niveau des neurones NPY/AgRP mais également le NTS et l'area postrema où l'on trouve les récepteurs de ce peptide. Cette action au niveau du tronc cérébral implique encore une fois le nerf vague (Hagan, 2002 ; Halatchev et Cone, 2005 ; Shi *et al.*, 2013).

b) Signaux pancréatiques

* **L'insuline.** L'insuline est un régulateur clé de l'homéostasie glucidique et ainsi une hormone modulatrice de la prise alimentaire. Elle a été identifiée en 1921 par Banting et Best comme une hormone sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (Sánchez-Lasheras *et al.*, 2010). Sa libération dans le sang suit les différentes phases de la prise alimentaire (phase céphalique, phase prandiale et phase post prandiale). Lors de la phase céphalique précédant l'arrivée du repas, la concentration plasmatique d'insuline augmente sous l'effet de la stimulation par le système nerveux autonome. Cette augmentation aurait pour but de préserver l'homéostasie sanguine en accélérant les processus d'absorption des molécules énergétiques du sang (Steffens *et al.*, 1986 ; Woods, 1991 Begg et Woods ; 2013) et empêcherait les effets « secondaires » liés à la prise alimentaire (afflux brutal de glucose). De même, elle est sécrétée durant les phases prandiales et post-prandiales toujours afin de réduire les concentrations plasmatiques de glucose, d'acides aminés et d'acides gras libres (Porte et Halter, 1981 ; Cook et Taborsky, 1990). Enfin, à long terme l'insuline intervient dans la

régulation de la balance énergétique. A l'image de la leptine, l'insuline est sécrétée en fonction de l'insulinorésistance et proportionnellement à la quantité de masse grasse (Woods *et al.*, 1974 ; Aucouturier *et al.*, 2009). L'action satiétogène de cette hormone passe par une action centrale en stimulant plus particulièrement les neurones POMC de l'ARC ainsi que les neurones du VMN (Havrankova *et al.*, 1978 ; Elmquist *et al.*, 1998). L'administration intracérébroventriculaire d'insuline induit une diminution de la prise alimentaire, ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique (Woods *et al.*, 1979 ; McGowan *et al.*, 1993). En périphérie, l'insuline stimule la capture du glucose sanguin par l'ensemble des cellules en induisant la translocation des transporteurs du glucose vers la membrane plasmique (Mueckler *et al.*, 1994) ainsi que la production de glycogène par stimulation de la glucokinase (Agius *et al.*, 2008). Ces actions sont régulées par son récepteur (InsR) qui est un récepteur de type cytokine. Il a la particularité d'être constitutivement dimérisé (Huang 2009) et est largement distribué aussi bien au niveau central que périphérique (Havrankova *et al.*, 1978 ; Corp *et al.*, 1986 ; McGowan *et al.*, 1993).

* **Le polypeptide pancréatique (PP).** Il appartient à la famille des peptides pancréatiques et est sécrété sous la forme d'un peptide de 36 acides aminés principalement par les cellules endocrines F du pancréas, mais également par des cellules endocrines de l'intestin grêle et du gros intestin. Cette hormone est libérée après le repas et exerce différentes fonctions périphériques et centrales par une action sur des récepteurs communs au NPY et au PYY avec des affinités spécifiques selon le ligand (Cox, 2007; Alexander *et al.*, 2011). Le PP se lie préférentiellement au récepteur Y4 localisé en particulier dans le NTS, l'AP, l'hypothalamus (l'ARC et le PVN) ou l'amygdale (Parker et Herzog, 1999). Récemment, il a été montré que PP agissait aussi au niveau central sur un autre récepteur de la même famille, le récepteur y6 (Yulyaningsih *et al.*, 2014). Très tôt, il a été suspecté un rôle inhibiteur de PP sur la prise alimentaire (Malaisse-Lagae *et al.*, 1977 ; Batterham *et al.*, 2003) et dans le contrôle du poids corporel (Ueno *et al.*, 1999). Ces fonctions impliquent les récepteurs Y4 et y6. Ainsi, des souris KO-Y4 présentent une augmentation de la prise alimentaire nocturne (Edelsbrunner *et al.*, 2009), alors que des souris KO-y6 présentent une réduction du poids corporel, de la masse grasse et de la masse maigre associée à une altération de la sécrétion de GH et d'IGF-1 (Yulyaningsih *et al.*, 2014). Mis à part ces fonctions, le PP est impliqué dans le contrôle des comportements anxieux et dépressifs (Painsipp *et al.*, 2008; Tasan *et al.*, 2009) probablement par activation des récepteurs Y4 au niveau de l'hypothalamus et de l'amygdale (Tasan *et al.*, 2009).

* **L'amyline.** C'est un peptide de 37 acides aminés produit par les cellules β du pancréas et

co-sécrété avec l'insuline en réponse à la présence de nutriments dans le tractus gastro-intestinal (Ogawa *et al.*, 1990, Lutz, 2010). Ce peptide agit grâce à l'amylin receptor (AMY) qui résulte de la dimérisation d'un récepteur « calcitonin » (CTR) avec un récepteur « activity modifying protein » (RAMP) (Beaumont *et al.*, 1993 ; Paxinos *et al.*, 2004). Ce récepteur est retrouvé dans de nombreuses régions du système nerveux central où l'amyline exerce sa principale fonction de contrôle de la balance énergétique (Chapman *et al.*, 2007) entre autre sur le NTS, l'hypothalamus (PVN, VMN et DMN) et sur les structures mésolimbiques (noyaux accumbens et VTA) (Sexton *et al.*, 1994 ; Hilton *et al.*, 1995). Des injections centrales d'amyline ou d'agonistes d'AMY entraînent une diminution de la prise alimentaire associée à une augmentation de la thermogénèse et une diminution du quotient respiratoire, témoin d'une oxydation des lipides (Wielinga *et al.*, 2010 ; Fernandes-Santos *et al.*, 2013 ; Mietlicki-Baase *et al.*, 2014). On peut souligner aussi le fait que l'hypophagie observée est également retrouvée suite à l'activation seule des récepteurs AMY au niveau de la VTA (Mietlicki-Baase *et al.*, 2014).

* **Peptides dérivés du pro-glucagon.** Le glucagon, le glucagon-like peptide -1 (GLP-1) et le glucagon-like peptide -2 (GLP-2) sont tous les trois dérivés d'un même gène : le pre-proglucagon exprimé au niveau des cellules α du pancréas, des cellules L de l'intestin et du NTS (voir revue Kieffer et Habener, 1999). Alors que le glucagon subit sa maturation au niveau du pancréas, GLP-1 et GLP-2 sont produits au niveau de l'intestin et du NTS par clivage protéolytique (Bell *et al.*, 1983 ; Larsen *et al.*, 1997). En plus de son action hyperglycémiant favorisant la glycolyse qui l'oppose souvent à l'insuline, le glucagon réduit la taille du repas quand il est administré en périphérie (Salter, 1960 ; 1993 ; Geary, 1998). Ainsi, le blocage de l'action du glucagon augmente la prise alimentaire (Langhans, 1982 ; Le Sauter *et al.*, 1991). De même, GLP-1 réduit la prise alimentaire en agissant au niveau du PVN et du circuit méso-limbique (McMahon et Wellman, 1997 ; 1998 ; Tang-Christensen *et al.*, 2001 ; Dickson *et al.*, 2012). Les effets de GLP-2 sur la prise alimentaire sont peu clairs et restent à ce jour controversés. Tang-Christensen *et al.*, (2000) ont montré une diminution de la prise alimentaire suite à des injections intracérbroventriculaires de GLP-2 chez le rat (Tang-Christensen *et al.*, 2000) alors que des injections périphériques chez l'Homme n'aboutissent pas à cet effet (Sorensen *et al.*, 2003 ; Schmidt *et al.*, 2003). Toutefois, le récepteur GLP-2R au niveau des neurones POMC hypothalamiques serait essentiel dans le contrôle de la prise alimentaire par ce peptide (Guan *et al.*, 2012).

c) Adipocytokines

Les adipocytokines forment un ensemble d'hormones libérées par les adipocytes jouant

un rôle non négligeable dans la régulation de la prise alimentaire.

* **La leptine.** Cette hormone est un acteur majeur dans la régulation de l'homéostasie énergétique et elle est souvent opposée à la ghréline de par les actions qu'elles exercent toutes deux et qui les opposent. Dès 1977, Liebel propose un modèle mathématique d'un signal lipidique proportionnel au volume d'adipocytes qui informerait le cerveau. Ce modèle s'appuie sur les travaux de Coleman qui en 1973 réalise des parabioses de souris obèses présentant des mutations spontanées (*ob/ob* et *db/db*). Ces travaux suggèrent à l'époque l'existence d'un signal circulant « d'embonpoint » qui dépendrait d'un côté du gène *db* codant pour le facteur circulant et du gène *ob* codant pour le récepteur. Il a fallu attendre 1994 avec l'identification du gène de la leptine (Zhang *et al.*, 1994) et en 1995 pour l'identification de son récepteur et ses différentes isoformes (Tartaglia *et al.*, 1995). Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de cytokine de classe I. Il existe différents variants d'épissage donnant naissance à 6 isoformes regroupées en trois catégories : le récepteur soluble (ObRe ne possède ni domaine transmembranaire, ni domaine intracellulaire), les récepteurs de forme courte (ObRa, c, d et f possèdent un domaine intracellulaire tronqué) et le récepteur de forme longue (ObRb est le seule à posséder un domaine intracellulaire complet) (Lee *et al.*, 1996). La majorité de l'action de la leptine est exercée grâce au récepteur ObRb qui entraîne une transduction impliquant la voie JAK/STAT (Ihle et Kerr, 1995 ; Vaisse *et al.*, 1996 ; Bjorbaek *et al.*, 1997 ; Benomar *et al.*, 2005b).

Ainsi, la leptine, hormone peptidique de 167 acides aminés sécrétée principalement par les tissus adipeux (Green *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994), exerce son action de régulateur de l'homéostasie énergétique au niveau central et au niveau périphérique. L'action anorexigène de la leptine s'exerce principalement au niveau de l'hypothalamus où elle stimule les neurones POMC/CART et inhibe les neurones NPY/AgRP de l'ARC (Schwartz *et al.*, 1996 ; 1997 ; Cowley *et al.*, 2001). La leptine agit également sur d'autres noyaux hypothalamiques comme le PVN ou le VMN qui interviennent comme vu précédemment dans le métabolisme énergétique. Des cibles extra-hypothalamiques ont également été identifiées dont la VTA où des injections intra-VTA induisent une diminution de la prise alimentaire (Morton *et al.*, 2009). Il est également que la leptine soit impliquée dans la dépense énergétique. Des animaux traités de façon chronique par de la leptine montrent une augmentation de la dépense énergétique et de l'activité ambulatoire associées une diminution du quotient respiratoire (Morton *et al.*, 2010) mais les mécanismes d'action restent à préciser. Au niveau central, la leptine est également dans le développement cérébral et dans la fonction reproductrice (Bouret *et al.*, 2004 ; Delahaye *et al.*, 2008 ; Bellefontaine *et al.*, 2014).

Outre ses effets centraux, la leptine exerce de nombreuses actions sur les organes périphériques impliqués dans le métabolisme énergétique (**Tableau 4**). Là encore, la leptine s'oppose aux actions de la ghréline. Au niveau du foie, elle stimule la néoglucogenèse et inhibe la formation des triglycérides. Elle stimule l'absorption du glucose par des muscles squelettiques. Elle inhibe l'accumulation des triglycérides et stimule la lipolyse et la thermogenèse par les tissus adipeux (Margetic *et al.*, 2002).

Tableau 4 Action de la leptine sur les organes périphériques

Organe	Effets métaboliques
Foie	Stimule la néoglucogenèse Inhibe la synthèse de triglycérides
Pancréas	Stimule la production d'insuline
Muscles squelettiques	Stimule le transport du glucose Stimule l'expression de UCP2 et UCP3
Tissus adipeux	Inhibe l'accumulation de triglycérides Stimule la lipolyse Stimule la thermogenèse
Tractus gastro-intestinal	Favorise l'absorption des nutriments
Utérus	Participe à la croissance fœtale et au métabolisme
Glandes mammaires	Participe au développement des structures
Sang	Hématopoïèse

(voir revue Margetic *et al.*, 2002)

* **L'adiponectine.** Egaleme nt appelée « gelatin-binding protein 28, adipocyte complement related protein 30 (Acrp30) » ou « adipose most abundant gene transcript 1 (apM1) » ou encore « adipoQ », l'adiponectine est une autre cytokine majeure du tissu adipeux. C'est un peptide de 244 acides aminés découvert par plusieurs équipes en parallèle (Dridi et Taouis, 2009) appartenant à la famille du complément 1q. On le retrouve dans le plasma sous trois formes multimériques : monomérique formé d'un domaine collagène N-terminal et d'un domaine globulaire C-terminal qui s'assemblent pour donner des dimères ou des trimères de poids moléculaire moyen ou des complexes de haut poids moléculaire (HMW) (Waki *et al.*, 2003). Il apparait, toutefois, que la forme HMW serait la plus active sur le plan clinique (Dridi et Taouis, 2009). L'adiponectine se fixe sur deux types de récepteurs Adipo-R1 et Adipo-R2 qui sont tous deux des récepteurs à couplés à une protéine G (GPCR) (Kadowaki et Yamauchi, 2005.). Ces récepteurs sont retrouvés au niveau des organes et des tissus périphériques (e.g.

foie, muscle squelettique, tissus adipeux, macrophage) mais également au niveau du système nerveux central et plus particulièrement au niveau de l'ARC et du PVN (Guillod-Maximin *et al.*, 2009). Ces deux récepteurs se distinguent par la voie de signalisation qui suit leur activation (voir Yamauchi *et al.*, 2014) qui met en jeu des acteurs communs à ceux de la signalisation de la leptine et de l'insuline (voir Yamauchi *et al.*, 2014). Toutefois, les effets de l'adiponectine sur le comportement alimentaire apparaissent contradictoires voire opposés (Shklyayev *et al.*, 2003 ; Coope *et al.*, 2008 ;). De même, des effets opposés ont été montrés quant à son effet sur la dépense énergétique (Qi *et al.*, 2004 ; Kubota *et al.*, 2007 ; voir Dridi et Taouis, 2009).

Ce peptide sécrété en proportion inverse des graisses corporelles, est principalement connu pour ses actions périphériques. Au niveau des muscles squelettiques, l'adiponectine induit une augmentation du catabolisme des lipides et réduit le contenu en triglycérides et améliore la sensibilité à l'insuline. Elle a également une action sur la capture du glucose *via* la phosphorylation de l'AMPK ; en parallèle, elle stimule l'oxydation des acides gras et la production du lactate par les myocytes. Au niveau du foie, l'adiponectine diminue la glucogénèse *via* la réduction de l'expression des enzymes impliquées dans sa synthèse (PEPCK et glucose-6-phosphatase). Enfin, elle stimule l'oxydation des acides gras et le contenu en triglycérides. Au niveau des adipocytes, l'adiponectine stimule aussi l'AMPK impliqué dans la capture du glucose (voir Dridi et Taouis, 2009).

* **Autres adipocytokines.** Il existe d'autres adipocytokines impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire, mais aussi et surtout pour leur rôle dans les réactions inflammatoires. Ces adipocytokines, comme le TNF α , l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-7 (IL-7) ou encore la résistine, participent indirectement au métabolisme énergétique (voir Tableau 5). Brièvement, le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les macrophages mais aussi par les adipocytes matures (Kriegler *et al.*, 1988 ; voir revue Vissoci Reiche, 2004). Cette cytokine inhibe la lipogénèse, stimule la lipolyse, augmente la sécrétion de leptine, réduit la sécrétion d'adiponectine et réduit de signalisation de l'insuline (Moller, 2000). Lorsqu'elle est injectée au niveau central ou au niveau périphérique, le TNF α entraîne une diminution de la prise alimentaire (De Souza *et al.*, 2005 ; de Kloet *et al.*, 2011 ; Thaler *et al.*, 2012). Le TNF α est souvent associé à la cachexie qui est un état pathologique caractérisé par une perte de poids associée à une anorexie, une faiblesse, une anémie et une asthénie.

L'IL-6 est une cytokine sécrétée par le système immunitaire mais aussi par le tissu adipeux voire par les muscles squelettiques (Mohamed-Ali *et al.*, 1997 ; Ostrowski *et al.*, 1998). Au niveau du foie, des tissus adipeux et des muscles squelettiques, l' IL-6 inhibe la transduction du signal de l'insuline, augmente la lipolyse et la capture du glucose (Senn *et al.*, 2003 ;

Al-Khalili *et al.*, 2006 ; Wueest *et al.*, 2014). L'IL-6 et son récepteur sont retrouvés au niveau de l'hypothalamus et plus particulièrement au niveau du PVN. Des injections chroniques en intracérébroventriculaire d'IL-6 réduisent les dépôts lipidiques et la dépense énergétique et conduisent à une diminution de la prise alimentaire (Wallenius *et al.*, 2002b ; Benrick *et al.*, 2009).

L'IL-7 est une autre cytokine produite principalement par les cellules stromales et les cellules endothéliales vasculaires mais aussi par le tissu adipeux et plus précisément les cellules stromales des fractions vascularisées des tissus adipeux (Maury *et al.*, 2007). L'IL-7 est principalement connue pour ses fonctions immunes, elle favorise la survie, l'homéostasie, le développement et la prolifération lymphocytaire (Lundström *et al.*, 2012). Cette cytokine intervient également dans la régulation de l'homéostasie énergétique aussi bien au niveau central qu'au niveau périphérique où l'on retrouve son récepteur (Macia *et al.*, 2010 ; Lucas *et al.*, 2012). Au niveau central, elle stimule les neurones POMC de l'ARC et entraîne une réduction de la prise alimentaire après un jeûne de 24h (Macia *et al.*, 2010). L'injection intrapéritonéale d'IL-7 réduit également l'inflammation du tissu adipeux et sa surexpression induit une diminution de la masse grasse (Lucas *et al.*, 2012).

La résistine est une autre adipokine majeure synthétisée également par les adipocytes. Elle est sécrétée principalement par les préadipocytes et les macrophages chez l'Homme et les adipocytes chez le rongeur et inhibe la prise alimentaire (Steppan *et al.*, 2001 ; Patel *et al.*, 2003 ; Fukuhara *et al.*, 2005). La résistine tire son nom de la première fonction qui lui a été attribué : elle induit une résistance à l'insuline (Steppan *et al.*, 2001). Il a également été montré que la surexpression ou les injections de résistine induisaient une hyperglycémie (Banerjee *et al.*, 2004 ; Rangwala *et al.*, 2004). Il apparaît que son action de résistance à l'insuline passe par son interaction avec le récepteur Toll-like receptor 4 (TLR4) trouvé au niveau de l'hypothalamus (Benomar *et al.*, 2013).

Tableau 5 Adipokines et leurs effets métaboliques

Protéines sécrétées	Effets métaboliques
Adipsine	Stimule le stockage des triglycerides adipocytaires; active la voie du complément
ApoE	Composant protéique des lipoprotéines riches en triglycérides
ASP	Stimule la synthèse des triglycerides dans les tissus adipeux blancs; antilipolytique
CETP	Transfère les esters de cholesterol entre les lipoprotéines
LPL	Hydrolyse les triglycerides en lipoprotéines riches en triglycérides permettant la capture cellulaire
MCP-1	Mobilise les monocytes vers les sites de lésions et d'inflammation
MIF	Immunoregulateur à actions paracrine dans le tissu adipeux blanc
Omentine	Améliore l'action de l'insuline
PAI-1	Inhibe l'action plasminogène; bloque fibrinolyse
RBP-4	Augmente la résistance à l'insuline
TGF β	Regule la prolifération et la différenciation et l'apoptose adipocytaire
Facteur tissulaire	Initie la cascade de coagulation
VEGF	Stimule l'angiogenèse (la prolifération vasculaire) dans le tissu adipeux blanc
Visfatine	Mimétique de l'insuline principalement produit par le tissu adipeux visceral

(voir revue Harwood *et al*, 2012)

d) Nutriments :

Les nutriments peuvent à leur tour jouer un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme énergétique et la prise alimentaire. Ainsi les métabolites issus soit directement de l'alimentation, soit des organes directement impliqués dans le métabolisme énergétique sont capables de jouer le rôle de signaux orexigènes ou anorexigènes. Parmi ces signaux, on trouve plus particulièrement le glucose, les acides gras libres ou les acides aminés.

*** Glucose.** Très tôt, il a été suspecté une influence du glucose, principale source d'énergie du système nerveux, dans le contrôle de la prise alimentaire et de la faim. Ainsi, dès 1953 Jean Mayer propose la théorie glucostatique selon laquelle « *the short-term articulation between energy needs and energy intake was under glucostatic control* ». Cette théorie bien qu'incomplète pour expliquer l'étendue des mécanismes et des signaux qui entrent en jeu a permis de poser les idées d'un contrôle du métabolisme énergétique par le glucose au niveau de l'hypothalamus (Mayer, 1955). Ainsi, des injections localisées au niveau de l'hypothalamus ventromédian induisent une diminution de la prise alimentaire (Panksepp et Rossi, 1981). Il est apparu par la suite que les concentrations extracellulaires de glucose sont détectées par deux populations de neurones glucose sensibles (GE et GI). Ces neurones retrouvés au sein de

l'hypothalamus modulent *via* leurs projections les différentes populations neuronales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaires (voir revue Levin *et al.*, 2004 ; Burdakov et González, 2009). Récemment, il a été proposé que l'AMPK puisse jouer un rôle de senseur du glucose et des nutriments. Ce rôle s'exercerait de part la position de cette enzyme dans les différentes voies de signalisation retrouvées chez les principales hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire, à savoir la leptine, l'insuline et la ghréline. De plus, cette enzyme a été décrite comme étant sensible au ratio AMP/ATP donc au métabolisme énergétique cellulaire (Zheng et Berthoud, 2007).

*** Acides gras libres.** En plus de la leptine qui répond à l'hypothèse lipostatique de Mayer (1955), les acides gras libres issus soit des réserves lipidiques, soit de l'alimentation servent de messenger de l'état énergétique de l'organisme. Ainsi, des injections intracérébroventriculaires d'acide oléique réduisent la prise alimentaire et la production de glucose hépatique (Obici *et al.*, 2002 ; Le Foll *et al.*, 2013). De même des injections carotidiennes d'acides gras libre entraînent une diminution de la prise alimentaire associée à une augmentation de la sensibilité des cellules β au glucose (Boden *et al.*, 1995 ; Magnan *et al.*, 1999). Les mécanismes de détection des acides gras libres restent cependant à éclaircir et mettraient en jeu différents canaux membranaires mais aussi les enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras (Moullé *et al.*, 2014).

*** Autres nutriments.** Les acides aminés interviennent également dans la régulation de la prise alimentaire. Ils sont connus pour être les briques élémentaires pour la synthèse et le turnover protéique mais ils sont également utilisés comme substrat énergétique. Ainsi, des régimes alimentaires riches ou pauvres en protéines influencent la prise alimentaire (Du *et al.*, 2000 ; Weigle *et al.*, 2005 ; Journal *et al.*, 2012). Toutefois, les mécanismes biologiques sous-jacents de signalisation cellulaire restent à déterminer même s'il apparait d'après les dernières recherches le complexe « mammalian target of rapamycin complex 1 » (mTORC1) serait impliqué dans cette signalisation (Zoncu *et al.*, 2011 ; Bar-Peled *et al.*, 2012). De plus, on retrouve l'un des composants de ce complexe mTOR au niveau des neurones de l'ARC et du PVN (Cota *et al.*, 2006 ; Journal *et al.*, 2012).

Le lactate et le pyruvate, deux autres métabolites énergétiques issus de la glycolyse et du métabolisme des acides aminés, peuvent également influencer la prise alimentaire. Des injections périphériques de lactate ou de pyruvate induisent une diminution de la prise alimentaire (Schultes *et al.*, 2012). Dans le cas du lactate, il apparait encore une fois que l'AMPK serait un acteur majeur intervenant dans la signalisation des taux circulants (Hun Cha *et al.*, 2009).

Les corps cétoniques sont décrits pour être la seule autre source d'énergie alternative du système nerveux central en cas de déficit énergétique sévère (Lamers *et al.*, 1987 ; Hasselbalch *et al.*, 1994). Les injections en intracérébroventriculaire de β -hydroxybutyrate ne montrent pas de résultats clairs sur la prise alimentaire, le poids et la composition corporelle chez les différentes souches de rats utilisées dans ces études (Davis *et al.*, 1981 ; Arase *et al.*, 1988 ; Sun *et al.*, 1996). Ceci est peut être lié au fait que le β -hydroxybutyrate n'intervient que dans une part (62%) de l'oxydation observé au sein des neurones, l'autre part étant lié à l'oxydation du glucose (38%) (Chowdhury *et al.*, 2014).

Les concentrations plasmatiques de ces différents métabolites sont influencées par l'état de la balance énergétique, mais également par l'activité physique. Ainsi, un jeûne de 24h entraîne une augmentation de ces métabolites énergétiques mais lorsqu'il se prolonge, les différentes réserves s'épuisent et s'ensuit une chute de leurs taux circulants. Dans le cas d'un exercice physique, on observe également une augmentation des métabolites énergétiques, signe encore une fois d'une mobilisation des réserves afin de répondre aux demandes des organes tels que les muscles ou le cerveau. Les variations ainsi observées, participent à l'inhibition de la prise alimentaire observée lors de ce type de comportement (Woods, 1991 ; Scheurink *et al.*, 1999). Pour ces raisons, le dosage de ces métabolites a été réalisé dans le cadre de notre étude (chapitre I).

e) Autres signaux

* **IGF-1 et axe somatotrope.** La GH exerce une fonction anabolique ou catabolique selon les tissus qu'elle cible (Jorgensen *et al.*, 2007 ; Moller *et al.*, 2007). Sa fonction principale est le contrôle de la croissance longitudinale (Beshyah *et al.*, 1995 ; Rosenfeld, 2001). La GH intervient aussi dans la mobilisation des réserves énergétiques et notamment les réserves lipidiques (**Tableau 3**). La régulation de sa sécrétion se fait principalement sous la dépendance de deux neuropeptides la GHRH et le SRIF sécrétés respectivement par des neurones de l'ARC et du PVN (*cf* 1.3.1.a). Une partie importante des effets de la GH sur la croissance est en fait gérée par l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1),

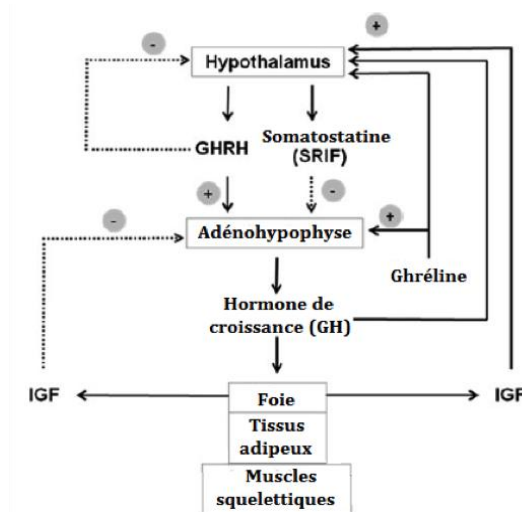


Figure 12 Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance (D'après Ernestânia Chaves *et al.*, 2013)

l'acteur final de l'axe somatotrope (**Fig. 12**). Cette hormone sécrétée principalement par les hépatocytes suite à l'action stimulatrice de la GH agit sur différents tissus (**Tableau 6**) afin de favoriser la synthèse protéique, la croissance osseuse, la prolifération cellulaire de nombreux organes et le métabolisme énergétique (Rinderknecht et Humbel, 1976 ; Le Roith, 1995 ; Ohlsson *et al.*, 2009). La régulation de l'axe somatotrope passe aussi par un rétrocontrôle de la GH et de l'IGF-1 au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus (**Fig. 12**).

Tableau 6 Actions métabolique de l'IGF-1

Organe	Effets métaboliques
Foie	Diminue la production de glucose hépatique
Muscles squelettiques	Stimule la synthèse protéique Stimule la capture du glucose
Tissus adipeux	Induit la différenciation des préadipocytes
Global	Augmente la synthèse protéique Augmente le pourcentage masse maigre Diminue le pourcentage de masse grasse En aigüe réduit, en chronique augmente l'oxydation des lipides

(voir revue Oliveira *et al.*, 2011)

*** Glucocorticoïdes et axe HHS.** Les glucocorticoïdes, corticostérone chez les rongeurs et cortisol chez l'Homme, sont des hormones stéroïdiennes produites par les glandes cortico-surrénales et décrites pour leurs implications dans le stress. Elles sont synthétisées suite à l'activation de l'axe HHS (**Fig. 13**). Elles ont dans un premier temps été décrites pour leurs actions anti inflammatoires et pour la régulation du métabolisme protéique et glucidique. Ainsi, la corticostérone cible en particulier les organes impliqués dans le métabolisme énergétique afin de mobiliser les réserves de l'organisme (foie, tissus adipeux et muscles

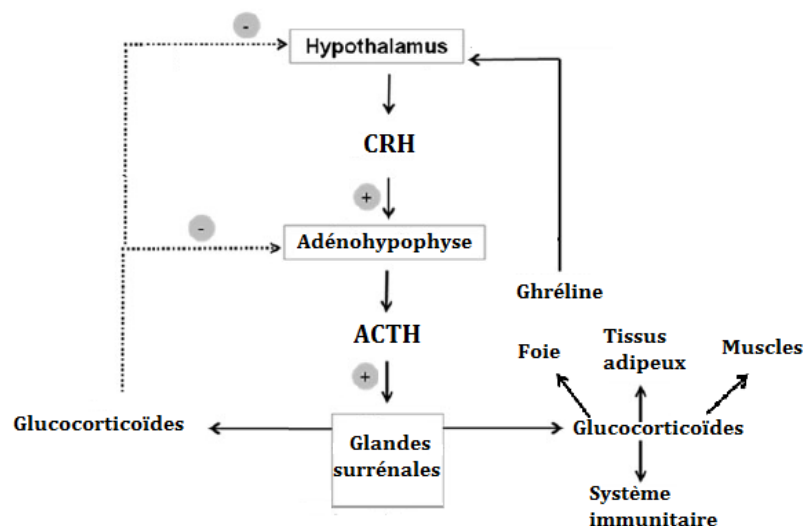


Figure 13 Axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (axe HHS)

squelettiques) lorsqu'il est soumis à une situation stressante. On observe alors une augmentation de la gluconéogenèse hépatique associée à une augmentation de la glycémie, une lipolyse et une dégradation des protéines (Opherk *et al.*, 2004 ; Vegiopoulos et Herzig, 2007 ; You *et al.*, 2009) *via* l'activation de différentes enzymes (**Tableau 7**). De plus, les glucocorticoïdes induisent une augmentation du poids corporel ce qui laisse supposer un rôle central de ces hormones. En effet, des injections de corticostérone en intracérébroventriculaire chez des rats adrenalectomisés induisent une augmentation du poids non retrouvée avec des injections sous-cutanées (Sainsbury et Zhang, 2011).

Tableau 7 Gènes sensibles aux glucocorticoïdes et impliqués directement ou indirectement dans les voies métaboliques

Organe	Voie physiologique affectée
Glucose-6-phosphatase	Gluconéogenèse
PEPCK	Gluconéogenèse
Tyrosine aminotransférase	Catabolisme des acides aminés
Tryptophane oxygénase	Catabolisme des acides aminés
Lipoprotéine lipase	Métabolisme des lipides
Recepteur VLDL	Métabolisme des lipoprotéines
GluT4	Transport du glucose
Leptine	Homéostasie énergétique
CRH	Régulation de l'axe du stress
POMC	Sécrétion hormonal hypophysaire
TNF α	Réponse pro-inflammatoire
IL-6	Réponse pro-inflammatoire
Ostéocalcine	Métabolisme osseux

(voir revue Kyrou *et al.*, 2006)

f) Accès des signaux périphériques dans le SNC

Ces différents signaux périphériques atteignent le système nerveux central soit par le nerf vague et ciblent ainsi le complexe vagal dorsal composé du NTS, de l'area postrema et du noyau moteur dorsal du nerf vague (Schwartz *et al.*, 1999), soit par les organes circumventriculaires.

La consommation de nourriture entraîne la stimulation du nerf vague soit par les mécanorécepteurs qui transmettent l'information de distension de l'estomac soit par les signaux gastro-intestinaux tels que la CCK, le GLP-1, le PYY ou le PP (Zagorodnyuk *et al.*, 2000 ; 2001 ; Viltart *et al.*, 2006) ou encore la leptine et la ghréline (**Fig. 14**).

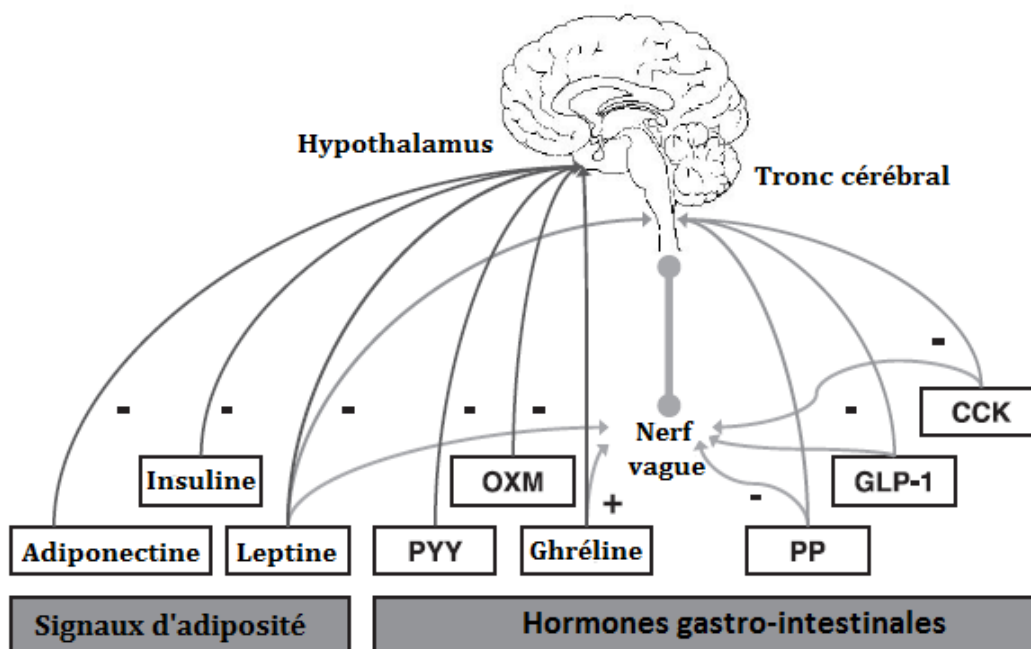


Figure 14 Influence des signaux périphériques provenant du tractus gastro-intestinal, des tissus adipeux et du pancréas sur les circuits centraux (hypothalamus et tronc cérébral) produisant des effets stimulateurs (+) ou inhibiteurs (-) sur la prise alimentaire (D'après Stanley *et al.*, 2005)

Les signaux périphériques atteignent également le parenchyme cérébral grâce à des structures particulières de la barrière hémato-encéphalique : les organes circumventriculaires (**Fig. 15** ; voir revue Noda et Sakuto, 2013 ; Dyrna, 2013).

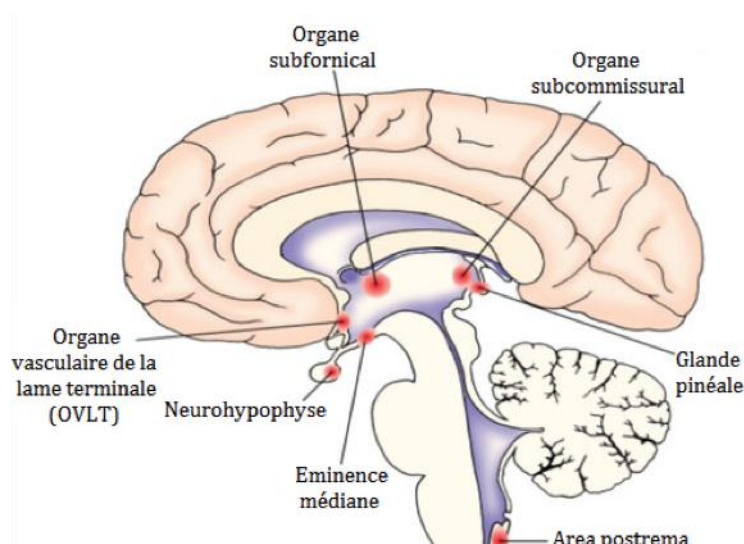


Figure 15 Localisation des différents organes circumventriculaires (d'après quizlet.com)

Sept CVOs ont été décrits et sont répartis à différents endroits du cerveau (**Fig. 15**) : l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT), la neurohypophyse, l'éminence médiane, l'area postrema, la glande pinéale, l'organe subcommissural et l'organe subfornical. La

présence de transporteurs spécialisés permettent aux signaux périphériques qui ne diffusent pas librement à travers les capillaires d'atteindre leurs cibles centrales (Göke *et al.*, 1995 ; Christopoulos *et al.*, 1995 ; Pulman *et al.*, 2006 ; Zigman *et al.*, 2006). Il faut noter que cette barrière n'est pas une structure figée. En effet, l'état de la balance énergétique influence l'organisation des CVOs (Banks *et al.*, 2008 ; Balland *et al.*, 2014). Ainsi durant une hypoglycémie secondaire à un jeûne une augmentation des vaisseaux fenêtrés associée à une redistribution des jonctions serrées permettant ainsi un meilleur passage des molécules périphériques tel que la ghréline (Langlet *et al.*, 2013 ; Schaeffer *et al.*, 2013).

1.3.3 Régulation non homéostatique de la prise alimentaire

a) Aire tegmentale ventrale (VTA)

La première description de la VTA a été réalisée en 1925 par Tsai, elle a été décrite comme étant une structure du mésencéphale souvent considérée comme une entité unique appartenant à la voie dopaminergique appelée noyau A10. La VTA est en fait une structure hétérogène ; les études de cytoarchitecture et de marquages immunohistochimiques de la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme clé dans la synthèse de la dopamine ont montré plusieurs ensembles cellulaires (Oades et Hallyday, 1987 ; Ikemoto *et al.*, 2007 ; Ferreira *et al.*, 2008) (**Fig. 16**).

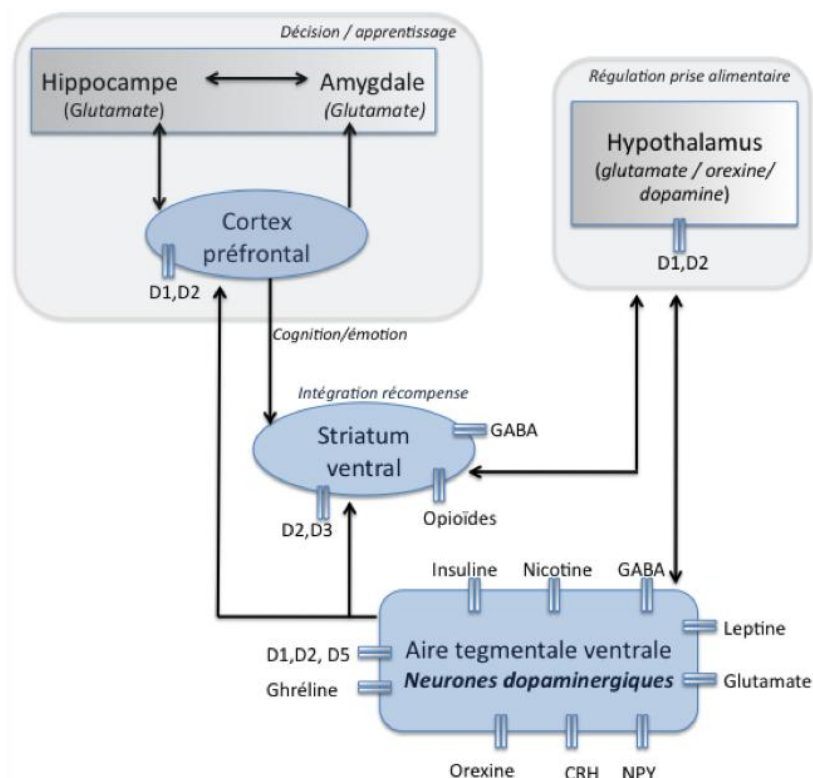


Figure 16 Circuit méso-cortico-limbique de la récompense. D1-5 : récepteurs à la dopamine. (Viltart, 2014)

A côté de ces neurones DA, on trouve des neurones GABAergiques et des neurones glutamatergiques (~60% des neurones DA contre 35% des neurones GABAergiques et 2 à 5% des neurones glutamatergiques chez le rat) (Dahlström et Fuxe, 1964 ; Kawano *et al.*, 2006 ; Geisler *et al.*, 2007 ; Olson et Nestler, 2007 ; Yamaguchi *et al.*, 2007).

Les neurones DA apparaissent prédominants dans le contrôle de la prise alimentaire ; en effet, des souris déficientes (DD) pour les enzymes intervenant dans la synthèse de la dopamine perdent du poids, sont hypophagiques et hypoactives (Palmiter, 2008). Bien que ces souris rendent difficile la distinction des rôles respectifs de la VTA et de la substance noire autre source mésencéphalique de dopamine, mais impliquée dans le comportement locomoteur, elles nous permettent de voir le rôle essentiel de la dopamine dans la régulation de la prise alimentaire. Il semblerait que ces souris aient des troubles motivationnels. En effet, bien que ces souris se déplacent suffisamment pour trouver et consommer de la nourriture, elles ne mangent pas assez pour survivre même quand de la nourriture appétissante et de l'eau sont facilement disponibles. Ces souris ne répondent pas aux changements hormonaux associés à la privation de nourriture malgré la perception de ces changements (Szczypka *et al.*, 2001). De plus, Adamantis *et al.*, (2011) ont démontré que l'activation phasique des neurones DA de la VTA est associée aux indices prédisant une récompense et que cette activation facilite le développement du renforcement positif lors de la recherche de récompense. Ainsi, des souris déficientes pour la dopamine et pour la leptine traitées quotidiennement avec de la L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine), précurseur de la dopamine, mangent de façon vorace et lorsque l'on arrête le traitement elles arrêtent de manger (Szczypka *et al.*, 2011). Le récepteur ObRb de la leptine est présent au niveau de la VTA. Des injections de leptine au niveau de la VTA entraînent une diminution de la prise alimentaire et cette action fait intervenir sa signalisation JAK/STAT3 entraînant ainsi l'inhibition l'activité neuronale de la VTA (Hommel *et al.*, 2006 ; Fulton *et al.*, 2006 ; Domingos *et al.*, 2011). De même, l'insuline agit sur les neurones de la VTA, elle entraîne une diminution de la libération de dopamine par l'intermédiaire de la signalisation PI3K et mTOR (Figlewicz et Benoit, 2009 ; Mebel *et al.*, 2012). A côté de ces hormones anorexigènes qui inhibent les neurones DA, la ghréline va stimuler ces mêmes neurones et conduire à une augmentation de la libération de la dopamine dans le noyau accumbens (Abizaid *et al.*, 2006 ; Malik *et al.*, 2008). Toutefois, les mécanismes d'action de la ghréline ne paraissent pas clairement établis et la libération de dopamine dépendrait aussi de l'état de satiété de l'animal. En effet, des injections intra-VTA de ghréline chez des animaux disposant d'un accès libre à la nourriture ne sont pas suivies d'une libération de dopamine, alors que le même type d'injection chez des animaux à jeun cause sa libération (Kawahara *et*

al., 2009 ; 2013). De plus, il a été montré récemment que les triglycérides exercent également une action sur les structures méso-limbiques. L'administration intra-carotidienne de triglycérides chez des souris inhibe la préférence pour la nourriture appétissante et le comportement de recherche de nourriture et cette action fait intervenir le noyau accumbens (Cansell *et al.*, 2014).

Les neurones de la VTA sont aussi influencés par plusieurs structures du système nerveux central. Comme précisé précédemment, différents neurones de l'hypothalamus projettent sur la VTA.

Les neurones de la LHA innervent les neurones DA et la stimulation électrique de la LHA augmente la motivation des animaux pour la nourriture appétissante (Olds, 1958 ; Margules et Olds, 1962). Les récepteurs OX1R sont présents au niveau de la VTA et il a été montré que des injections intra-VTA d'orexine augmente l'appétit pour la nourriture grasse (Harris *et al.*, 2005). Les neurones NPY envoient des projections sur la VTA où des récepteurs Y1, Y2 et Y4 ont été retrouvés (Korotkova *et al.*, 2006) et dont la stimulation conduit à une préférence pour le sucre (Pandit *et al.*, 2014). La VTA reçoit aussi des projections des neurones à CRH du PVN. Des injections intra-VTA de CRH entraînent une augmentation de l'activité locomotrice associée à une diminution du métabolisme de la dopamine (Kalivas *et al.*, 1987). Enfin, la VTA est aussi modulée par des afférences glutamatergiques et cholinergiques provenant de la formation réticulée et plus précisément le noyau tegmental latérodorsal (LDTg) et pédonculopontin (PPTg) du tegmentum pontique (Yeomans *et al.*, 1993 ; Rada *et al.*, 1999 ; Lodge et Grace, 2005). Il a été montré que la ghréline agit sur les neurones cholinergiques du LDTg pour permettre une libération de dopamine au niveau du noyau accumbens (Jerlhag *et al.*, 2006 ; Takano *et al.*, 2009). Les neurones DA sont aussi la cible des endocannabinoïdes (l'acide N-ethanolamide de l'acide arachidonique, l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG)) (Bermudez-Silva *et al.*, 2010) qui agissent par l'intermédiaire du récepteur CB1 (Howlett *et al.*, 2002). L'injection centrale ou périphérique chez les rongeurs d'AEA augmente l'appétit alors que les antagonistes de CB1 diminuent la prise alimentaire (Williams et Kirkham, 1999). Les récepteurs CB1 sont aussi retrouvés au niveau du circuit méso-limbique et à ce niveau la stimulation de la prise alimentaire ferait intervenir le noyau accumbens alors que la VTA serait impliquée dans l'activité physique (Di Marzo *et al.*, 2009 ; Dubreucq *et al.*, 2013).

b) Noyau accumbens

La principale source de dopamine est localisée au niveau du mésencéphale à savoir dans la VTA et la substance noire ; ces structures projettent principalement vers le complexe

striatal respectivement le striatum ventral et le striatum dorsal. Le complexe striatal projette à son tour vers le pallidum et le mésencéphale (voir revue Ikemoto 2007). Globalement, le striatum ventromédian consiste au tubercule latéral, à l'accumbens shell et à l'accumbens core qui reçoivent une innervation dopaminergique de la moitié latérale de la VTA. Ces projections diffèrent entre les zones d'origine des innervations (**Fig. 17**) (Ikemoto *et al.*, 2007 ; 2010). Des études de lésions cytotoxiques ou d'injections d'antagonistes dopaminergiques dans le noyau accumbens ont montré que ce noyau est impliqué dans la locomotion spontanée et que ces traitements ont peu d'effet sur la prise alimentaire qui est néanmoins légèrement augmentée (Koob *et al.*, 1978 ; Bakshi et Kelley, 1991).

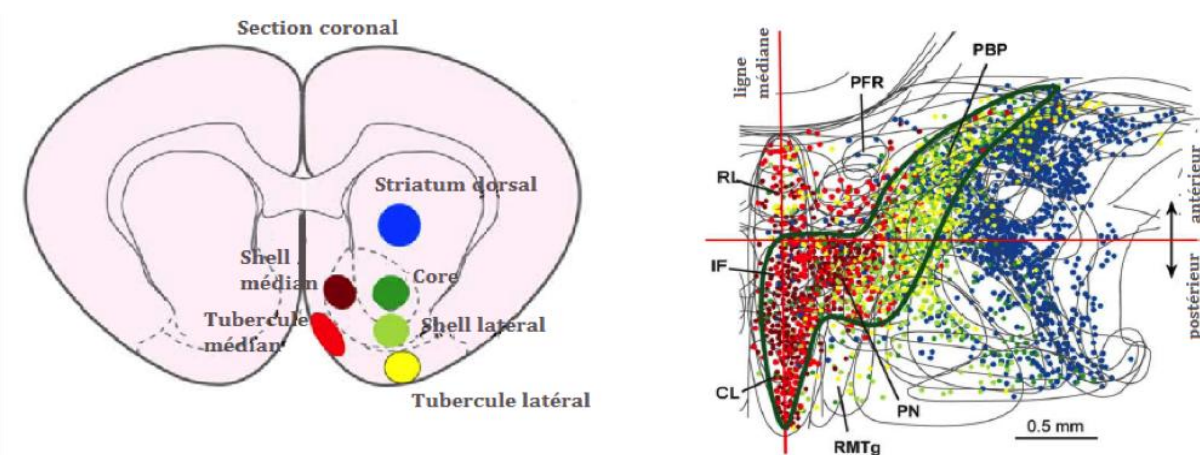


Figure 17 : Projections topographiques des neurones dopaminergiques du mésencéphale (VTA et substance noire schéma de droite) sur le striatum ventral (schéma de gauche). Les différentes couleurs utilisées correspondent aux différents marquages rétrogrades réalisés. La zone approximative encadrée en vert correspond aux projections dopaminergiques vers le striatum ventral (CL : caudal linear ; IF : interfascicular ; RL : rostral linear nucleus ; PFR : parafasciculus retroflux area ; PBP : parabrachial pigmented area ; PN : paranigral ; RMT : ventral tegmental tail) (D'après Ikemoto, 2007 ; 2010).

De plus, les analyses fonctionnelles du noyau accumbens qui se sont intéressées à distinguer les différences entre l'accumbens shell et l'accumbens core ont montré que ces deux ensembles sont impliqués dans des fonctions qui paraissent différentes (Di Chiara, 2002 ; Kelley, 2004 ; Everitt et Robbins, 2005). Toutefois, les actions des deux structures ne s'exercent pas au même niveau ; la lésion des terminaisons dopaminergiques du core perturbe l'activité locomotrice induite par l'injection iv de psychostimulant alors qu'un tel effet n'apparaît pas avec le shell (Boye *et al.*, 2001 ; Sellings et Clarke, 2003 ; Sellings *et al.*, 2006) et à ce jour aucune donnée montre clairement un rôle de la dopamine au sein du noyau accumbens sur la prise alimentaire proprement dite. Une série d'études réalisées par Salamone *et al.*, (1994) a montré que le noyau accumbens serait plus lié au comportement de

motivation. Des rats affamés ayant subi une lésion des terminaisons préfèrent réduire leurs efforts pour obtenir une quantité plus faible de nourriture (Salamone *et al.*, 2002). Ces actions font intervenir différents récepteurs (**Fig. 16**), les récepteurs D1 (postsynaptiques), D2 (post et présynaptiques) et D3 (autorécepteurs) (voir revue Beaulieu 2011). Toutefois, ces récepteurs sont influencés par l'état de la balance énergétique ; des rats obèses présentent une diminution de l'expression du récepteur D2 alors que la restriction alimentaire (Stice *et al.*, 2009) augmente l'état de phosphorylation des protéines de transduction du signal du récepteur D1 (Haberny *et al.*, 2004). Comme indiqué précédemment, au niveau de la VTA, les neurones glutamatergiques et GABAergiques projettent sur des cibles communes aux neurones DA. Ces neurotransmetteurs vont quant à eux agir sur la prise alimentaire. En effet, des injections des antagonistes du récepteur AMPA dans le noyau accumbens shell entraînent un comportement d'hyperphagie chez les rats traités (Haberny *et al.*, 2004 ; Haberny et Carr, 2005). De même, le GABA exerce une action inhibitrice sur le comportement alimentaire qui est levée par des injections dans la même zone d'antagonistes du récepteur GABA_A (Stratford et Kelley, 1997 ; Basso et Kelley ; 1999).

Ainsi, les circuits impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire apparaissent liés entre eux. Ces liens s'observent par les différentes projections entre les structures qui les composent mais aussi par les hormones qui modulent l'activité des populations neuronales. Parmi ces hormones, la ghréline et de la leptine sont particulièrement impliquées. Ces hormones sont essentielles dans le contrôle de l'homéostasie énergétique mais aussi dans la régulation des processus motivationnels contrôlant la prise alimentaire. Ces circuits sont particulièrement affectés par la restriction alimentaire, comme nous le verrons dans le chapitre II, mais aussi chez les personnes souffrant d'anorexie mentale.

II. Dérégulation de la prise alimentaire : cas de l'anorexie mentale et apports des modèles animaux

L'objectif de cette partie sera de rappeler les différents critères de diagnostic de l'anorexie mentale pris en compte dans la plupart des études et de mettre en avant les principales altérations métaboliques, endocriniennes et centrales observées chez les patients. Enfin, un dernier point s'attardera sur les différents modèles animaux utilisés et leurs apports dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués dans l'anorexie.

2.1. L'anorexie mentale

2.1.1. Critères de diagnostic

L'Indice de Masse Corporelle est un marqueur utilisé pour déterminer l'état nutritionnel pour lequel l'organisation mondiale pour la santé (OMS) a défini cinq niveaux de maigreur :

- dénutrition grade I (IMC = 17 à 18,4 kg/m²) ;
- dénutrition grade II (IMC = 15 à 16,9 kg/m²) ;
- dénutrition grade III (IMC = 13 à 14,9 kg/m²) ;
- dénutrition grade IV (IMC = 10 à 12,9 kg/m²) ;
- dénutrition grade V (IMC inférieur à 10 kg/m²).

Un IMC inférieur à 18 kg/m² n'est pas systématiquement le critère clé définissant un état d'anorexie mentale. Certaines personnes peuvent présenter des valeurs d'IMC de sous poids modéré à sévère (IMC de 18,5 à moins de 16) sans pour autant présenter les autres altérations observées chez les malades. Il est probable que ce phénotype qualifié de « maigreur constitutionnelle » soit influencé par le génotype des individus ; en effet, une duplication au niveau du chromosome 16p11.2 a été montrée comme étant associée à des troubles psychiatriques mais aussi à un poids corporel réduit (Jacquemont *et al.*, 2011). Toutefois, ces observations n'excluent une influence hormonale dont les concentrations plasmatiques diffèrent de celles des contrôles (Germain *et al.*, 2014). Ces personnes ne présentent ni les anomalies hormonales souvent retrouvées dans l'AM et ni l'aménorrhée, critère utilisé jusque récemment (Tolle *et al.*, 2003 ; Bossu *et al.*, 2006). L'AM se définit par plusieurs critères qui ont évolué avec le temps, avec les différentes versions du « *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* » (DSM) rendant les données épidémiologiques assez disparates. La dernière version en date, le DSM-5, distingue deux types majeurs d'AM : l'AM de type restrictif et l'AM avec crise de boulimie suivie de purge, que ce soit avec par vomissements ou prise de laxatifs/diurétiques. Dans les deux cas, la perte de poids est notable, bien qu'elle soit souvent plus sévère dans le type restrictif. **Dans le cadre de cette thèse, nous nous focaliserons sur l'AM de type restrictif (Méquinion et al., en révision)** même s'il faut souligner que cette classification est souvent obsolète car la majorité des patients passe souvent d'un état à l'autre selon l'évolution et la durée de la maladie. Le type restrictif a été retenu, car il induit des atteintes plus sévères et serait plus fréquemment associé à une activité physique.

L'AM est également associée à d'autres troubles psychiatriques comme la dépression, l'anxiété, les troubles de la personnalité, ou encore au comportement obsessionnel compulsif (Erdur *et al.*, 2012). Actuellement, le diagnostic de l'AM de type restrictif doit remplir 3 critères majeurs (DSM-5, 2013). **Le premier critère** concerne la restriction sévère et

persistante de la prise alimentaire, ce qui conduit à une perte de poids importante par rapport à ce qui est attendu selon l'âge, le sexe, la trajectoire développementale et l'état physique de la personne. **Le deuxième critère** correspond à la peur intense de prendre du poids, de devenir gros/gras, la persistance d'un comportement qui empêche la prise de poids. **Le troisième critère** est lié à la dysmorphophobie, c'est à dire à une altération de la perception de soi, de son corps : le patient se voit plus gros qu'il ne l'est en réalité. Un autre critère qui a été mis de côté dans le nouveau DSM-5, mais qui reste néanmoins important sur le plan de l'endocrinologie, est l'aménorrhée, i.e. l'absence d'au moins trois cycles menstruels consécutifs (DSM-IV, 1994 : Attia et Robberto, 2009). Ce critère, pris en compte dans l'ancien DSM-IV, a été retiré car il ne peut s'appliquer aux sujets de sexe masculin (pour rappel, le sexe ratio de l'AM est de 1 homme / 10 femmes), aux sujets prépubères, aux femmes sous contraception orale, et aux femmes ménopausées (Dalle Grave *et al.*, 2008). Néanmoins, quelques études soulignent que la disparition du cycle menstruel dépend à la fois de la sévérité de la perte de poids ainsi que du niveau de stress des patients (Abbate Daga *et al.*, 2012 ; Jappe *et al.*, 2014). En plus de la restriction dans le choix et la quantité des aliments consommés, les patients anorexiques présentent pour 30 à 80%, selon les études, une hyperactivité physique ou une activité physique disproportionnée (Hedebrand *et al.*, 2004). Enfin, à côté des deux sous-types bien décrits, deux autres sous-types classés auparavant dans la catégorie des troubles du comportement alimentaire non autrement spécifiés (EDNOS Eating Disorder Not Otherwise Specified) sont parfois mentionnés dans les études : **les ARFID** (avoidant/restrictive food intake disorder) dans lesquels les patients ont une prise alimentaire insuffisante associée à une perte de poids, une carence nutritionnelle, une alimentation entérale ou supplémentées et/ou un dysfonctionnement psychosocial marqué. ; **les AM atypiques** qui incluent tous les critères diagnostics de l'AM excepté la perte significative de poids dont le niveau reste dans ou au-dessus de la normale.

L'AM est une maladie chronique qui se définit aussi par la persistance de la maladie au-delà de cinq ans d'évolution avec un maintien des symptômes présentés précédemment. Toutefois, la détermination du sous-type à un moment du diagnostic doit être considérée avec précaution car sur une période de sept ans, il a été montré que la majorité des femmes passe d'un sous-type AM de type restrictif à un sous type AM avec purge (Eddy *et al.*, 2008). De même au vu des relations complexes existantes entre les différents troubles du comportement alimentaire, il a été proposé d'établir une théorie de transdiagnostic dans le but d'améliorer les différents traitements qui pouvait être apportés (Fairburn *et al.*, 2003 ; Birmingham *et al.*, 2009). A côté des symptômes primaires, de nombreux symptômes secondaires qualifiés

parfois de comorbidités ont été décrits, ils sont utilisés comme critères d'hospitalisation incluant des critères anamnestiques (perte de poids, refus de manger, malaises...), des critères cliniques (bradycardie, hypotension, hypothermie...) et des critères paracliniques (hypoglycémie, troubles hydro-électrolytiques...) ainsi que des critères psychiatriques comme indiqué ci-dessus (tentative de suicide, dépression, anxiété, manque de coopération...).

2.1.2. Données épidémiologiques et mortalité

La prévalence de l'AM dans la population générale est variable selon les pays, les populations étudiées et les critères utilisés. Ainsi, il apparaît que cette maladie affecte principalement les pays industrialisés. Les jeunes femmes sont les principales personnes affectées et le nombre de cas diagnostiqués semblent se stabiliser (Makino *et al.*, 2004 ; Hoek *et al.*, 2003 ; 2006 ; Papadopoulos *et al.*, 2009 ; Garcia-Duarte *et al.*, 2011 ; Qian *et al.*, 2013). Cette maladie toucherait environ 0,3% de la population générale (Hoek *et al.*, 2006), avec une plus grande propension chez les femmes dont les taux sont les plus élevés chez celles âgées de douze à vingt-cinq ans avec des taux variables de 0,2% à 2,6% (Garcia *et al.*, 2011). Toutefois, les patients masculins bien que minoritaires présentent des symptômes plus sévères avec un taux de mortalité plus élevé (Gueguen *et al.*, 2012). Dans les cas chroniques d'AM, le risque de mort prématurée parmi les patients touchés est trois fois plus élevé que dans le reste de la population (Millar *et al.*, 2005). Le devenir des malades anorexiques est extrêmement variable avec 50% à 60% des individus qui guérissent, 20% à 30% qui récupèrent partiellement et 10% à 20% qui entrent dans des états de chronicisation (Löwe *et al.*, 2001 ; Fisher, 2003). A l'image des données de prévalence, les chiffres établissant le nombre de patients morts des suites de l'AM soit par suicide, soit des complications principalement liées à la malnutrition, sont assez variables allant de 0% à 25% selon les études (Arcelus *et al.*, 2011). En effet, un certain nombre d'études soulignent les différentes complications induites par la malnutrition et pouvant conduire à la mort : troubles cardiaques, gastriques, hépatiques, osseux ou encore des infections sévères à l'origine d'une septicémie (Sakada *et al.*, 2006 ; Rautou *et al.*, 2008 ; Estour *et al.*, 2010 ; Jáuregui Garrido et Jáuregui Lobera, 2012 ; Erdur *et al.*, 2012 ; Roux *et al.*, 2013). Par ailleurs, les patients anorexiques présentent des altérations de la densité minérale osseuse, comme nous le détaillerons un peu plus loin, qui se traduisent par une augmentation du risque de fracture, multiplié par sept (Legroux-Gérot *et al.*, 2005 ; 2008). Ainsi, l'ostéoporose est une autre complication majeure de l'AM (20% à 50% des cas) et des fractures sont observées chez 44% des patients (voir revue Méquinion *et al.*, 2013).

Les patients anorexiques font fréquemment usage de drogues (Erdur *et al.*, 2012). En effet, Speranza *et al.*, (2012) ont montré que 35% des patients AM-R, 48% des AM-P et 60% des

EDNOS consomment des drogues illicites et montrent un trouble addictif répondant aux critères de Goodman (1990).

2.1.3 Anorexie mentale : un comportement addictif ?

Les données épidémiologiques sur l'association récurrente entre AM et addiction aux substances (*cf* données ci-dessus) ont conduit les cliniciens et chercheurs à émettre l'hypothèse que l'AM pourrait être en partie due à des altérations neurobiologiques touchant le système de récompense/motivation/addiction (Alguacil *et al.*, 2011 ; Barbarich-Marsteller *et al.*, 2011). Parmi les différentes théories liant l'AM aux addictions, l'une d'elles propose un modèle d'« auto-addiction » aux opioïdes dans lequel la restriction alimentaire chronique serait liée une addiction aux opioïdes endogènes et plus particulièrement aux β -endorphines (Davis et Claridge, 1998). En effet, le jeûne et l'exercice physique excessif, présents chez un grand nombre de malades, sont associés à une augmentation des taux de β -endorphines connues pour stimuler les circuits méso-limbiques (Bergh et Södersten, 1996 ; Davis *et al.*, 1997 ; Casper, 1998 ; Kohl *et al.*, 2004). De plus, des études d'imagerie fonctionnelle (fIRM) ont montré des dysfonctionnements dopaminergiques affectant plus particulièrement le striatum ventral pouvant ainsi altérer les processus de récompense, affecter la décision et le contrôle moteur et induire, *in fine*, une diminution de l'ingestion de nourriture chez les malades (Frank *et al.*, 2005). Ainsi, les patients entrent dans un cercle vicieux addictif difficile à traiter du fait de l'implication de plusieurs systèmes et de neuromédiateurs. Ainsi, pour casser le bien être endorphinique, il faudrait envisager des stratégies thérapeutiques qui prennent en compte à la fois les systèmes dopaminergiques, endorphiniques et endocannabinoïdiques.

Face à l'efficacité relative des traitements existants (antidépresseurs, antipsychotiques...), il est important de prendre en considération non seulement les modulateurs de l'appétit contrôlant la partie homéostatique du comportement alimentaire mais aussi les modulateurs impliqués dans la part non homéostatique de la prise alimentaire incluant les composantes cognitives et/ou émotionnelles (Roerig *et al.*, 2005 ; Hebebrand et Albayrak, 2012).

2.1.4. Altérations endocriniennes et métaboliques

Les patients souffrant d'anorexie mentale présentent un grand nombre d'altérations endocriniennes affectant les différents axes hypothalamo-hypophysaires, mais aussi des perturbations des hormones gastro-intestinales et adipocytaires (voir point I). Nous détaillerons dans ce point les principales altérations observées chez les patients qui peuvent constituer des cibles potentielles pour des approches thérapeutiques, plus ciblées, voire plus personnalisées.

Comme nous l'avons évoqué dans la description des critères de diagnostic, les patients présentent une diminution de leur IMC liée à une réduction importante de la masse grasse et de la masse maigre, généralement associée à des altérations hormonales affectant les axes somatotrope, gonadotrope, corticotrope, ou encore thyroïdienne (Tableau 8).

Tableau 8 Principales altérations endocriniennes centrales. Comparaison entre des patients anorexiques (AM) et des sujets contrôles (CT)

Facteurs ou hormones	AM/CT
Facteurs de croissance	
GH circulante	(→)↗
IGF-1 circulant	↘
Hormones stéroïdiennes et hormones sexuelles	
LH circulante	↘
FSH circulante	(→)↘
Oestrogènes	(→)↘
Cortisol	(→)↗
Hormones thyroïdiennes	(→)↘

(voir revue Méquinion *et al.*, 2013)

* **L'axe somatotrope** : les patients anorexiques présentent des concentrations plasmatiques élevées de GH associées à une diminution de celles d'IGF-1. Ces variations suggèrent un état de résistance à la GH, déjà mentionné en 1963 (Roth *et al.*, 1963), qui met en jeu le FGF-21 (fibroblast growth factor 21). Ce facteur de croissance altère la transduction du signal de la GH au niveau des membranes hépatiques (Inagaki *et al.*, 2007). Des essais cliniques ont été réalisés pour contrecarrer cette résistance à la GH en injectant en sous cutané des doses supra physiologiques de GH recombinante (Fazeli *et al.*, 2010). Les résultats obtenus montrent une diminution de la masse grasse, alors que les concentrations plasmatiques d'IGF-1 ne bougent pas. Ces résultats supportent l'idée que la GH dans les états de balance énergétique négative joue un rôle de médiateur de la lipolyse et dans le métabolisme glucidique indépendamment de l'IGF-1 (Miller *et al.*, 2011).

* **L'axe gonadotrope** : il est connu depuis longtemps que la diminution de l'énergie disponible est associée avec la survenue d'une aménorrhée (Lawson et Klibalski, 2008). Les femmes adultes anorexiques présentent des concentrations d'hormones sexuelles similaires à celles retrouvées chez les jeunes filles pré-pubères. Les pics de LH ont de très faibles amplitudes et sont associés à une dérégulation de la sécrétion de GnRH (Boyar *et al.*, 1974). Une altération de la sécrétion de LH est un signe manifeste d'aménorrhée hypothalamique qui a pour

conséquence une diminution de la sécrétion d'œstrogènes et de testostérone (Miller *et al.*, 2007). Plusieurs études soulignent également l'implication de la ghréline qui influence non seulement la sécrétion pulsatile de LH, mais aussi celle de la GnRH (Fernández-Fernández *et al.*, 2005; Martini *et al.*, 2006 ; Muccioli *et al.*, 2011). En effet, des données cliniques soulignent qu'indépendamment du poids, des concentrations élevées de ghréline sont associées à une absence de pulsatilité de la LH, alors que des concentrations physiologiques sont associées à une retour de cette pulsatilité (Estour, communication personnelle). L'aménorrhée n'est pas systématiquement observée chez les patientes AM. La proportion de masse grasse est un facteur prédominant, car il a été montré que des jeunes patientes ayant retrouvé une masse de graisse corporelle supérieure à 24% récupèrent un cycle menstruel par rapport à celles dont la masse grasse était inférieure à 18% (Misra *et al.*, 2006). Ainsi, ces données reflètent l'implication potentielle de la leptine, dont les concentrations évoluent en fonction de la masse grasse, dans cette régulation de la fonction de reproduction qui a par ailleurs été décrite chez le rongeur (Bellefontaine *et al.*, 2014).

*** L'axe corticotrope:** Les glucocorticoïdes influencent un grand nombre de fonctions physiologiques telles que le métabolisme glucidique (Opherk *et al.*, 2004), la reproduction (Whirledge *et al.*, 2010), le métabolisme osseux (Lawson et Klibanski, 2008, ; Sainsbury et Zang, 2012 ou encore l'activité physique (Duclos *et al.*, 2012). Les individus présentant les IMC, les masses grasses, la glycémie à jeun et les concentrations d'insuline les plus faibles montrent les plus fortes concentrations plasmatiques de cortisol. Cette augmentation est en accord avec le mécanisme adaptatif en vue de maintenir un état euglycémique alors que le niveau d'énergie disponible est faible (Misra *et al.*, 2004). Cependant, il reste à déterminer si, chez les patients anorexiques, ces hormones sont à l'origine du déséquilibre de la balance énergétique. Des études récentes ont évalué les niveaux de cortisol avant et après le repas combinés à une étude en IRMf (Lawson *et al.*, 2013). Les résultats obtenus soulignent que les concentrations de cortisol chutent après un repas et ce malgré des concentrations de cortisol élevées chez les patients anorexiques, à jeun et 120 min après le repas. Les concentrations de cortisol sont associées à une activation différentielle des structures cérébrales impliquées dans la motivation pour la nourriture, comme l'hypothalamus, l'amygdale ou encore le cortex orbitofrontal.

La ghréline est de nouveau suspectée comme étant un facteur majeur dans les augmentations observées ; il a été montré chez le rongeur qu'elle stimule les neurones à CRH (Mozid *et al.*, 2003 ; Cabral *et al.*, 2012) et pourrait donc contribuer au maintien de l'hypercortisolémie.

* **L'axe thyroïdienne**: les patients anorexiques montrent une diminution des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes T3 et T4 (pour revue Méquinion *et al.*, 2013). Encore une fois, ces réductions apparaissent comme un mécanisme adaptatif en vue de réduire la dépense énergétique au repos et de conserver l'énergie disponible pour les fonctions vitales. Ainsi, la diminution de T3 est associée à une diminution de l'IMC et de la concentration de leptine, et à une augmentation des concentrations de ghréline et de cortisol (Misra *et al.*, 2004 ; Misra *et al.*, 2005).

Les patients anorexiques présentent également des perturbations endocrines affectant les hormones gastro-intestinales, pancréatiques et adipocytaires (**Tableau 9**).

Tableau 9 Principales altérations des hormones périphériques régulant la prise alimentaire. Comparaison entre des patients anorexiques (AM) et des sujets contrôles (CT)

Hormones régulant la prise alimentaire	AM/CT
Hormones liées à la ghréline	
Ghréline circulante totale	↗
Acyl ghréline circulante totale (active)	↗
Déacylghréline circulante totale	↗
Obestatine circulante	↗
Insuline plasmatique	(→) ↘
Leptine	
Leptine LCR	↘
Leptine circulante	↘
Adiponectine circulante totale	(→) ↘ ↗
Cholecystokinine (CCK)	
CCK circulante ou LCR	→ ↗
Glucagon-like peptide-1 circulant	→ ↘
Pépétide YY circulant	(→) ↗

(voir revue Méquinion *et al.*, 2013)

* **Signaux gastro-intestinaux**. La ghréline apparaît comme une hormone clé dans l'AM. En effet, la plupart des fonctions associées à cette hormone sont perturbées chez les patients. Les concentrations plasmatiques de cette hormone orexigène sont augmentées de façon significative chez les patients souffrant d'AM de type restrictif par rapport au type boulimique avec purges et ce aussi bien pour la forme acylée que la forme des-acylée (Tanaka *et al.*, 2003 ; Germain *et al.*, 2007 ; Harada *et al.*, 2008). Malgré ces concentrations élevées, adaptatives sur un plan physiologique, aucun comportement alimentaire compensatoire n'est observé. Ce constat amène à soulever l'hypothèse d'une résistance ou d'une insensibilité à la ghréline qui

serait soit psychologique (lutte contre l'effet orexigène de la ghréline), soit physiologique (Otto *et al.*, 2001 ; Tolle *et al.*, 2003 ; Germain *et al.*, 2010 ; Singhal *et al.*, 2014). Ce point est renforcé par l'existence de polymorphismes géniques sur les gènes de la ghréline et de la GOAT décrits chez des patients anorexiques (Dardennes *et al.*, 2007 ; Müller *et al.*, 2011). Il n'existe que peu de données relatives aux variations des concentrations d'obestatine qui sont néanmoins augmentées chez les patients anorexiques de type restrictif (Germain *et al.*, 2008 ; 2010). L'obestatine pourrait contrecarrer l'effet orexigène de la ghréline.

En revanche, **la CCK** ne semble pas être impliquée dans les comportements de restriction alimentaire observés chez les patients anorexiques. En effet, les malades ne montrent pas d'altération des taux plasmatiques hormonaux (Cuntz *et al.*, 2013).

Concernant le **PYY**, les résultats apparaissent discordants. Après un jeûne nocturne, les concentrations plasmatiques de PYY chez des patientes anorexiques adultes sont similaires à celles des contrôles (Germain *et al.*, 2007 ; Sedlackova *et al.*, 2012) alors qu'elles sont augmentées dans les mêmes conditions chez des patientes adolescentes (Misra *et al.*, 2006). Ces modifications seraient être associées aux altérations osseuses. En effet, des souris déficientes pour le récepteur Y2 montrent une augmentation de la densité minérale osseuse. De plus, il existe une corrélation inverse entre les taux plasmatiques de PYY et la densité minérale osseuse (Utz *et al.*, 2009). A côté de cet effet, aucune étude, à ma connaissance, ne montre de lien entre le comportement alimentaire des patients et cette hormone.

* **Signaux pancréatiques.** Les patients anorexiques montrent des altérations des concentrations circulantes **d'insuline**. Même si les données ne sont pas toujours concordantes, il s'avère que dans la plupart des études, les concentrations plasmatiques d'insuline sont réduites et une augmentation de la sensibilité à cette hormone favorisant ainsi une capture et une assimilation de glucose plus importante dans les cellules est décrite (Dostalova *et al.*, 2007, Kinzig *et al.*, 2007). Les taux plasmatiques de **peptide PP** restent anormalement élevés après l'ingestion d'un repas chez des anorexiques de type restrictive et ces taux sont toujours élevés avec la restauration du poids corporel (Alderdice *et al.*, 1985 ; Kinzig *et al.*, 2007). Ces résultats laissent supposer que ce peptide jouerait un rôle dans le maintien de la maladie. Les seules études, à ma connaissance, qui se sont intéressées au rôle potentiel de **l'amyline** chez les anorexiques ont montré une diminution des concentrations plasmatiques associées à une faible densité minérale osseuse (Misra *et al.*, 2007 ; Wojcik *et al.*, 2010). Ce dernier point souligne le rôle potentiel de cette hormone sur la stimulation des ostéoblastes (Cornish *et al.*, 1995) et le fait qu'elle serait aussi impliquée dans le déséquilibre du métabolisme osseux observé chez les AM. Relativement peu d'études se sont intéressées au rôle potentiel du

glucagon chez les anorexiques ce qui est d'autant plus étonnant étant donné le rôle hypoglycémiant et orexigène que joue cette hormone, alors que les patients présentent souvent des diminutions de leur glycémie et une diminution de leur prise alimentaire. Les rares études qui se sont intéressées à cette hormone ont montré soit aucune différence significative (Alderdice *et al.*, 1985), soit une diminution des concentrations plasmatiques à jeun (Kumai *et al.*, 1988). Concernant **le GLP-1**, de nouvelles investigations semblent nécessaires, car d'un côté il apparaît une diminution de ces taux circulants chez les enfants AM (Tomasik *et al.*, 2004 ; 2005) alors que ces taux sont augmentés chez les jeunes femmes (Germain *et al.*, 2007).

* **Signaux adipocytaires.** La principale hormone largement étudiée chez les malades correspond à **la leptine** dont les taux plasmatiques sont drastiquement diminués (Germain *et al.*, 2007 ; 2010 ; Estour *et al.*, 2010 ; Legroux *et al.*, 2010). Cette réduction est souvent corrélée à une diminution des masses grasses (Misra *et al.*, 2011). De plus, il apparaît que l'activité physique prolongée, autre comportement observé chez certains patients est responsable d'une diminution des taux plasmatiques de leptine (Landt *et al.*, 1997 ; Davis *et al.*, 1997). Les patients anorexiques présentent généralement une ostéopénie dans 92% des cas, une ostéoporose dans 20% à 50% des cas et une augmentation du risque de fracture qui est multiplié par sept et des fractures décrites chez 44% des patients (Legroux *et al.*, 2005 ; 2007 ; 2008). Or, la leptine exerce un double impact sur le métabolisme osseux (Takeda *et al.*, 2002 ; Turner *et al.*, 2013). D'un côté, elle agirait *via* le système nerveux sympathique par activation des récepteurs β -adrénergiques comme régulateur négatif de la formation osseuse (Takeda *et al.*, 2002) ; d'un autre côté, elle agirait sur les ostéoblastes en augmentant leur nombre et leur activité (Turner *et al.*, 2013). En résumé, le mode d'action prédominant de la leptine sur la formation osseuse reste à déterminer pour espérer exploiter cette piste afin de réduire les altérations osseuses des patients anorexiques, mais également sur d'autres fonctions où cette hormone est impliquée notamment la fonction reproductrice. A l'inverse de la leptine, les concentrations plasmatiques **d'adiponectine** sont augmentées chez les patients anorexiques. Chez ces personnes, ce peptide apparaît d'autant plus intéressant pour ses effets périphériques de sensibilisation à l'action de l'insuline que pour ses effets sur le métabolisme osseux. Comme dit précédemment, les AM présentent des altérations osseuses or il a été montré que l'adiponectine agit sur les ostéoclastes, cellules dont le rôle est d'effectuer la résorption osseuse. Des injections d'adiponectine induisent une augmentation de la masse osseuse *via* une inhibition de l'ostéoclastogénèse (Oshima *et al.*, 2005 ; Yamaguchi *et al.*, 2007). Il a également été montré que ces effets peuvent faire intervenir le système nerveux autonome (Wu *et al.*, 2014).

Les données concernant les autres adipocytokines impliquées dans l'AM comme le TNF α , l'IL-6 ou la résistine sont sujets à controverse car les variations observées résultent souvent plus de la malnutrition (Nova et Marcos, 2006) que du comportement alimentaire mal adapté. Les résultats des dosages plasmatiques des cytokines inflammatoires chez les patients anorexiques soulignent que ces cytokines pourraient être un facteur favorisant au choc septique (Blackwell et Christman, 1996). A la différence de l'anorexie mentale qui est une maladie propre, la cachexie est plus le résultat de maladies liées à par exemple des infections parasitaires ou bactériennes (Scuderi *et al.*, 1986 ; Grau *et al.*, 1987 ; Argiles et Azcon-Bieto, 1988).

2.1.5. Altérations du métabolisme énergétique

Associé à la perte de poids liée à la réduction des masses tissulaires, les AM présentent également une réduction de leur dépense énergétique. Mais à ce jour, il n'existe pas de lien de cause à effet clairement établi entre la restriction alimentaire et la réduction de cette dépense énergétique et du métabolisme de base. De plus, une part non négligeable des malades a une activité physique intense et la répercussion de cette activité physique est peu connue sur la dépense énergétique. Les raisons de ce comportement ne semblent pas non plus bien établies chez les médecins : il serait soit une réponse des malades pour brûler davantage de calories et ainsi optimiser la perte de poids, soit une réponse involontaire liée à une conduite biologique inconsciente et dont une part deviendrait totalement automatique, pour réguler la thermogenèse par exemple. Pourtant, l'activité physique est connue pour entraîner une augmentation substantielle de la dépense énergétique par rapport au métabolisme de base (Caspersen *et al.*, 1985). L'intensité de cette dépense énergétique varie de léger à vigoureux selon le type d'activité physique (Vanhees *et al.*, 2012). D'après des études axées sur les mécanismes inhérents à cette dépense énergétique, il en ressort des résultats assez contrastés : soit la dépense énergétique est plus grande chez les AM et est en lien avec l'activité physique (Casper *et al.*, 1991 ; El Ghoch *et al.*, 2013), soit qu'il n'y a pas de différence significative (Pirke *et al.*, 1991 ; Pinkston *et al.*, 2001) ou soit il n'y a pas de lien entre la dépense énergétique et l'activité physique quelque soit le groupe (Pinkston *et al.*, 2001 Zipfel *et al.*, 2013). Indépendamment de la mesure et de la pratique d'une activité physique, les patients anorexiques présentent une réduction globale de leur métabolisme basal (Russell *et al.*, 2001 ; Bossu *et al.*, 2006 ; Karczewska-Kupczewska *et al.*, 2013 ; Zipfel *et al.*, 2013 ; Kosmiski *et al.*, 2014). De plus, leur dépense énergétique semble peu influencée par la prise alimentaire à la différence du quotient respiratoire dont les valeurs sont augmentées suite à l'ingestion de glucose (Russell *et al.*, 2001). A ma connaissance, une seule étude s'est intéressée à faire le lien entre la diminution du métabolisme de base, la dépense énergétique

totale et les facteurs circulants (Karczewska-Kupczewska *et al.*, 2013). En effet, cette étude montre que la baisse du métabolisme basal ne peut être exclusivement liée à la perte de masse grasse libre mais est principalement liée à la masse maigre.

2.1.6. Perturbations centrales

Sur le plan psychiatrique, les patients anorexiques présentent de nombreuses comorbidités avec des troubles dépressifs associés parfois à des conduites suicidaires réalisées ou avortées, ou encore des troubles anxieux, des troubles obsessionnels compulsifs, certains symptômes psychotiques et l'abus de substances. Toutefois, l'origine de ces troubles reste à ce jour incertaine. La question se pose de savoir si ces troubles sont à la base de l'anxiété et de l'obsession pour le poids corporel ou s'ils sont le résultat du comportement alimentaire (Kaye *et al.*, 2009). Etant donné le lien probable entre le comportement alimentaire et les processus affectifs chez les patients, mieux identifier et comprendre les structures neuronales à la base de ces processus constituent d'autres moyens potentiels pour mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie. Des études de neuro-imagerie ont, en effet, montré que différentes zones cérébrales sont différenciellement activées chez les patients avec entre autre le cortex préfrontal, le striatum, le thalamus ou encore le mésencéphale, Husain *et al.*, 1992 ; Kingston *et al.*, 1996 ; Swayze *et al.*, 1996 ; 2003 ; Inui *et al.*, 2001 ; Suchan *et al.*, 2010). Le volume du liquide céphalo-rachidien est également réduit et retrouve des valeurs normales avec la restauration du poids corporel (Swayze *et al.*, 2003). L'atrophie des différentes structures du cerveau chez les patients pourrait faire intervenir des processus de neuro-inflammation/neuro-dégénérescence tels que ceux qui ont été montrés dans le cas de l'anorexie-cachexie, mais aussi observés dans un modèle génétique d'anorexie correspondant aux souris *anx/anx*, présenté plus en détail dans la partie suivante (Boghi *et al.*, 2011 ; Mercader *et al.*, 2012 ; voir revue Nilsson *et al.*, 2013 ; voir revue Pimentel *et al.*, 2014).

Ainsi, les patients anorexiques présentent des troubles motivationnels, de l'addiction, anxieux et dépressifs faisant intervenir les circuits cognitifs et limbiques qui modulent et intègrent les processus neuronaux liés à l'appétit, aux émotions et aux processus cognitifs. Les systèmes sérotoninergiques et dopaminergiques ont longtemps été étudiés chez les patients anorexiques (Gillberg, 1983). Ces monoamines modulent plusieurs aspects de la balance énergétique mais aussi l'humeur, l'impulsivité et l'anxiété. La mesure des métabolites de la dopamine et de la sérotonine dans le liquide céphalo-rachidien a révélé une diminution transitoire de 30% d'acide homovanillique et une diminution de 20% de l'acide 5-hydroxyindolacétique (Kaye *et al.*, 1984). Dans le cas du système sérotoninergique, les études utilisant la tomographie par émission de positrons (PET) montrent une forte corrélation

positive entre les sites de liaison des sites potentiels de liaison 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} de la sérotonine et l'évitement du danger faisant partie des traits de caractères lié à l'anxiété (Cloninger *et al.*, 1994, Galusca *et al.*, 2008). Bien qu'il a été montré chez les malades comme chez l'animal que la restriction alimentaire induit une diminution de la biosynthèse de sérotonine en raison de la moindre disponibilité de son précurseur, le tryptophane, une augmentation compensatoire des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau postsynaptique est observée (Fernstrom et Wurtman, 1972 ; Anderson *et al.*, 1990 ; Bailer *et al.*, 2007). Un dysfonctionnement dopaminergique au niveau du striatum, susceptible d'altérer la récompense, d'affecter le contrôle moteur et de diminuer la prise alimentaire chez les AM (Frank *et al.*, 2005) a été décrit dans de nombreuses études. Ainsi, les études d'imagerie PET ont montré que des sujets anorexiques en récupération présentent une augmentation des capacités de liaison des récepteurs D2 et D3 striataux, en particulier dans le noyau caudé dorsal et le putamen dorsal. Cette variation est corrélée positivement avec le comportement d'évitement aussi bien chez les anorexiques que chez les sujets rétablis (Frank *et al.*, 2005) qui favoriserait les comportements d'isolement parfois observés dans la maladie.

Les études menées chez l'animal montrent qu'il existe une interaction entre les systèmes sérotoninergique et dopaminergique. Ainsi, l'activation des récepteurs 5-HT_{2C} inhibe de façon tonique les neurones dopaminergiques (De Deurwaerdere *et al.*, 2004 ; Cools *et al.*, 2008). Il existe également une corrélation positive entre le transporteur de la sérotonine et les récepteurs D2 et D3 dans le striatum ventral et le noyau caudé dorsal chez les sujets rétablis de désordres alimentaires (Kaye *et al.*, 2009). De plus, dans une récente revue de Rask-Anderen *et al.*, (2010), des études d'association génétique réalisées chez les patients anorexiques ont montré plusieurs gènes potentiellement impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel. Parmi les gènes les plus susceptibles d'être impliqués, les gènes codant pour les systèmes monoaminergiques sont ciblés et devraient faire l'objet d'une recherche plus fouillée. Toutefois, même si plusieurs gènes sont susceptibles d'être impliqués dans l'AM, les données actuelles ne permettent pas d'expliquer la grande héritabilité suspectée de la maladie (Rask-Andersen 2010 ; Boraska *et al.*, 2014).

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le maintien et l'évolution de facteurs clés dont le fonctionnement est altéré dans l'AM, plusieurs modèles animaux ont été développés, que ce soit des modèles génétiques spontanés ou induits par délétion ou surexpression de gènes candidats, ou des modèles environnementaux qui tentent de mimer le plus grand nombre des variations phénotypiques observées dans la maladie.

2.2. Modèles animaux :

Les progrès dans les traitements des troubles du comportement alimentaire tels que l'anorexie mentale nécessitent une compréhension en profondeur des symptômes et des mécanismes physiopathologiques. Le développement d'un modèle animal approprié de l'AM apparaît comme quelque chose de difficile au vu de l'étiologie complexe de cette maladie qui implique aussi bien des facteurs génétiques, environnementaux que sociaux-culturels. Bien que les facteurs psychologiques jouent un rôle pivot dans le développement de l'AM, une meilleure compréhension des bases biologiques de ce trouble alimentaire peut aider au développement de nouveaux traitements pharmacologiques complémentaires aux thérapies actuellement utilisées par les psychologues et les psychiatres. Ces aspects étant très difficiles voire impossibles à étudier chez l'Homme, notamment pour des raisons éthiques, il est nécessaire de développer des modèles animaux pertinents permettant de reproduire au mieux plusieurs aspects de la maladie. Ainsi, chez le rongeur (rat – souris) différents modèles génétiques et environnementaux ont été développés avec plus ou moins de succès.

2.2.1. Modèles génétiques

Dans les modèles génétiques, on trouve deux catégories : les modèles de mutation spontanée et les modèles de délétion génétique constitutive ou conditionnelle.

Dans la littérature, deux modèles de mutation spontanée ont décrit un comportement similaire à celui trouvé chez les patients anorexiques à savoir une restriction alimentaire spontanée.

* **Les souris *anx/anx***. Ce modèle a été largement étudié et décrit. Les souris mutantes *anx/anx* ont émergé de façon spontanée au sein des Laboratoires Jackson (Bar Harbor, USA) en 1976. Ces souris se caractérisent par un aspect émacié, une réduction de la prise alimentaire et une mort prématurée trois à cinq semaines après la naissance. En effet, ces souris mangent moins que la normale malgré un accès libre à la mère à partir du cinquième jour après la naissance (Maltais *et al.*, 1984). La courbe de croissance de ces souris commence à dévier à partir du neuvième jour après la naissance et elles pèsent moitié moins que des souris de la même portée mais sans la mutation à 21 jours (sevrage). Elles se distinguent aussi par des mouvements anarchique de la tête, des tremblements, des problèmes de coordination de l'allure et une hyperactivité sans que les paramètres sanguins soient affectés. L'analyse génétique de la mutation montre qu'elle affecte une séquence localisée sur le chromosome 2 entre les marqueurs D2Mit133 et Jojo 5 qui inclut le gène *Nduaf1* (NADHdehydrogenase (ubiquinone) 1a-subcomplex, assembly factor 1), codant pour une des protéines nécessaires à l'assemblage du complexe I mitochondrial (Lidfors *et al.*, 2011). Les analyses transcriptomiques

ont aussi montré une augmentation de l'expression de microARN hypothalamiques (Mercader *et al.*, 2012). Ces souris montrent également des altérations dans les systèmes neuroptidergiques et de neurotransmetteurs hypothalamiques associés au dysfonctionnement mitochondrial et aux processus de neurodégénérescence / neuroinflammations (voir revue Nilsson *et al.*, 2013). De même, des variations dans l'expression de la sérotonine (augmentation de l'innervation sérotoninergique dans plusieurs régions du cerveau) et de la dopamine (diminution des concentrations de dopamine dans le striatum) ont été décrites (Johansen *et al.*, 2001 ; Nilsson *et al.*, 2013). On peut penser que ces souris en plus de constituer un excellent modèle d'anorexie-cachexie seraient très utiles dans l'étude de l'anorexie du nourrisson ce dernier point restant largement sous étudié.

* **Les rats lou/C.** Il existe un autre modèle de rongeur qui provient d'une sélection réalisée au sein de l'université de Louvain (Belgique) à partir de rat Wistar. Les rats Lou/C se caractérisent à l'origine par une espérance de vie plus longue (Veyrat-Durebex *et al.*, 1997). Ils présentent aussi comme particularité d'être résistants à l'obésité induite par une alimentation grasse ou par l'âge et d'ingérer moins de calories par jour que le rat Wistar soumis à un régime alimentaire standard. En effet, ces rats ont une modification de leur pattern de prise alimentaire avec une réduction de l'alimentation associée à un plus faible poids corporel, lié à une réduction des dépôts adipeux (Veyrat-Durebex *et al.*, 1997 ; 2009). Dans ce modèle, il apparait une modification de métabolisme lipidique associé à une plus grande sensibilité à la leptine (Veyrat-Durebex *et al.*, 2009 ; 2013). A ce jour aucune mutation particulière n'a été identifiée dans cette souche, même si ces rats présentent un phénotype particulier. Toutefois, ces rats ont été beaucoup utilisés pour leur particularité à développer des tumeurs cancéreuses (Bazin *et al.*, 1974) et ils constitueraient un bon modèle de cachexie lié au cancer.

* **Modèles d'invalidation génétique.** A côté de ces modèles de mutations spontanées, différents modèles génétiques ont été développés. Des études d'associations génétiques ont montré que différents gènes semblent particulièrement dans l'AM (Rask-Andersen *et al.*, 2010). Ainsi, les gènes impliqués dans les troubles mentaux, ceux liés au système de motivation/récompense, ainsi que les gènes liés à la régulation de la prise alimentaire ont été montrés comme présentant des polymorphismes associés à l'AM (Rask-Andersen *et al.*, 2010). Les études d'imagerie médicale ayant montré une altération de l'activité sérotoninergique et dopaminergique chez les patients anorexiques (Bailer *et al.*, 2013), les gènes codant des molécules impliquées dans le système monoaminergique ont été les plus étudiés chez l'animal. Ainsi, des souris déficientes pour certains types de récepteurs à la sérotonine donnent des phénotypes intéressants selon les conditions dans lesquelles elles sont placées.

Les souris déficientes pour le récepteur 5HT_{1B} se caractérisent par une restriction alimentaire volontaire et une hyperactivité. De plus, il apparaît que le récepteur 5HT_{4c} interviendrait dans cette hyperactivité qui disparaît chez les souris délétées pour ces deux récepteurs (Jean *et al.*, 2012). De même, les souris déficientes seulement pour 5HT_{4-c} ont une altération de l'hypophagie induite par le stress qui indique que la sérotonine intervient aussi dans la réponse au stress (Compan *et al.*, 2004). De même, on trouve des souris déficientes pour la dopamine et plus précisément l'enzyme clé intervenant dans sa synthèse, la tyrosine hydroxylase (TH). Ces souris deviennent hypophagiques et hypoactives et meurent de faim après 34 jours (Szczypka *et al.*, 1999). Ainsi, comme souligné dans les exemples précédents, l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés pour un ou plusieurs récepteurs/transporteurs et ce de manière ciblée dans des régions clés de la régulation de la balance énergétique permet de mieux comprendre la réponse multifactorielle de la sérotonine ou de la dopamine dans les régions limbiques et hypothalamiques. Ce point est d'autant plus sensible que, parmi les traitements proposés dans l'AM, les antidépresseurs comme les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine sont régulièrement utilisés. Le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1) apparaît lui aussi impliqué ; des souris spécifiquement invalidées pour CB1 dans l'hypothalamus montrent une perte de poids importante associée à une dépense énergétique plus importante, en dépit d'une alimentation standard et normocalorique (Cardinal *et al.*, 2012). Dans le cas des modèles transgéniques s'intéressant aux gènes hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, il apparaît des résultats variables avec soit des phénotypes d'obésité soit des phénotypes qui ne sont pas discernables. Toutefois, des mécanismes de compensation peuvent apparaître et cacher le rôle potentiel de certains peptides ; c'est le cas notamment pour les neuropeptides NPY et AgRP pour lesquels l'ablation des neurones chez des souris adultes entraîne une diminution de la prise alimentaire associée à une perte de poids corporel qui ne sont pas observées quand cette ablation est réalisée chez les nouveaux nés (Luquet *et al.*, 2005). Le MCH, un autre neuropeptide orexigène apparaît essentiel dans le contrôle de la prise alimentaire mais également dans le contrôle de l'activité physique avec une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de l'activité physique nocturne chez les rongeurs déficients pour son gène (Shimada *et al.*, 1998 ; MacNeil *et al.* ; 2013).

D'autres gènes comme ceux codant les récepteurs aux opioïdes (OPRD1), le facteur de croissance BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), les récepteurs glutamatergiques de type NMDA, les récepteur acétylcholine de type muscarinique, les récepteurs à MC4R, ou encore le CRH constituent des cibles potentiellement impliqués dans le maintien et/ou l'évolution de

la maladie (Rask-andersen *et al.*, 2010, Kim 2012).

Toutefois, alors que des souris déficientes pour la leptine ou son récepteur présentent un phénotype d'obésité, il n'apparaît pas de phénotype opposé pour les souris déficientes pour la ghréline ou son récepteur. On peut cependant souligner le rôle essentiel de cette hormone dans le maintien de l'homéostasie glucidique en condition de restriction alimentaire mais également dans l'activité anticipatoire à la prise de nourriture (Sun *et al.*, 2008 ; Verhagen *et al.*, 2011 ; McFarlane *et al.*, 2014).

Cependant, ces modèles sont le plus souvent utilisés à court terme et ne permettent de suivre l'évolution du phénotype. Par ailleurs, ils ne montrent que certains aspects de la maladie comme l'hypophagie, l'hyperactivité ou des problèmes de motivation... L'utilisation de modèles «environnementaux» permet de reconsidérer certains de ces aspects.

2.2.2. Modèles environnementaux

Différents modèles environnementaux ont été proposés afin d'essayer de mimer différents aspects de l'AM. Ces modèles vont de la restriction alimentaire chronique à la combinaison de différents facteurs comme le stress ou l'activité physique associée à une restriction d'accès à la nourriture de différents types.

a) Restriction alimentaire

Les premiers modèles d'AM correspondent à des modèles de restriction alimentaire chronique. Toutefois, dans la plupart des études les restrictions alimentaires sont relativement faibles, n'excédant que très rarement les 40%. Elles s'intéressent davantage aux bienfaits de ces restrictions comme l'augmentation de l'espérance de vie (voir revue Speakman, 2011). Or, les animaux en captivité se suralimentent classiquement d'environ 30% par rapport à leurs besoins physiologiques ce qui entraîne une prise notable de poids avec le temps et conduit souvent à utiliser des animaux en surpoids comme référence (Austad, 2001). Il faut noter que selon le type d'accès à la nourriture les conséquences sur les animaux ne sont pas les mêmes ; ainsi une restriction de 50% de la nourriture avec une distribution en deux repas entraîne des dépôts adipeux plus importants que lorsque cette distribution se fait en un seul repas (Mistlberger, 1994 ; Siegfried *et al.*, 2003 ; Challet *et al.*, 2009 ; Verbaeys *et al.*, 2011). Bien que la restriction alimentaire conduise à un affaiblissement, plusieurs changements dans les fonctions neuroendocriniennes peuvent être mimés. En fonction du degré de restriction alimentaire des altérations cognitives ou motrices sont observées (Siegfried *et al.*, 2003). Les rares études utilisant des restrictions plus sévères ont montré une diminution des

performances dans la piscine de Morris non observé avec une restriction plus douce (Avraham *et al.*, 2001). Malgré son efficacité sur un plan purement physiologique, ce modèle présente l'inconvénient de présenter un taux de mortalité élevé et de ne pas mimer d'autres symptômes typiques de l'AM de type restrictif : la restriction volontaire, l'hyperactivité et le stress chronique.

b) Modèles de stress

Le stress est une autre composante de l'AM que les chercheurs ont essayé d'appliquer dans leur modèle. Ainsi, différents type de stress ont été testés sur les animaux de laboratoire allant de l'hypophagie induite par le stress de contention, la nage dans l'eau froide, les chocs à la queue ou encore la stimulation centrale (Wilson et Cantor, 1986 ; Shimizu *et al.*, 1989 ; Compan *et al.*, 2004). Toutefois, en raison de la perte rapide de poids corporel, ce type de modèle ne peut être appliqué sur le long terme. A côté de ce type de modèle utilisant des stress aigus, un autre modèle basé sur un stress social chronique a été développé par l'équipe de Van Leeuwen *et al.*, (1997). Ce modèle, nommé SBA pour « separation-based anorexia » a été caractérisé par l'équipe de Boulogne sur Mer (équipe PMOI, Université du Littoral, Dr C Chauveau) et les résultats ont récemment publiés (Zgheib *et al.*, 2014 **voir annexe**). Les souris sont séparées par des cloisons de plexiglas laissant passer les odeurs des différentes souris mais empêchant toutes interactions sociales exceptées lors des périodes d'accès à la nourriture. Ce protocole entraîne une perte de poids corporel importante et une détérioration des fonctions cognitives associées à une diminution en catécholamines (adrénaline et noradrénaline) au niveau de l'hippocampe (Hao *et al.*, 2001). Ce modèle est très intéressant car il reprend un des points essentiels de l'AM à savoir le stress chronique. Il a été caractérisé sur plusieurs aspects (Zgheib *et al.*, 2014). En parallèle à l'étude de ce modèle SBA, nous avons développé, toujours en collaboration avec le groupe du Dr Chauveau, un modèle complémentaire qui lui présente un autre aspect de l'AM : l'activité physique volontaire (voir *infra*).

c) Modèles d'activité physique

Les modèles animaux d'AM basés sur l'activité physique reposent sur des études chez le rat dans datant des années 1950-1960. Ces études se sont intéressées au poids corporel comme facteur susceptible de faire varier le nombre de révolutions effectuées par les animaux. Plusieurs expériences réalisées à cette époque en faisant varier l'accès à la

nourriture rapportèrent un grand nombre de morts chez les rats aux cours des protocoles (Hall & Hanford, 1954 ; Boakes, 2007). Ce n'est qu'en 1967 que Routtenberg et Kuznesov ont été les premiers à effectuer une étude systématique de ce qu'ils qualifièrent de « self-starvation » ou auto-privation puis plus tard « Activity-Based Anorexia » (ABA) par Epling *et al.*, (1983). Ce modèle consiste à placer un rat dans une cage équipée d'une roue et de le soumettre à une restriction alimentaire consistant à présenter la nourriture uniquement pendant une heure par jour, à la place d'une alimentation *ad libitum*. Très rapidement, le rat réduit sa prise alimentaire, préférant passer du temps dans la roue d'activité. Ce comportement induit une perte rapide de poids, près de 25% de leur poids initial en quelques jours associée à une hypophagie, une hyperactivité physique, une altération du cycle oestral chez les femelles et une mort prématurée si les rats sont maintenus dans ces conditions (Routtenberg et Kuznesof, 1967 ; Watanabe *et al.*, 1988). Ainsi, ce modèle mime de nombreux symptômes de la maladie. Ce modèle a par la suite été adapté à la souris et a fait l'objet de nombreuses études visant aussi bien le critiquer qu'à déterminer les altérations causées par de telles conditions (Gelegen *et al.*, 2007 ; Boakes, 2007 ; Klenotich et Dulawa, 2012). Les différentes études réalisées utilisant ce protocole ont ainsi permis de déterminer différents facteurs susceptibles d'être impliqués dans l'activité physique qui se met en place avant la distribution de nourriture telles que la leptine, la ghréline ou la corticostérone dont les concentrations sont altérées de la même façon que chez les malades (Exner *et al.*, 2000 ; Hillebrand *et al.*, 2005b ; Duclos *et al.*, 2008 ; Verhagen *et al.*, 2011). Ce modèle bien que sujet d'investigation n'excédant que très rarement les dix jours a toutefois permis de mimer un certain nombre d'altérations décrites dans l'AM. Il a également permis d'investiguer un certain nombre de circuits impliqués dans l'apparition de l'hyperactivité physique qui dans ce modèle constitue un facteur délétère pour la survie des animaux. Ainsi, il semble que les différents noyaux et peptides hypothalamiques mais également les circuits impliqués dans la motivation et la récompense soient impliqués dans cette activité physique (Rijke *et al.*, 2006 ; Kanarek *et al.*, 2009 ; Lewis *et al.*, 2010 ; Verhagen *et al.*, 2011 ; Merkestein *et al.*, 2013 ; Vidal *et al.*, 2013). A ce jour, ce modèle associé au cadre de l'AM reste probablement l'un des plus caractérisés (Tableau 10). Comme l'ont souligné Klenotich et Dulawa (2012) dans une critique de ce modèle, le protocole ABA est très dépendant de plusieurs facteurs qui peuvent amplifier ou réduire plusieurs aspects du phénotype comme la souche ou l'espèce de rongeur utilisé, le sexe, la distribution de la nourriture ou encore la température ambiante (Hillebrand *et al.*,

2005 ; Boakes, 2007 ; Klenotich et Dulawa, 2012 ; Pjetri *et al.*, 2012). En effet, les femelles sont plus sensibles que les mâles à ce protocole (mais la plupart des études publiées ont été faites chez les mâles), de même que les animaux jeunes (Gelegen *et al.*, 2007; Pjetri *et al.*, 2012). Ce dernier point présente un parallèle intéressant avec les populations préférentiellement susceptibles de développer une AM chez l'Homme et augmente la validité théorique de ce modèle. Par ailleurs, le moment de la journée où la nourriture est distribuée influence également la survenue de ce phénotype. N'oublions pas que les rongeurs sont des animaux nocturnes et qu'il est préférable de distribuer la ration alimentaire le soir et non le matin, comme c'est souvent le cas dans les expériences décrites. De même, du fait du déficit énergétique et de leur isolement, les animaux sont en hypothermie. L'activité physique entretenue dans la roue leur permet ainsi d'augmenter leur température corporelle. Donc, lors de la distribution de nourriture, il se produit un conflit entre le besoin de manger et celui de se réchauffer. Ainsi, lorsque la température de la pièce est augmentée à 32°C, le phénotype de privation alimentaire disparaît (Cerrato *et al.*, 2012). Enfin, si à l'origine ce modèle a été décrit comme induisant une privation volontaire de nourriture, les travaux de Boakes indiquent que le comportement de privation alimentaire observé chez le rat ABA reflète une réduction de sa palatabilité pour la nourriture proposée pendant le temps restreint (Boakes et Juraskova, 2001; Boakes, 2007). En effet, les animaux déshydratés par l'exercice physique vont en priorité s'abreuver de façon importante, plutôt que de consommer des croquettes très sèches, ce qui conduit à une satiété prématurée, réduisant leur prise alimentaire. Cela a été démontré par une distribution de nourriture très hydratée qui abolit complètement le phénotype ABA (réduction poids, hyperactivité, restriction volontaire, *etc...*).

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons modifié ce modèle ABA afin de suivre sur le long terme les altérations physiologiques et neurobiologiques induites par la combinaison de l'activité physique et d'une restriction alimentaire quantitative. Le modèle modifié sera décrit dans le chapitre I. Des souris femelles C57Bl/6, âgées de 8 semaines, matures sexuellement, sont placées dans une cage équipée d'une roue et soumises à une restriction quantitative de nourriture de 50% sur une période de 2 à 10 semaines. La nourriture est distribuée le soir et les souris peuvent la consommer à leur rythme. La présence de 2 souris par cage évite le stress d'isolement et l'hypothermie qu'induirait l'absorption réduite de

calories. Ce protocole permet ainsi de maintenir les souris en vie sur une longue période et donc d'étudier les altérations tardives.

Ainsi, nous utiliserons ce modèle présentant une forte validité d'apparence avec les symptômes cliniques de l'AM, pour mieux évaluer l'impact de paramètres telles que l'activité physique et la restriction alimentaire quantitative à long terme sur différents facteurs particulièrement touchés dans l'AM. Le tableau ci-dessous présente une synthèse des altérations mimées ou non par les différents modèles existants (**Tableau 10**). Pour étudier les effets à long terme de l'activité sur les altérations induites par la restriction alimentaire, les limites du modèle ABA, notamment la durée limitée, nous ont conduits à modifier ce modèle initial. Le nouveau modèle ainsi développé est désigné par « FRW » (Food Restriction & Wheel).

Tableau 10 Synthèse de l'apport des modèles existants

	AM	FR modéré	FR sévère	SBA	ABA	FRW
Perte importante de poids	+	-	+	+	+	?
Métabolisme énergétique	↘	+	?	-	-	?
Activité physique (anticipatoire)	+/-		+/-	?	+	?
Reproduction	↘	+	+	+	+	?
GH/ IGF-1	↗/↘	+	+	+	?	?
Hypoleptinémie	↘	+		+	+	?
Hyperghrélinémie	↗	?	+	?	+	?
Système ghreline (GOAT.)	?	+			?	?
Hypercortisolémie	↗	?	+	+	+	?
Hyperadiponectinémie	↗	+/-	?	non	?	?
Masse osseuse	↘	+	?	+	?	?
Adiposité médullaire	+/-	+	?	non / en cours	?	?
Altérations centrales (système homéostatique)	+/-	+	+	en cours	+	?
Altérations centrales (système non homéostatique)	+/-	+/-	+	?	+	?
Phase longue de restriction	+	+	?	+	-	?
Phase de récupération	+/-	+	+/-	+	+/-	?
Niveau d'anxiété	+	?	?	?	-	?

OBJECTIFS

Dans le but d'étudier les effets positifs et négatifs de l'activité physique sur les perturbations induites dans un modèle murin de restriction alimentaire chronique, ma thèse comporte deux objectifs principaux :

- Tout d'abord, il s'agissait de caractériser les altérations physiologiques, endocriniennes et métaboliques mimant les principales perturbations périphériques physiologiques observées dans l'anorexie mentale. Après avoir défini le cahier des charges du modèle permettant cette étude, j'ai constaté que ce modèle n'existait pas tel quel dans la littérature. Je me suis alors employé à adapter un modèle existant, puis à caractériser les altérations induites à court et long terme dans mon propre modèle. Différents paramètres ont été mesurés et concernent à la fois les patterns de prise de poids, de prise alimentaire et d'eau, associés à ceux de l'activité en cage standard ou métabolique. Plusieurs paramètres reflétant les altérations métaboliques ont été évalués en parallèle des dosages plasmatiques d'hormones (leptine, ghréline...) et de métabolites (glycogène hépatique, triglycérides..).
- Par ailleurs, l'étude des altérations centrales a été effectuée en lien avec l'un des facteurs endocriniens clé de la maladie : la ghréline. Pour atteindre ce deuxième objectif, différents points ont été abordés :
 - l'étude de l'impact de la ghréline sur la prise alimentaire, la glycémie et l'axe somatotrope.
 - l'étude des altérations des principaux neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation homéostatique et non homéostatique de la prise alimentaire.

Les résultats de ces différents travaux ont fait (cf annexes) et vont faire l'objet de différentes communications et publications originales.

CHAPITRE 1

Caractérisation du phénotype d'un modèle "Activity-based Anorexia" modifié : Impact de l'activité Physique

Article accepté in Am. J. Physiol. Endoc. Metab. :

Physical activity: benefit or weakness in metabolic adaptations in a mouse model of chronic food restriction

I. Introduction

Dans l'introduction bibliographique, nous avons décrit différents modèles animaux mimant un certain nombre de symptômes observés dans l'anorexie mentale. Ces modèles, comme tous modèles animaux, présentent des limites. Elles sont le reflet des caractéristiques que les équipes de recherche veulent ou réussissent à modéliser en essayant de répondre au maximum aux critères de validité théorique, d'apparence et de prédiction (McKinney et Bunney, 1969). Moins une maladie est connue, plus il sera difficile de la modéliser. Il ne faut pas non plus chercher une correspondance parfaite entre la symptomatologie humaine et celle générée chez le modèle animal, notamment parce que les différences inter-spécifiques demeurent et ne doivent pas être négligées dans l'interprétation des résultats. Nos travaux se basent ici sur des données obtenues dans un des modèles les plus étudiés dans le cadre des modèles d'AM, le modèle d'Anorexie Basée sur l'Activité (ABA). Toutefois, ce modèle présente le gros désavantage d'entraîner une mort

prématurée des animaux. De plus, la grande majorité des études s'intéressant à ce modèle se sont focalisées sur les aspects centraux. Il n'existe donc que de très rares données relatant les altérations périphériques, métaboliques et endocriniennes, qui sont susceptibles d'être directement impliquées dans l'entretien de la maladie. Au vu des différentes limites du modèle ABA (*cf* introduction bibliographique), nous avons décidé de le modifier afin de maintenir les animaux dans des conditions drastiques de balance énergétique négative sur une longue durée et ainsi d'être plus en accord avec la chronicité observée dans l'AM.

Notre modèle qualifié de FRW pour « Food Restriction and Wheel » diffère du modèle initial ABA par les points suivants :

- Restriction quantitative progressive (30 à 50%) au lieu d'une restriction dans la durée (1 à 2h). Ce type de restriction quantitative s'approche davantage du comportement adopté par le patient anorexique de type restrictif qui limite sa quantité de nourriture, mais qui mange à différents moments de la journée. Cela permet aussi de prolonger le protocole sur du long terme et ainsi d'observer des altérations tardives conformément à la pathologie humaine qui peut durer de nombreuses années.
- Utilisation de jeunes femelles pubères, alors que la majorité des études ABA utilise des mâles. Comme il est rappelé dans l'introduction bibliographique, l'AM touche essentiellement des individus de sexe féminin.
- Limitation du stress d'isolement qui peut être considéré comme un stress chronique chez les rongeurs. Les souris peuvent également mieux réguler leur thermogenèse. Dans les modèles ABA, les rongeurs sont seuls dans leur cage. Les patients anorexiques maintiennent un certain lien social en dépit d'une certaine comorbidité avec des troubles de l'humeur comme l'anxiété et la dépression.

Ainsi, il nous a fallu dans un premier temps déterminer la validité du modèle en établissant quelles conséquences physiologiques étaient mimées parmi celles observées dans l'AM.

Le premier chapitre qui a fait l'objet d'une publication dans « *American Journal of Physiology – Endocrinology & Metabolism* » rapporte la caractérisation physiologique, métabolique et endocrinienne. Cette caractérisation se focalise autour d'une question majeure posée également par les cliniciens : **quels sont les effets positifs et les effets négatifs de l'activité physique (modérée) sur le développement et le maintien des altérations induites par la restriction alimentaire chronique.**

Après la présentation de l'article « Physical activity: benefit or weakness in metabolic adaptations in a mouse model of chronic food restriction? », des données complémentaires et

préliminaires concernant la période de récupération après 10 semaines de protocole seront exposées.

II. Activité physique : avantage ou désavantage dans les adaptations métaboliques dans un modèle murin de restriction alimentaire chronique?

Physical activity: benefit or weakness in metabolic adaptations in a mouse model of chronic food restriction?

Mathieu Méquinion,^{1,2,3} Emilie Caron,² Sara Zgheib,^{1,3} Aliçia Stievenard,^{1,4} Philippe Zizzari,⁵ Virginie Tolle,⁵ Bernard Cortet,^{1,6} Stéphanie Lucas,^{1,3} Vincent Prévot,^{1,2} Christophe Chauveau,^{1,3*} and Odile Viltart^{1,2*}

¹University Lille (ULCO, USTL, Lille2), Lille, France; ²Development and Plasticity of Postnatal Brain, UMR 837 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Lille, France; ³Physiopathology of Inflammatory Bone diseases, EA4490, Boulogne sur Mer, France; ⁴Molecular Events Associated With Early stages of Parkinson's Disease UMR 837 INSERM, Lille, France; ⁵Psychiatry and Neurosciences Center, UMR 894 INSERM, Paris, France; and ⁶Department of Rheumatology, CHRU, Lille, France

Submitted 21 July 2014; accepted in final form 1 December 2014

Méquinion M, Caron E, Zgheib S, Stievenard A, Zizzari P, Tolle V, Cortet B, Lucas S, Prévot V, Chauveau C, Viltart O.

Physical activity: benefit or weakness in metabolic adaptations in a mouse model of chronic food restriction? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308: E000–E000, 2015. First published December 2, 2014; doi:10.1152/ajpendo.00340.2014.—In restrictive-type anorexia nervosa (AN) patients, physical activity is usually associated with food restriction, but its physiological consequences remain poorly characterized. In female mice, we evaluated the impact of voluntary physical activity with/without chronic food restriction on metabolic and endocrine parameters that might contribute to AN. In this protocol, FRW mice (i.e., food restriction with running wheel) reached a crucial point of body weight loss (especially fat mass) faster than FR mice (i.e., food restriction only). However, in contrast to FR mice, their body weight stabilized, demonstrating a protective effect of a moderate, regular physical activity. Exercise delayed meal initiation and duration. FRW mice displayed food anticipatory activity compared with FR mice, which was strongly diminished with the prolongation of the protocol. The long-term nature of the protocol enabled assessment of bone parameters similar to those observed in AN patients. Both restricted groups adapted their energy metabolism differentially in the short and long term, with less fat oxidation in FRW mice and a preferential use of glucose to compensate for the chronic energy imbalance. Finally, like restrictive AN patients, FRW mice exhibited low leptin levels, high plasma concentrations of corticosterone and ghrelin, and a disruption of the estrous cycle. In conclusion, our model suggests that physical activity has beneficial effects on the adaptation to the severe condition of food restriction despite the absence of any protective effect on lean and bone mass.

food restriction; physical activity; animal model; physiological adaptation; anorexia nervosa

PHYSICAL ACTIVITY IS KNOWN to have beneficial and protective effects for health exerted at both the peripheral and central levels in mammals. Indeed, exercise reduces the prevalence of obesity and its comorbidities like type 2 diabetes, cardiovascular pathologies, and hepatic steatosis but also stress, anxiety, and depression (14, 58, 69). However, excessive physical activity could lead to injuries (20), especially when combined with restrictive diet (38). Among the various alterations observed in some categories of athletes, growth retardation,

muscular atrophy, amenorrhea or metabolic disturbances, and susceptibility to eating disorders might have deleterious consequences on health (52, 61, 64, 65). These high-risk conducts are also observed in restrictive anorexia nervosa (AN) with 35–80% of patients who present excessive physical activity associated with a severe chronic food restriction (11, 12), even if this last parameter has been omitted from the diagnostic criteria currently used (1, 2). Beside severe weight loss and metabolic disturbances, AN is also associated with endocrine alterations, reproductive dysfunctions, osteopenia, and osteoporosis (24, 29, 30, 40, 41, 42, 43, 47). The prevalence of AN has increased drastically within recent decades and is currently the third-largest cause of chronic illness in teenagers (35, 44). It leads to poorly known central and/or peripheral reprogramming that permits the individual/organism to adapt to a chronically reduced energy supply. The role of enhanced activity in this reprogramming remains to be determined.

It remains an open question whether the physical activity observed in AN is beneficial or deleterious for health and whether it forms an adaptation to this drastic caloric restriction. Answering this question would inform clinicians as to whether it is better to promote regular physical activity instead of existing hyperactivity or inactivity in AN patients. For this purpose, the use of animal models mimicking distinct physiological components of AN is essential. A number of different animal models have been developed, especially environmental models, and one of these associates wheel running access with time-restricted feeding. This model was inappropriately called “self-starvation” or, more recently, “activity-based anorexia” (ABA) and was developed in the rat by Routtenberg and Kuznesof (56). Many symptoms described in AN were reproduced in this model, including increased activity and various physiological alterations (33, 34, 70). In the ABA paradigm, the phenotype observed can be amplified or reduced depending on the rodent strain, sex, and age (28, 39). However, most of the studies were performed with male rodents, whereas the majority of AN cases are described in female patients. Regarding self-starvation as part of a cognitive/emotional aspect of the disease proved difficult, even impossible, to mimic in mice. Indeed, in the ABA model, the self-starvation, which is not always observed (36), might be related to physiological adaptations to maintain thermogenesis and to compensate for the dryness of the pellets since the presentation of humidified pellets during the 2-h time-restricted feeding or an increasing of the room temperature led to the disappearance of the

* C. Chauveau and O. Viltart share coauthorship of this article.

Address for reprint requests and other correspondence: O. Viltart, JPARC, Université Lille de France (USTL), UMR 837 INSERM, Bat Biserte, Place de Verdun, 59045 Lille, France (e-mail: odile.viltart@univ-lille.fr).

E2

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

voluntary food restriction (6, 7). These data support more adaptations to physiological changes than a cognitive drive to reduce feeding. Moreover, adopting this kind of "self-starvation behavior" caused the mice to die rapidly (usually 5–7 days) due to important energy deficit and weight loss. This constituted another drawback of the ABA model since we expected to study the evolution of physiological parameters in the long term.

The present study aimed to circumvent these drawbacks. Because self-starvation is not necessary to study physiological consequences of activity associated with food restriction, we have changed the initial protocol by working on female mice and by limiting the amount of food distributed (50%) without time limitation. The female mice of the "activity" groups had free access to wheel running. Activity added to food restriction allowed fast and severe body weight loss associated with protocol durations as long as 8 wk. Our data show that when food restriction is associated with physical activity, it results in a better metabolic adaptation, although it accelerates weight loss in the short term compared with pair-fed mice without wheel access. Our results provide new insights regarding the potential mechanisms that lead to the physiological deregulations observed in AN patients with or without hyperactivity.

METHODS

Animals and procedures. Adult C57BL/6J female mice (7 wk old, average initial body weight 18.3 ± 0.1 g; Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed two per cage to avoid isolation stress effects until the end of the protocol. They were kept in a pathogen-free barrier facility maintained at 21.5°C with a 12:12-h dark-light cycle (lights on at 0730). During 1 wk of acclimation, mice were weighed every day to get used to handling and had free access to water and standard chow diet (4.30% fat, 22.30% protein, and 51.20% carbohydrate; Special Diet Service RM3; Dietex, Essex, UK). The mice were then divided into four groups. In the experimental group "food restriction and wheel" (group FRW), mice were placed in a cage equipped with a free running wheel (Intellibio, Seichamps, France) and submitted to a quantitative food restriction comprising 30%/day for 3 days and then 50%/day until the end of protocol. This restriction was calculated from the total food eaten in a cage full of mice fed ad libitum (group AL) the day before to have a standard quantity of food eaten per day. We also used two other control groups: a pair-fed group [group FR (food restricted)] and mice fed ad libitum but in cages equipped with a wheel (group ALW). The presence of two mice in the home cage did not permit to measure separately the quantity of food ingested by each animal. However, the use of metabolic cages (see below) where mice were studied individually has permitted us to validate the data obtained and to precisely know the food intake pattern of the four groups of mice. Body weight and food intake (distribution at 1830) were monitored daily in the short-term (15 days) and long-term (≤ 55 days) protocols (Figs. 1 and 2). Control of body weight was done to ensure that two mice in the same cage had similar feeding behavior and activity. If evident differences were noted between the two mice, the data obtained from this cage were excluded from analysis. At different times in the protocol (Fig. 1), some subgroups of mice were isolated for 2–3 days in metabolic cages (TSE Systems, Hamburg, Germany) to monitor ambulatory activity, food intake pattern, O_2 and CO_2 consumptions, and energy expenditure. The cages of FRW and ALW mice were equipped with a wheel (178 mm in diameter) to maintain their physical activity without totally modifying the paradigm. The number of mice that have been used varied between six and 24 per group, depending on the experiments and the protocols considered. The variation in the number of animals was due only to specific experiments done to obtain the metabolic data

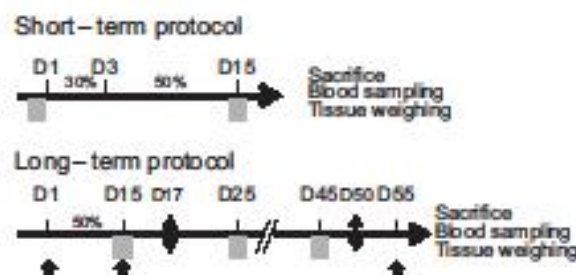


Fig. 1. Study design for the short- and long-term protocols. Arrows indicate X-ray CT scan sessions; double arrows correspond to intraperitoneal glucose tolerance test, and gray squares show the metabolic cage sessions. D, days.

or blood samplings performed at different stages of the protocols. Such manipulation might change slightly and transiently the behavior of the mice (feeding or activity). All measurements related to the metabolic behavior done in metabolic cages were made on mice that followed the previously described feeding protocol, since we wanted to evaluate the effect of this protocol on various metabolic parameters. However, the experiments related to blood samples and tissues collection were done on mice that had received the same amount of food (~ 3.5 g/cage) at the same hour the day before euthanization/samplings to maintain all mice in similar fasted conditions and minimize intragroup variations. No mice died in any protocol. Further details are given in the legends. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and approved by the Regional Ethics Committee of Nord-Pas de Calais of Lille, France (protocol no. CEEA 392012).

Activity monitoring. The daily locomotor activity of ALW and FRW mice was assessed in their home cage equipped with a wheel (diameter: 230 mm; width: 50 mm; 1 revolution = 0.72 m) and linked to a computer system that measured interval counts (10 min) per mean wheel revolution (ActiWheel Software; Intellibio, Seichamps, France). When the mice were placed individually in the metabolic cages (Fig. 1), the total ambulatory activity of all mice was evaluated with an ambulatory captor (infrared light-beam frame ActiMot2) that measured activity in three dimensions (x-, y-, and z-axes).

Reproductive functions. The estrous cycle was assessed by vaginal smears performed before food distribution and at different stages of the procedure: between day 5 before the beginning of the protocol and day 16 for the short-term protocol and between days 48 and 55 for the long-term protocol. We placed the tip of the pipette filled with saline solution (10 μ l of NaCl, 9 g/l) 5 mm into the vagina, flushed the vagina about five times, and put the final collection containing the vaginal secretion on a glass slide. We observed the cells without coloration under a light microscope (Zeiss; Leica Biosystems) with a final magnification of $\times 100$ for immediate estrous cycle stage determination (estrus, diestrus, and metestrus). Proestrous stage that corresponds to short transient stages was not determined. The day of euthanization and days 15 and 55 after estrous cycle determination, left and right ovaries were collected, and the uterus was weighed. Ovaries were then fixed in Bouin fixative and processed through graded alcohol until paraffin wax embedding. Paraffin-embedded ovaries were serially sectioned at 5- μ m thickness with a microtome Leica Reichert-Jung (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) and stained with hematoxylin-eosin. Observations and photos were made using a Leica microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a camera. The size of the ovaries was measured following two axes (width and length) with ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>) from slices containing the largest ovary section.

Body composition. Body composition was determined at different time points during the protocols (D-1/D15/D55; Fig. 1) using an "in vivo μ CT scanner for small laboratory animals" (LaTheta LCT-100; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan) to evaluate bone, lean, and fat masses. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ket-

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

E3

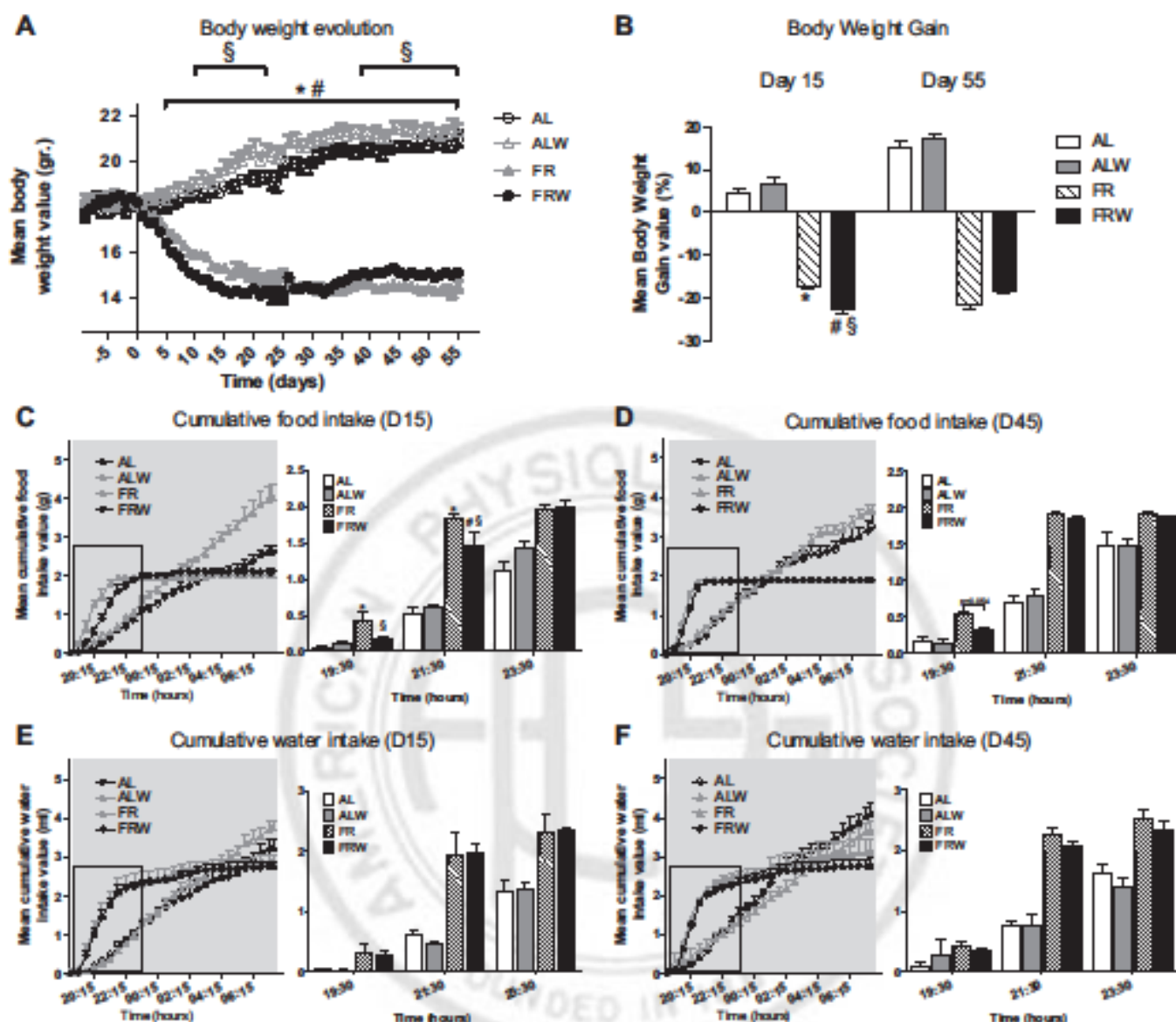


Fig. 2. Effect of food restriction associated or not with activity (wheel running). **A**: body weight evolution of the 4 groups of mice in their home cages. **B**: mean body weight gain obtained after 15 (day 15) and 55 days (day 55) of protocol. Mice were weighed every day, and body weight gain was calculated from day -1 . **C** and **D**: mean cumulative food intake pattern measured during the night period on days 15 (D15; **C**) and 55 (D55; **D**). **E** and **F**: mean cumulative water intake pattern measured during the night period on days 15 (D15; **E**) and 55 (D55; **F**). Rectangles point out values obtained during the 1st part of the night [meal distribution for food restriction (FR) and food restriction and wheel (FRW) mice]. Values are means $\pm$ SE. AL, ad libitum; ALW, ad libitum and wheel; FR, food restriction; FRW, food restriction and wheel. For **A** and **B**, AL: $n = 24$; ALW: $n = 14$; FR: $n = 22$; FRW: $n = 22$. For **C-F**, AL: $n = 7$ for the short-term and $n = 8$ for the long-term protocols; ALW: $n = 10$; FR: $n = 10$; FRW: $n = 11$ for the short-term and $n = 12$ for the long-term protocols. * $P < 0.05$, FR or ALW vs. AL; # $P < 0.05$, FRW vs. ALW; § $P < 0.05$, FR vs. FRW. Significance was set following 2-way ANOVA.

amine and xylazine mix. About 60 CT slices per mouse were made at 500- μ m intervals between shoulders and the posterior legs. Slices were analyzed by Aloka software, and mouse head and tail were excluded from analysis for bone [bone mineral content (BMC)], fat (visceral and subcutaneous), and lean mass measurements.

Metabolism and energy expenditure monitoring. The data were obtained in metabolic cages (LabMaster-Calorimetry System; TSE Systems) for a period of 3 days (Fig. 1). Food and water intake patterns were measured every minute by sensing units, and the values were added to present cumulative data. The system measured the volume of O_2 consumed and the volume of CO_2 produced over a 15-min period four times per hour. These values were averaged to determine the rate of CO_2 produced (VCO_2) and oxygen consumed

(VO_2) in milliliters/hour. We determined respiratory exchange ratio (RER), the energy expenditure (EE), and the fatty acid (FA) oxidation using different equations (8, 45, 46): $RER = VCO_2/VO_2$; EE (kcal/h) = $[(3.815 + 1.232 \times RER) \times VO_2] \times 1,000$; FA oxidation (kcal/h) = $EE \times [(1 - RER)/0.3]$. The RER is an indicator of the proportion of fat and carbohydrate oxidation under specified conditions (46) and ranges between 0.7 (complete reliance on fat oxidation) and 1.0 (complete reliance on carbohydrate oxidation).

Glycemia and intraperitoneal glucose tolerance testing. Glycemia was measured (OneTouch Vita; Lifescan, Milpitas, CA) in the morning (between 0800 and 1000) after the night-feeding period at different stages (D15 and D50). To assess glucose tolerance, we performed an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT). All mice received

E4

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

the same quantity of food the day before the experiment (at 1600) to maintain all mice in a similar satiated condition. Then, nonseparated mice were weighed and injected with a glucose solution (1.5 g/kg). Their glycemia were assayed from blood sample drops taken from the tail at 0, 5, 15, 30, 60, 90, and 120 min postinjection.

Euthanization and tissue collection. At the end of the short- and long-term protocols, mice were euthanized. All mice received the same amount of food (~3.5 g/cage) the day before euthanization to maintain all mice in similar fasted conditions and minimize intragroup assay variations. They were deeply anesthetized in the morning with an overdose of ketamine (100 mg/kg) and xylazine mix (20 mg/kg). Blood was collected through cardiac puncture with a 1-ml syringe and kept at 4°C for ~2 h in neutral tubes, except for ghrelin, which was due to the low stability of this hormone until centrifugation (8,000 rpm for 10 min, 4°C, Centrifuge 5414 R; Eppendorf, Hamburg, Germany). Plasma aliquots were then deeply frozen in liquid nitrogen and stored (-80°C) until they were assayed. Mice were then dissected to weigh liver and gastrocnemius muscle. The largest liver lobe was collected and frozen in liquid nitrogen until glycogen liver assay.

Measurement of hepatic glycogen. About 100 mg of the largest liver lobe of each mouse was thawed and homogenized in 0.03 M HCl. Then, 400 µl of 1.25 N HCl was added to 100 µl of homogenate and was mixed and heated for 1 h at ~75°C. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 30 min. Ten microliters of supernatant was mixed with 1 ml of glucose oxidase reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After 10 min of incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 200 µl of 12 N H₂SO₄. Absorbance was read at 505 nm. Glycogen type III from rabbit was used to make the standard curve (Sigma-Aldrich).

Blood assays. All the samples were analyzed in duplicate. Plasma leptin was measured using an ELISA kit (R & D Systems Quantikine Europe, Abingdon, UK). Intra- and interassay coefficients of variations were 4.4 and <4.7%, respectively. Plasma corticosterone was measured using the AssayMax Corticosterone ELISA Kit (AssaysPro, St. Charles, MO). Intra- and interassay coefficients of variations were <4.8 and <7.3%, respectively. Plasma acyl and des-acyl ghrelin concentrations were evaluated by specific EIA (SPIbio Bertin Pharma, A05118 for the acylated form and A05117 for the unacylated form). Blood samples were collected on tubes containing EDTA (1 mg/ml final) and PHMB (0.4 mM final), a serine protease inhibitor, then centrifuged (8,000 rpm for 10 min, 4°C Centrifuge 5414 R, Eppendorf, Hamburg, Germany) to sample plasma that was then acidified with HCl (0.1 N final) to preserve acylation. Plasma non-esterified fatty acids (NEFA) were measured by enzymatic Wako kit (Stanbio Laboratory, Boerne, United States) and plasma triglycerides and plasma β-hydroxybutyrate (ketone bodies) were analyzed using an enzymatic Stanbio kits (BDS International Diagnostics GmbH, Schwetzingen, Germany).

Statistical analysis. All results are expressed as means ± SE, and the statistical analysis was performed using Statistica software (StatSoft). Graphs were generated using GraphPad Prism 5.01 (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Analysis of normality and equality of variances were tested to select the adequate statistical test. Two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test or a nonparametric ANOVA followed by Tukey post hoc test was used when appropriate. A two-way ANOVA for repeated measurements was performed to analyze the time course for metabolic data and IPGTT. The areas under the curve (AUC) were calculated by the trapezoidal method. Significance was set at a $P < 0.05$, and only interaction effects are indicated in the figures.

RESULTS

Physical activity transiently increased food restriction-induced body weight loss. The first and simplest criterion to determine the effect of activity added to food restriction is the body weight gain. Here, we showed that by day 15 (D15) of

food restriction there was a significant weight loss in the FR and FRW groups compared with the AL and ALW ad libitum groups (interaction of food × activity, $F_{1-74} = 18.17$, $P < 0.001$; Fig. 2, A and B). This decrease was significantly more drastic in FRW than FR mice from D6 to D22 ($P < 0.05$). From D42 to D55, statistical analysis revealed an effect of activity ($F_{1-74} = 6.66$, $P < 0.05$) and food restriction ($F_{1-74} = 1,243.05$, $P < 0.001$) on body weight loss but no interaction between these two parameters. Surprisingly, after 35 days a slight but significant regain of body weight was observed in FRW mice ($P < 0.001$, from D43 to D55), leading to significant differences between body weight of FRW and FR groups ($P < 0.001$ at D55; Fig. 2A).

Physical activity also impacted the food intake pattern (Fig. 2, C and D). On D15, FRW mice ate their pellets more slowly than FR mice along the first 2 h after lights off (interaction of food × activity $F_{1-23} = 4.71$, $P < 0.05$). FR and FRW mice finished their meal within 3 and 4 h after food distribution, i.e., at 2130 and 2230, respectively. AL and ALW mice ate slowly but continuously until the end of the dark phase at 0730. On D55, FR and FRW adopted the same pattern of feeding (interaction of food × activity, $F_{1-22} = 4.15$, $P = 0.054$; Fig. 1), but they ate all of the food within 1.5 h only. Each group showed a constant water intake pattern throughout the protocol, with FR and FRW mice presenting faster and higher water consumption than AL and ALW mice during the first part of the night, i.e., when they were eating (Fig. 2, E and F). Thus, during the first weeks of food restriction, physical activity slowed down the food intake. Later, FR and FRW mice presented the same pattern of food intake, with a faster feeding rate than before. Surprisingly, after 35–40 days of protocol, a slight but significant increase in body weight appeared only in FRW mice (Fig. 2A). Factors potentially involved in the early and fast body weight decrease and in the late body weight increase shown in FRW mice were studied in subsequent experiments.

Decrease in physical activity appeared with body weight regain in food-restricted active mice. FRW mice presented a biphasic pattern of daily physical activity during the long-term protocol observed in both home cage (Fig. 3) and metabolic cages (Fig. 4). From D0 to D35, FRW mice displayed a wheel-running activity that was similar to that of ALW mice (Fig. 3). Then and until the end of the protocol, FRW mice showed a significant lower daily activity than ALW mice ($P < 0.05$; Figs. 3 and 4D). These results were confirmed by 24-h locomotor activity measured in metabolic cages (Fig. 4), which detailed precise information about the nightly and daily physical activity patterns in all groups. At D15, FRW mice displayed the highest activity compared with the other groups during the day (interaction of food × activity, $F_{1-36} = 13.24$, $P < 0.01$; Fig. 4, B and C), especially from 1200 to 1900 (interaction of food × activity, $F_{1-36} = 10.83$, $P < 0.01$; Fig. 4C). This phenomenon, which resonates with the increase in physical activity seen in AN before feeding time (60), is described in the literature as food anticipatory activity (FAA), which began several hours before food distribution. Such activity observed before feeding might be an association of foraging and FAA. Contrary to FRW mice, FR mice did not exhibit FAA (Fig. 4C). During the dark period, ALW mice presented a constant and higher ambulatory activity compared with AL and FRW mice (interaction of food × activity,

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

E5

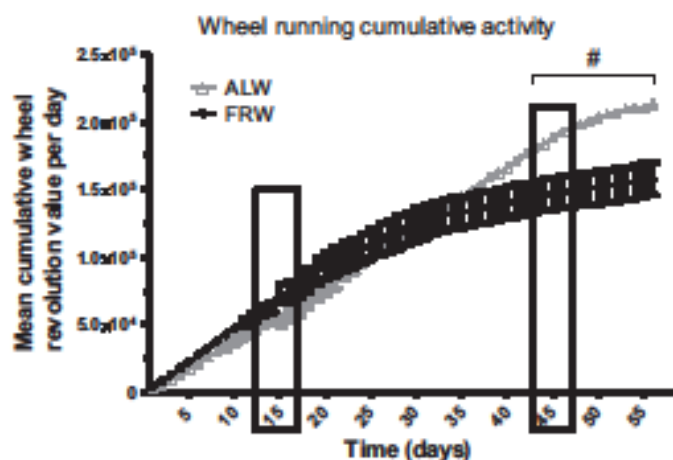


Fig. 3. Effects of food restriction on wheel running activity in the home cages for ALW and FRW groups. The mean cumulative wheel revolution was calculated for ALW and FRW groups ($n = 2/\text{cage}$) throughout the protocol. Rectangles indicate the metabolic cage sessions (see Fig. 4). To measure ambulatory activity for all groups ($n = 1/\text{cage}$). ALW, $n = 6$; FRW, $n = 14$. # $P < 0.05$, FRW vs. ALW. Significance was set following 2-way ANOVA.

$F_{1,36} = 5.17$, $P < 0.05$; Fig. 4, B and C). On D45, surprisingly, in FRW group, the FAA measured on D15 in metabolic cages disappeared ($P < 0.001$; Fig. 4, E and F). The persistent activity observed concerned more of the activity devoted to food intake as it appeared at the time the food was distributed (Fig. 4F). The disappearance of the FAA was responsible for the observed decrease in daily activity in FRW mice (Fig. 4D). FRW and ALW mice continued to exhibit the highest ambulatory activity during the dark period compared with their respective controls (interaction of food $\times$ activity, $F_{1,26} =$

5.15, $P < 0.05$; Fig. 4F). These data demonstrate that mice used to running on a wheel (ALW and FRW) are more active than mice that are not used to running (AL and FR). Moreover, FAA is shown only in FRW and not in FR mice. When the protocol is extended, the FRW mice's daily activity decreased mainly because of the disappearance of FAA. This decrease of activity that coincided with the body weight regain was observed only in FRW mice.

Food restriction induced alterations in reproductive function. Activity, when it becomes excessive, leads to loss of estrous cycle in restrictive AN patients as well as in athletes. In our study, we showed that food restriction by itself associated or not with physical activity rapidly induced a disruption of the estrous cycle (Fig. 5) associated with a closure of the vaginal opening and a decrease in uterus mass (Table 1) observed on D15 and D55. The sizes of the ovaries of both FR and FRW mice were significantly reduced compared with AL and ALW mice (Table 1). Thus, physical activity did not exacerbate the impact of reduction of feeding in the reproduction function.

Physical activity precipitated early alterations of fat mass in food-restricted mice. Besides loss of fat, AN patients also show muscular atrophy and osteopenia/osteoporosis in the long term (41), for which the impact/role of physical activity is poorly understood. To this end, in the present study, we explored fat, lean, and bone mineral mass changes. The different measurements obtained at different times of the long-term protocol (Fig. 1) with the X-ray CT scanner (Fig. 6) showed more precisely the impact of physical activity associated or not with food restriction on body composition. On D15, food restriction induced a 19% lower lean mass in FR and FRW mice compared with AL and ALW mice (food effect, $F_{1,20} = 132.02$, $P < 0.001$; Fig. 6A). The masses of liver and triceps, compo-

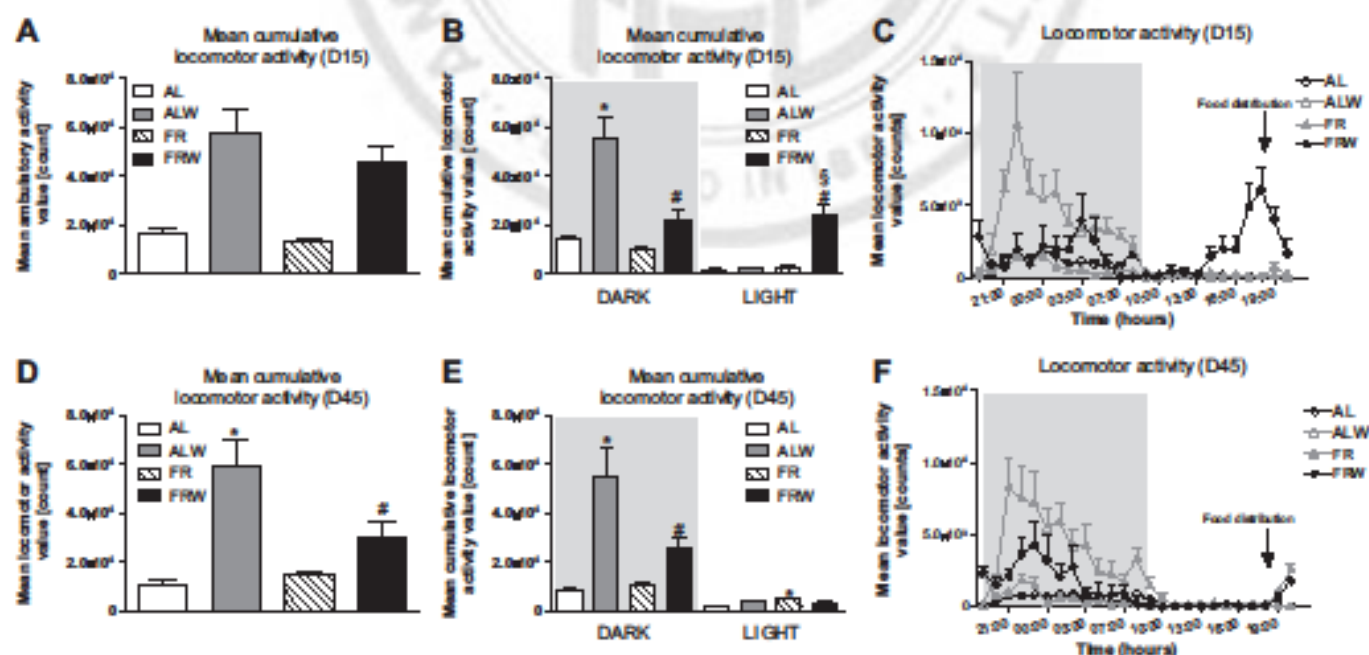
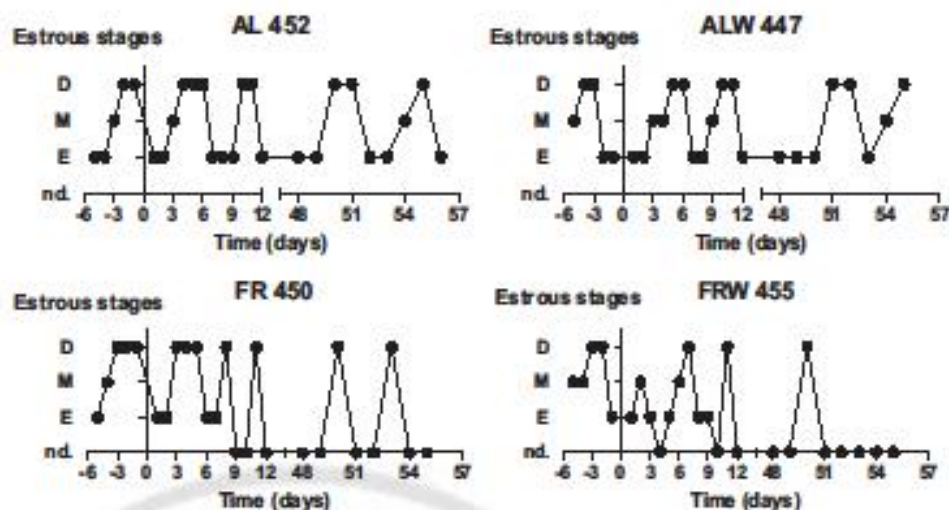


Fig. 4. Effects of food restriction on locomotor activity in the metabolic cages for the 4 groups. A and D: total activity was analyzed throughout the day on D15 (A) and D45 (D) and averaged for the dark (active phase) and light periods. B–E: measurements were taken at different periods of the protocol: short term (B and C) and long term (D and E). The locomotor activity was measured continuously and averaged every hour in C (short term) and F (long term). Values are expressed as means $\pm$ SE. AL, $n = 8$; ALW, $n = 10$; FR, $n = 10$; FRW, $n = 12$ for the short-term and $n = 10$ for the long-term protocols. * $P < 0.05$, FR or ALW vs. AL; # $P < 0.05$, FRW vs. ALW; § $P < 0.05$, FR vs. FRW. Significance was set following 2-way ANOVA.

E6

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

Fig. 5. Impact of food restriction associated or not with physical activity on estrous cycles. One example of mouse from each group was given along the protocol, representing the whole. AL, $n = 6$; ALW, $n = 6$; FR, $n = 6$; FRW, $n = 6$. D, diestrus; M, metestrus; E, estrus; nd, nondetected.



nents of the lean mass, were actually lowered in the FR and FRW groups ($P < 0.001$; Table 1). The body fat mass was strongly affected by both food restriction (food effect, $F_{1-20} = 4.86$, $P < 0.05$; Fig. 6B) and physical activity (activity effect, $F_{1-20} = 26.57$, $P < 0.001$; Fig. 5B). In particular, FRW mice exhibited a decrease of $-87.20 \pm 5.04\%$ compared with FR mice fat mass. Interestingly, FR mice did not display such a drastic decrease ($-33.90 \pm 11.43\%$) compared with the fat mass of AL mice. The visceral fat mass was affected by both food ($F_{1-20} = 7.84$, $P < 0.05$; Fig. 6C) and activity ($F_{1-20} = 17.94$, $P < 0.001$; Fig. 6C). The subcutaneous fat mass was affected only by activity ($F_{1-20} = 30.72$, $P < 0.001$; Fig. 6D).

On D55, the differences in lean mass did not change compared with D15 (food effect, $F_{1-20} = 557.48$, $P < 0.001$; Fig. 6A). The weight of the liver was affected by the restriction (food effect, $F_{1-46} = 75.12$, $P < 0.001$), whereas the weight of the triceps was conditioned by both food and physical activity (food effect, $F_{1-22} = 175.71$, $P < 0.001$; activity effect, $F_{1-22} = 6.31$, $P < 0.05$) (Table 1). For the fat mass, an interaction of food $\times$ activity was noted ($F_{1-20} = 9.76$, $P < 0.005$; Fig. 6B), with a pronounced decrease for FRW and FR mice compared with ALW and AL mice ($P < 0.005$) and ALW

to AL mice, respectively ($P < 0.005$). Similar comparisons were obtained for visceral fat mass (interaction of food $\times$ activity, $F_{1-20} = 7.91$, $P < 0.05$; Fig. 6C) and subcutaneous fat mass (interaction of food $\times$ activity, $F_{1-20} = 10.09$, $P < 0.05$; Fig. 6D). FR mice presented a higher decrease in fat tissue compared with AL mice ($-88.03 \pm 2.59\%$) than FRW mice compared with ALW and FR mice, respectively (-67.88 ± 7.76 and $+70.8 \pm 40.45\%$, $P < 0.05$). Finally, the bone mass acquisition might be stopped between D15 and D55 in FR and FRW mice. Indeed, restriction did not permit a gain of BMC (food effect, $F_{1-20} = 43.95$, $P < 0.001$; Fig. 6E) for the FRW and FR groups compared with ALW and AL groups. As expected, ALW mice exhibited a trend toward a higher BMC than AL mice. Collectively, these data suggest that physical activity accelerates the effects of food restriction on fat tissue without protecting muscle and bone mass.

Physical activity associated with food restriction induced an adaptation in energy metabolism. Long-term food restriction associated or not with physical activity has been suggested to induce changes in the energy metabolism, changes that are difficult to assess precisely in AN patients in the long term (57). Animal models are thus useful to decipher metabolic

Table 1. Alterations in metabolic and reproductive tissues

Tissue	AL	ALW	FR	FRW
Short term (D15)				
No.	$n = 6$	$n = 6$	$n = 6$	$n = 6$
Liver, mg ^a	948.03 ± 30.81	958.55 ± 19.61	807.22 ± 18.91	811.40 ± 30.02
Triceps, mg ^a	108.13 ± 1.31	117.93 ± 1.38	87.12 ± 3.19	87.38 ± 4.85
Uterus, mg ^a	100.23 ± 15.60	106.83 ± 18.15	21.18 ± 0.97	20.85 ± 1.32
Ovary length, μm^a	$1,658.92 \pm 74.18$	$1,523.80 \pm 63.99$	$1,397.23 \pm 64.83$	$1,351.23 \pm 64.83$
Ovary width, μm^a	$1,177.83 \pm 77.85$	$1,226.28 \pm 84.26$	988.69 ± 71.97	918.47 ± 62.80
Long term (D55)				
No.	$n = 14$	$n = 10$	$n = 14$	$n = 14$
Liver, mg ^a	996.80 ± 17.72	984.36 ± 29.41	799.82 ± 20.14	820.53 ± 17.52
Triceps, mg ^{a,b}	123.97 ± 4.00	135.08 ± 2.82	81.78 ± 3.18	87.68 ± 2.33
Uterus, mg ^a	71.44 ± 8.67	67.78 ± 11.74	16.05 ± 0.77	17.62 ± 0.90
Ovary length, μm^a	$1,693.29 \pm 84.13$	$1,757.97 \pm 37.18$	$1,231.11 \pm 50.57$	$1,203.81 \pm 67.08$
Ovary width, μm^a	$1,331.97 \pm 49.09$	$1,338.08 \pm 72.83$	874.55 ± 70.04	925.75 ± 79.12

Data are expressed as means $\pm$ SE; $n = 6-14$ /group. D15, day 15; D55, day 55; AL, ad libitum; ALW, ad libitum and wheel; FR, food restriction; FRW, food restriction and wheel. Impact of food restriction associated or not with physical activity on the weight of liver, triceps, and uterus and on the ovaries' size. All samplings were done in the morning (0830-1300). Significance was set following 2-way ANOVA. ^aFood effect; ^bactivity effect.

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

E7

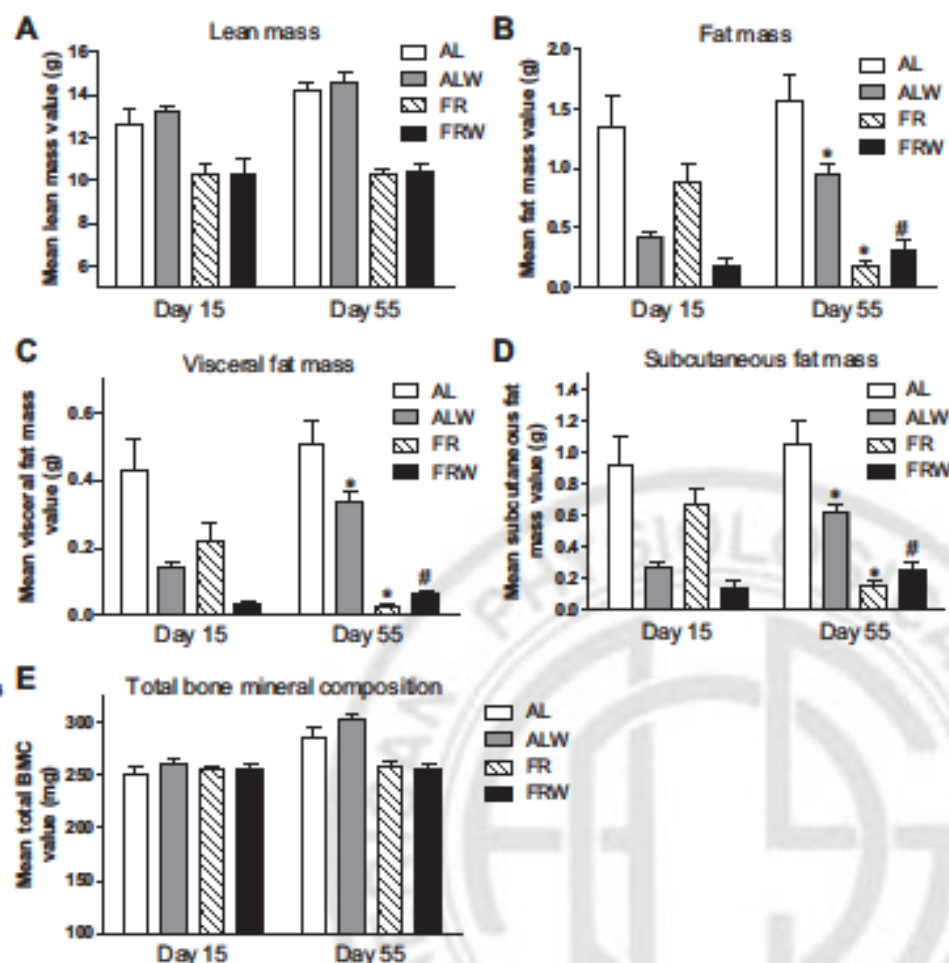


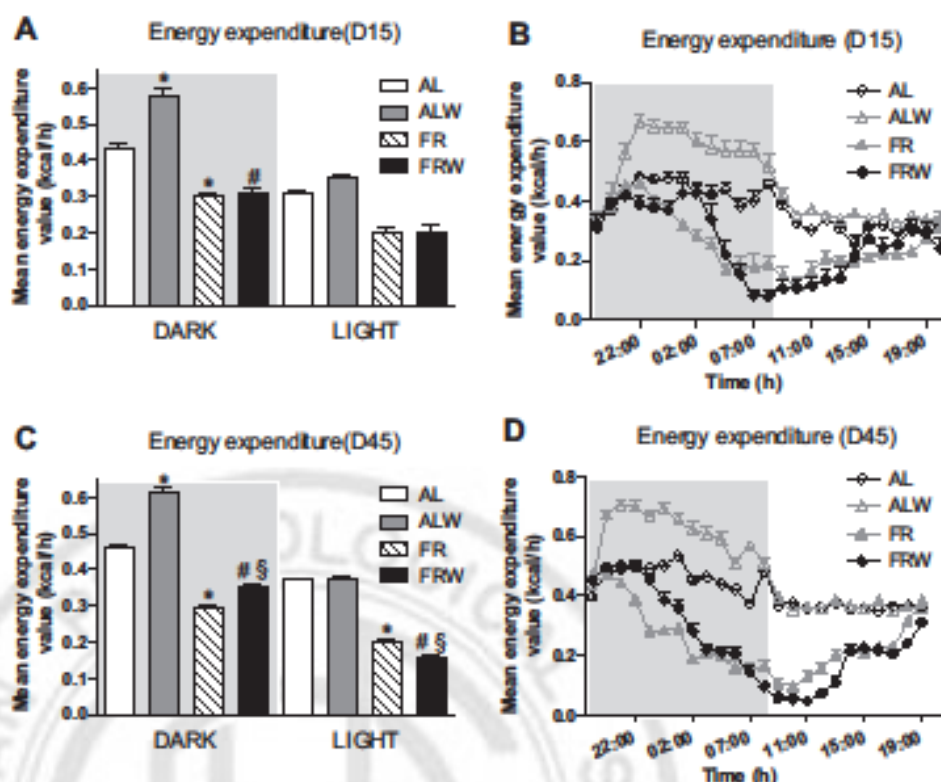
Fig. 6. Impact of food restriction associated or not with physical activity on body composition measured by X-ray CT scan on D15 and D55. A: evaluation of the total lean mass (muscles, glands, and organs). B-D: combination of physical activity with food restriction (FRW) modified more rapidly the total fat mass, including the visceral (C) and subcutaneous fat mass (D), than food restriction only (FR). E: bone mineral composition was modified only at the end of the protocol for FR and FRW mice. All measurements were taken in the morning (between 830 and 1230). Values are expressed as means $\pm$ SE. AL, $n = 6$; ALW, $n = 6$; FR, $n = 6$; FRW, $n = 6$. * $P < 0.05$, FR or ALW vs. AL; # $P < 0.05$, FRW vs. ALW. Significance was set following 2-way ANOVA.

adaptations that take place in response to long-term energy imbalance. On D15, EE was affected by both activity and food restriction during the dark period (interaction of food $\times$ activity, $F_{1,36} = 15.13$, $P < 0.001$; Fig. 7, A and B), with FR and FRW mice having a lower EE than their respective control AL and ALW mice ($P < 0.001$). During the day, similar differences were observed (food effect, $F_{1,36} = 70.23$, $P < 0.001$; Fig. 7, A and B). Over a period of 24 h, the pattern of EE for ALW followed their ambulatory activity (Fig. 3). By contrast, FRW mice presented the same EE pattern as FR mice (6.15 ± 0.25 kcal/day in FR mice vs. 6.14 ± 0.20 kcal/day in FRW mice; data not shown), even if FRW mice displayed a higher physical activity level than FR mice (Fig. 4C). On D45, regarding the daily EE, FR and FRW mice had a lower EE than the ad libitum groups (interaction of food $\times$ activity, $F_{1,26} = 18.41$, $P < 0.001$; AL: 10.14 ± 0.13 kcal/day; ALW: 11.98 ± 0.29 kcal/day; FR: 5.96 ± 0.16 kcal/day; FRW: 6.05 ± 0.15 kcal/day). During the dark period, FRW mice showed a higher EE than FR mice but a lower EE than ALW mice (interaction of food $\times$ activity, $F_{1,26} = 8.82$, $P < 0.01$; Fig. 7, C and D) that might have been paralleled with their highest physical activity (Fig. 4F). However, despite a decrease in locomotor activity during the light period between D15 and D45, FRW mice displayed the same level of EE. Thus, these data reveal an uncoupling between physical activity and global EE for FRW mice, suggesting different specific metabolic adaptations re-

lated to activity. The analysis of RER and FA oxidation was done to explore this further.

On D15, the data showed that RER was not affected by food restriction or activity in any group during the overall dark period (Fig. 8A). However, RER determined each hour showed that food delivery was followed by a significant increase in RER in FR and FRW mice between 2100 and 0100 compared with AL and ALW mice (food effect, $P < 0.05$; Fig. 8B), with values reaching 1.0, which is generally taken to represent both carbohydrate oxidation and endogenous fatty acid synthesis. Intriguingly, from 0700 to 1900, FR mice showed a progressive and significant decrease in RER values that reached ~ 0.7 , suggesting a shift to lipid oxidation compared with FRW mice ($P < 0.05$; Fig. 8B) that maintained a RER pattern similar to that of the other groups. During the day, an effect of activity was noted ($F_{1,36} = 12.99$, $P < 0.001$; Fig. 8A). Such data were corroborated by the evaluation of fat oxidation (Fig. 8, C and D). During the night, an interaction of food $\times$ activity ($F_{1,36} = 5.64$, $P < 0.05$; Fig. 8C) revealed that FRW mice had a lower fat oxidation than ALW mice ($P < 0.001$) as well as FR compared with AL mice (tendency $P = 0.07$). However, the high locomotor activity of ALW compared with AL mice during the night is associated with a similar RER, but the FA oxidation values revealed a higher consumption of both lipid and carbohydrates. FRW and FR mice exhibited the same RER as ALW and AL mice, but their low FA oxidation values

Fig. 7. Time course of effect of the short- and long-term protocols on energy expenditure. Mean energy expenditure was calculated from dark (1930 to 0730) and light (0730 to 1930) periods on D15 (A and B) and D45 (C and D). Values are expressed as means $\pm$ SE. AL, $n = 8$; ALW, $n = 10$; FR, $n = 10$; FRW, $n = 12$ for the short-term and $n = 10$ for the long-term protocols. * $P < 0.05$, FR or ALW vs. AL; # $P < 0.05$, FRW vs. ALW; § $P < 0.05$, FR vs. FRW. Significance was set following 2-way ANOVA.



suggested a lowered use of lipid and carbohydrate stores. During the light period, FR and FRW mice displayed a lower fat oxidation than their control AL and ALW mice (food effect, $F_{1-36} = 17.63$, $P < 0.001$; Fig. 8C). These data suggest that food restriction increases the total energy derived directly from FA oxidation, especially for FR mice compared with AL, ALW, and FRW mice. On D45, the main changes concerned RER values obtained during the light period, where a food effect was prominent ($F_{1-26} = 25.74$, $P < 0.001$; Fig. 8, E and F). Throughout the light phase, FRW mice exhibited the lowest fat oxidation levels compared with all other groups (tendency to interaction of food $\times$ activity, $F_{1-26} = 3.71$, $P = 0.06$; Fig. 8, G and H). In restricted mice, physical activity balanced the use of carbohydrate and lipids in the short term, whereas when the protocol was extended it did not impact significantly on lipid or carbohydrate metabolism.

To explore the mechanisms further we measured different plasma metabolites, which can reflect energy balance. Glycemia was performed in the basal condition in the morning (mice were all given the same amount of food 14 h before the measurements) or after 14 h of fasting. On D15, both FR and FRW groups displayed a decreased glycemia in basal or fasted conditions (food effect, $F_{1-67} = 73.39$, $P < 0.001$, and $F_{1-36} = 14.82$, $P < 0.001$, respectively; Table 2). On D55, food and activity affected the basal glycemia (food effect: $F_{1-43} = 45.53$, $P < 0.005$; activity effect: $F_{1-43} = 8.58$, $P < 0.001$; Table 2). Regarding the glycogen stock in liver, food restriction induced a significant decrease only on D15 (food effect, $F_{1-23} = 4.81$, $P < 0.05$; Table 2). Likewise, only at D55 were the plasma levels of ketone bodies affected by both the food restriction and activity (food effect: $F_{1-25} = 13.33$, $P < 0.001$; activity effect: $F_{1-25} = 5.63$, $P < 0.05$; Table 2). The NEFA

plasma levels were increased both in FR and FRW mice in the short term (food effect: $F_{1-23} = 8.35$, $P < 0.01$) and the long term (food effect: $F_{1-25} = 6.39$, $P < 0.05$). Finally, no significant difference was detected in the short- and long-term protocols for the plasma triglycerides (Table 2).

Overall, these results show that FR and FRW groups adopt differential energy metabolism strategies. Interestingly, in FRW mice, activity is not related to a higher EE compared with ALW. Moreover, on D15, contrary to FR mice, FRW mice exhibit a similar metabolism to AL and ALW groups during the light phase. Finally, in the long term, FRW mice displayed a similar metabolic profile (RER, FA oxidation) to that obtained in FR mice.

Physical activity and food restriction increased glucose tolerance. Similar to the other energy metabolism parameters, data on glucose tolerance in AN patients during the course of their disease are sparse (57). On D15, FR and FRW mice exhibited a lower glycemia compared with AL and ALW (at time 0, food effect: $F_{1-36} = 14.82$, $P < 0.001$; AUC, food effect: $F_{1-36} = 43.97$, $P < 0.001$). Interestingly, at time 30 min, FRW mice displayed a significantly lower glycemia after glucose injection compared with FR mice (interaction of food $\times$ activity: $F_{1-36} = 3.94$, $P < 0.05$; Fig. 9A). On D50, FR and FRW mice exhibited a lower glycemia than AL and ALW (at time 0, food effect: $F_{1-36} = 14.82$, $P = 0.08$; AUC, food effect: $F_{1-36} = 37.28$, $P < 0.001$). No difference remained between FR and FRW groups (Fig. 9B).

Here again, physical activity appears to have beneficial effects by enabling a better adaptation to food restriction with a more rapid and more efficient use of the glucose immediately available, but only in the short term.

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

E9

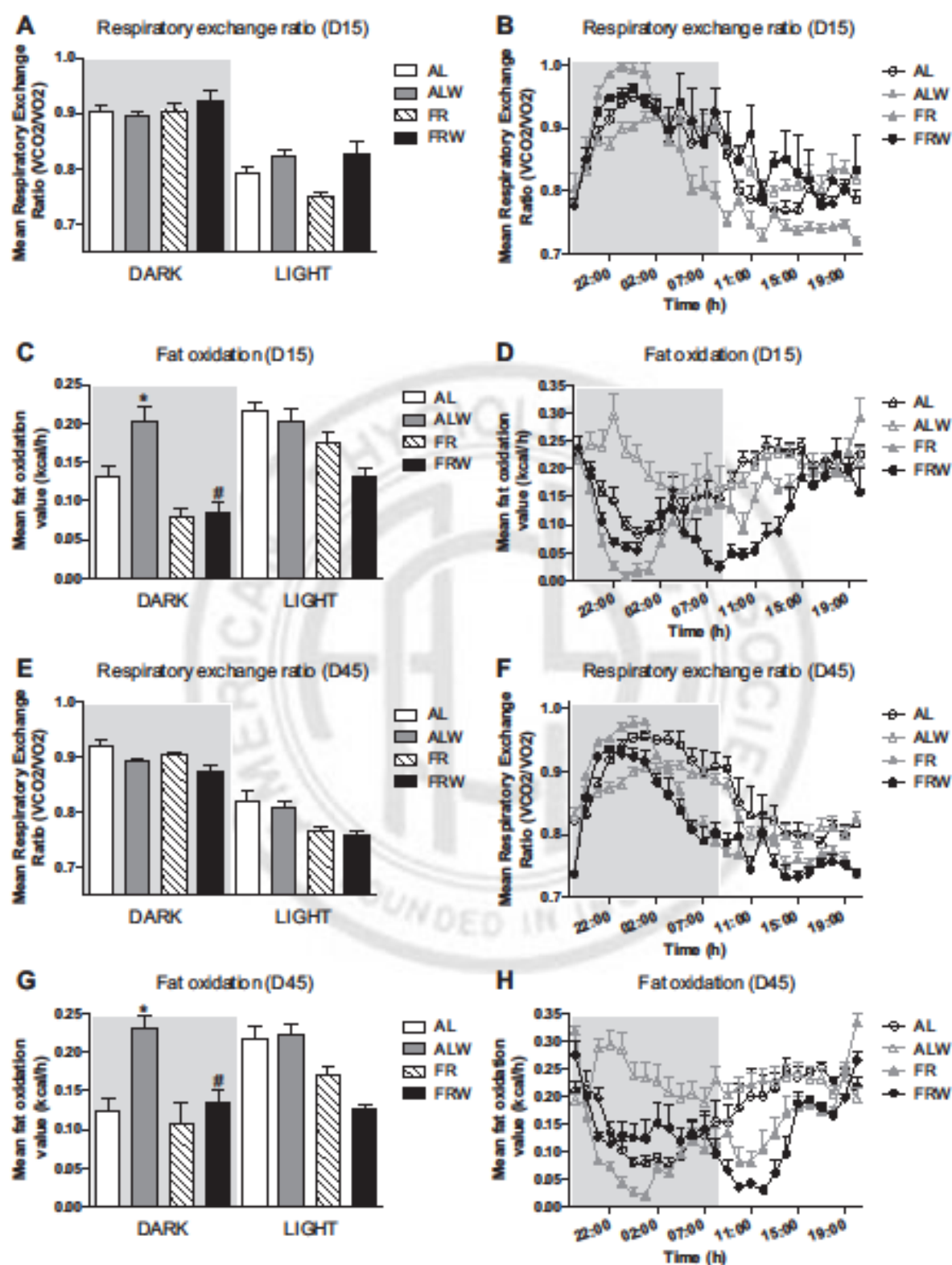


Fig. 8. Time course of effect of protocol on respiratory exchange ratio and fat oxidation measured in metabolic cages ($n = 1/\text{cage}$) at different times of the experiment (D15 and D45). Respiratory exchange ratio at short term (A and B) and long term (E and F) was calculated from 4 measurements/h and averaged from CO_2 and O_2 ratio. Fat oxidation in the short term (C and D) and long term (G and H) was calculated as indicated in *methods*. Mean dark and light RER and fat oxidation were calculated from values obtained between 1930 and 0730 and 0730 and 1930, respectively. Values are expressed as means $\pm$ SE. AL, $n = 8$; ALW, $n = 10$; FR, $n = 10$; FRW, $n = 12$ for the short-term and $n = 10$ for the long-term protocols. * $P < 0.05$, FR or ALW vs. AL; # $P < 0.05$, FRW vs. ALW. Significance was set following 2-way ANOVA.

E10

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

Table 2. Impact of food restriction associated or not with physical activity on plasma metabolites and hepatic glycogen

Metabolites	AL (n = 8)	ALW (n = 6)	FR (n = 8)	FRW (n = 8)
Short term (D15)				
Basal glycemia, mg/dl ^a	137.59 ± 7.83	129.39 ± 5.52	86.67 ± 3.63	84.61 ± 4.79
Fasted glycemia, mg/dl ^a	130.63 ± 8.11	120.80 ± 6.84	107.85 ± 3.60	99.92 ± 4.16
Triglycerides, mg/dl	33.75 ± 2.85	24.78 ± 2.49	31.5 ± 3.71	28.40 ± 4.00
NEFA, mg/dl ^a	8.98 ± 0.71	11.46 ± 1.63	14.49 ± 1.52	13.69 ± 1.37
Ketone bodies, mg/dl	4.01 ± 0.69	5.14 ± 0.84	3.18 ± 0.57	4.04 ± 0.56
Liver glycogen, mg/mg tissue ^a	9.14 ± 0.86	9.33 ± 0.95	7.37 ± 0.47	7.56 ± 0.74
Long term (D55)				
Basal glycaemia, mg/dl ^{a,b}	119.93 ± 5.15	131.17 ± 5.70	82.85 ± 4.08	100.86 ± 3.86
Fasted glycaemia, mg/dl	119.56 ± 7.73	105.80 ± 4.96	99.15 ± 6.28	106.88 ± 3.00
Triglycerides, mg/dl	33.03 ± 2.52	26.40 ± 1.98	26.02 ± 2.53	27.86 ± 3.28
NEFA, mg/dl ^a	12.94 ± 1.40	17.34 ± 0.98	21.20 ± 2.58	18.85 ± 2.16
Ketone bodies, mg/dl ^{a,b}	4.11 ± 0.33	5.53 ± 0.72	3.00 ± 0.25	3.58 ± 0.36
Liver glycogen, mg/mg tissue	10.24 ± 1.56	8.91 ± 0.96	10.18 ± 0.52	10.82 ± 0.59

Data are expressed as means ± SE; n = 6–8/group. NEFA, nonesterified (or free) fatty acids. All samplings were done in the morning (830–1100). Significance was set following 2-way ANOVA. ^aFood effect; ^bactivity effect.

Physical activity and food restriction modified energy metabolism hormone levels. In AN, patients also display numerous endocrine alterations that can contribute directly or indirectly to maintain and exacerbate the disease (24, 66). Data related to the understanding of how hormones might contribute to the worsening of the patients are currently lacking. On D15 and D55, the plasma levels of leptin were impacted by both activity and food (interaction of food × activity, $F_{1,18} = 4.46$, $P < 0.05$, and interaction of food × activity, $F_{1,31} = 12.92$, $P < 0.001$, respectively; Table 3), with significant differences noted between AL and ALW mice ($P < 0.05$) and AL compared with FR mice ($P < 0.05$). The plasma levels of corticosterone were increased in FR and FRW mice compared with their respective controls on D15 (food effect, $F_{1,28} = 16.15$, $P < 0.001$; Table 3). On D55, FR mice exhibited the higher corticosteronemia compared with AL and FRW mice (interaction of food × activity, $F_{1,20} = 11.06$, $P < 0.01$; Table 3). Plasma levels of ghrelin, the only known circulating hormone that increases food intake, were increased in the FR and FRW groups compared with AL and ALW mice on D15 (food effect, $F_{1,26} = 37.72$, $P < 0.001$; Table 3) and on D55 (food effect, $F_{1,23} = 4.76$, $P < 0.05$; Table 3). More precisely, on D15, the acylghrelin form was influenced by the food restriction and activity (food effect, $F_{1,26} = 21.48$, $P < 0.001$; activity effect, $F_{1,26} = 6.24$, $P < 0.05$), whereas desacyl-ghrelin concentrations were increased in FR and FRW mice compared with AL and ALW mice (food effect, $F_{1,26} = 36.81$, $P < 0.001$; Table 3). Thus, the acylghrelin/des-acylghrelin ratio reflected more an impact of activity (activity effect, $F_{1,26} = 10.42$, $P < 0.01$; Table 3) than of the food restriction. On D55, acyl- and des-acylghrelin plasma levels were influenced by activity (activity effect, $F_{1,23} = 8.01$, $P < 0.01$) and food, (food effect, $F_{1,23} = 8.32$, $P < 0.01$; Table 3), respectively, with a higher acylghrelin/des-acylghrelin ratio in ALW and FRW mice (food effect, $F_{1,23} = 5.45$, $P < 0.05$; activity effect, $F_{1,23} = 14.61$, $P < 0.001$; Table 3).

Therefore, our data underscore an impact of physical activity on the ghrelin system. The food restriction led to endocrine changes that could explain the differential adaptations described previously in FR and FRW mice compared with the ad libitum groups.

DISCUSSION

This study was undertaken to obtain, in a mouse model, data contributing to determine whether the physical activity often described in restrictive AN patients might have beneficial or deleterious effects on bodily functions in the long term. For this purpose, we describe for the first time the physiological consequences of the combination of long-term food restriction with voluntary physical activity in female mice. The main finding is that physical activity induced differential metabolic and endocrine adaptations in chronic food-restricted animals.

Considering the different known animal models related to food restriction and activity and their limitations, we modified the initial ABA model to study lasting alterations. We chose to reduce the quantity of food from 30% for the first days to 50% until the end of the protocol, as normal mice are usually 30% overfed, taking into account their physiological needs (4).

We showed rapid body weight stabilization in the 30% restricted and active mice. Following this 30% restriction, the higher diet restriction combined with physical activity induced a more drastic and a more rapid body weight loss in the short term (up to D15). Then, FRW mice showed 2 wk of stabilized body weight around 20% under their initial body weight. This decrease matched that described previously in long-term 50% FR mice (27). After these 2 wk of stabilization, a slight body weight gain was observed (from D32 to D35 and D40). Then, body weight remained unchanged until the end of the protocol (D55). The body composition revealed that fat mass was strikingly decreased in FRW mice, whereas FR and FRW mice showed a moderate reduction in the lean mass and completely stopped bone mass acquisition.

To search for the causes of this pattern of body weight changes observed only in FRW mice, we studied the physical activity of mice throughout the protocol. First, FRW mice showed a daily activity equivalent to that of ALW mice, suggesting that our model did not induce a hyperactive behavior but rather a moderate activity. Second, the period of slight body weight gain in FRW mice took place when physical activity became lower compared with the beginning of the protocol. This could be related to the weight increase. Further analysis of activity patterns revealed that before their activity became lower, FRW mice were active during both the night

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

E11

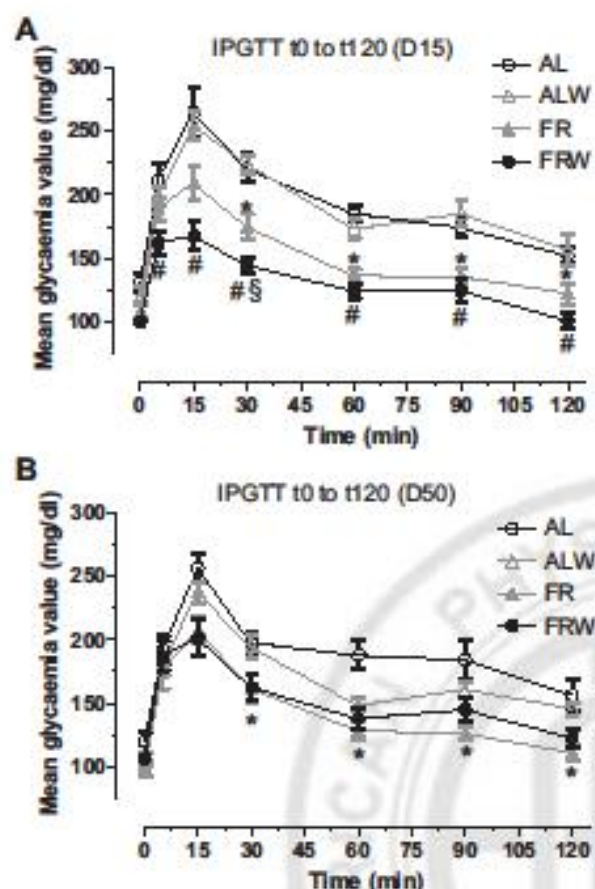


Fig. 9. Impact of food restriction associated or not with physical activity on intraperitoneal glucose tolerance. Blood glucose variations were measured following 1.5 g/kg bolus glucose injection in the short term (A) and long term (B) after 12–14 h of fasting, at time (0, 15, 30, 60, 90, and 120 min). Values are expressed as means $\pm$ SE. AL, $n = 8$; ALW, $n = 10$; FR, $n = 10$; FRW, $n = 10$. * $P < 0.05$, FR or ALW vs. AL; # $P < 0.05$, FRW vs. ALW; § $P < 0.05$, FR vs. FRW. Significance was set following 2-way ANOVA. IPGTT, intraperitoneal glucose tolerance test.

and the day throughout the protocol, whereas activity in all other groups was restricted to the dark period. FRW mice developed a light period activity close to the feeding time. This activity, usually called FAA, was also described in the ABA

paradigm (23, 48, 49, 68). The FAA is usually described 2–3 h before food distribution. In our model, FRW mice began to be active around 6 h before food on D15. Such behavior might reflect an association between foraging and FAA. We hypothesized that the peak of activity observed 2–3 h before feeding might really correspond to FAA, whereas the previous activity might be related to foraging. Tentatively, we suggest that wheel running impacts on the development of FAA by increasing addictive behavior to exercise (37). Indeed, FAA is driven by the dopaminergic motivation/reward system (31, 67). Alterations of the reward system are increasingly suspected to play a role in keeping AN patients in a vicious circle of food restriction associated usually with activity (5, 60). Finally, until the end of the protocol, FRW mice maintained a moderate activity, even if a strong decrease that resulted in a reduction in their global daily activity was observed for the FAA.

The relation between leptin and physical activity has been well investigated, especially in the ABA protocol (25, 33, 51). In fasted mice, increases in ambulatory and running wheel activity have been shown to be inhibited by chronic subcutaneous leptin treatment (51). In the ABA protocol, subcutaneous or intracerebroventricular leptin delivery leads to a decrease in running wheel activity (25, 33). In our study, on D15 as well as on D55, FRW, ALW, and FR mice had a similar low plasma leptin levels compared with AL mice, reflecting their fat mass reduction, especially the visceral fat pads. In accordance with the known effect of leptin on activity, the slight increase in plasma leptin levels described in FRW mice between D15 and D55 might be a contributing factor to the disappearance of the FAA at D55. Of note is that AN patients also exhibit lower plasma levels of leptin in association with their fat mass reduction (50). Our data reinforce the importance of studies exploring the impact of food restriction in association with activity in chronic long-term protocols.

Ghrelin is another hormone involved in FAA behavior (68). As for AN restrictive-type patients (29, 30), on D15 the two groups of food-restricted mice displayed an increase in plasma acyl and des-acylghrelin levels. The ratio acyl/des-acylghrelin contributes to a better idea of the potential ghrelin activity because of the controversial functions of these two forms that have been discussed (13). In our study, on D15, ALW and FRW mice displayed a higher acyl/des-acylghrelin ratio compared with AL and FR mice, suggesting that active ghrelin

Table 3. Impact of food restriction associated or not with physical activity on plasma hormones

Hormones	AL ($n = 6-8$)	ALW ($n = 6-8$)	FR ($n = 6-8$)	FRW ($n = 6-8$)
Short term (D15)				
Leptin, ng/ml	5.72 $\pm$ 0.87	3.09 $\pm$ 0.21*	3.55 $\pm$ 0.25*	3.08 $\pm$ 0.20
Corticosterone, ng/ml	147.1 $\pm$ 20.10	196.4 $\pm$ 24.45	271.9 $\pm$ 42.59	276.4 $\pm$ 43.01
Ghrelin total, pg/ml ^a	907.34 $\pm$ 111.75	969.4 $\pm$ 96.24	2,158.2 $\pm$ 177.54	2,721.3 $\pm$ 396.71
Acylghrelin, pg/ml ^{a,b}	228.70 $\pm$ 35.38	357.09 $\pm$ 60.68	575.60 $\pm$ 63.66	958.21 $\pm$ 165.69
Des-acylghrelin, pg/ml ^a	678.64 $\pm$ 79.80	612.34 $\pm$ 72.49	1,582.56 $\pm$ 177.54	1,763.14 $\pm$ 252.69
Ghrelin ratio (AG/DAG) ^{a,b}	0.34 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.09	0.39 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.06
Long term (D55)				
Leptin, ng/ml	4.67 $\pm$ 0.42	3.17 $\pm$ 0.15*	3.37 $\pm$ 0.16*	3.52 $\pm$ 0.09
Corticosterone, ng/ml	100.8 $\pm$ 11.60	120.5 $\pm$ 10.19	240.8 $\pm$ 21.16*	178.0 $\pm$ 12.76§
Ghrelin total, pg/ml ^a	1,238.6 $\pm$ 151.1	1,458.1 $\pm$ 177.8	1,605.9 $\pm$ 112.5	1,774.4 $\pm$ 165.6
Acylghrelin, pg/ml ^a	145.48 $\pm$ 42.12	277.44 $\pm$ 44.02	147.21 $\pm$ 20.26	240.34 $\pm$ 41.46
Des-acylghrelin, pg/ml ^a	1,093.12 $\pm$ 114.96	1,180.63 $\pm$ 135.48	1,458.69 $\pm$ 108.39	1,534.10 $\pm$ 132.16
Ghrelin Ratio (AG/DAG) ^{a,b}	0.12 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02

Data are expressed as means $\pm$ SE; $n = 6-8$ /group. AG, acylghrelin; DAG, des-acylghrelin. All samplings were done in the morning (830–1100). * $P < 0.05$, FR or ALW vs. AL; § $P < 0.05$, FR vs. FRW. Significance was set following 2-way ANOVA. ^aFood effect; ^bactivity effect.

E12

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

levels might impact upon physical activity or vice versa (48). In the long term, this ratio in FRW mice decreased and became similar to that of FR and AL mice. This decrease was associated with lowered FAA in FRW mice. Interestingly, in the ABA protocol, the stimulatory action of acyl-ghrelin exerted on FAA is abolished by chronic intracerebroventricular growth hormone secretagogue receptor type 1a antagonist treatment (68).

AQ: 11

Finally, corticosterone plasma levels are increased in AN patients (29). Besides its known role in the regulation of stress response, corticosterone was demonstrated to contribute to the development of FAA in rodents submitted to the ABA protocol (22). In the short-term protocol, FRW and FR exhibited increases in plasma levels of corticosterone. However, in the long-term protocol, FR mice displayed higher levels than AL and FRW mice. Such changes might explain the slight activity observed just around the food distribution for FR mice and again might be one possible explanation for the disappearance of FAA in FRW mice. Once again, such differences between the two restricted groups might explain the differential pattern of activity. Thus, the data we have obtained gave us two main novel findings. 1) FRW mice showed a unique pattern of leptin, ghrelin ratio, and corticosterone that is involved in the regulation of physical activity but also in the regulation of energy metabolism; and 2) voluntary and moderate physical activity at the beginning of a protocol of food restriction might be beneficial in the long term since it is associated with a normalization of metabolic hormone levels that may favor a better adaptation to these drastic conditions. These data led us to study the changes that could occur in energy metabolism.

The low energy expenditure observed in FR and FRW mice on *D15* and *D45* might be associated with low plasma leptin concentrations but also with the food restriction since ALW mice, which also showed low levels of leptin, exhibited high EE during the night. Accordingly, the reduction of lean mass observed in FR and FRW mice might be a strategy to spare energy used by the organism in such drastic conditions to avoid a too dramatic hypothermia (62). It might be associated with the persistent high corticosterone levels, which are known to simulate conversion of protein to glucose and increase nitrogen catabolism in muscle. It can also be hypothesized that fat pad decreases might impact EE through the decrease of plasma leptin levels. Indeed, leptin treatment in fasted male mice increased total EE (51). The impact of ghrelin on EE was not clear since intracerebroventricular or intraperitoneal injection of ghrelin decreased EE (3), whereas intraperitoneal treatment with proghrelin increased EE (74). Such data point out the controversial dual effect of acylghrelin and des-acylghrelin on food intake and EE. Here, our data did not permit us to decipher the real impact of ghrelin on EE. Finally, the low EE described in both FR and FRW mice, especially during the light period when only FRW showed FAA, led us to conclude that EE not only was related to exercise but reflected an adaptive way to save energy to maintain physiological functions. The impact of food restriction on energy metabolism confirmed data obtained with 30% of food restriction (8). However, the strategy used by FR and FRW mice were different. In fact, in the short term, FRW mice adopted different fuel utilization from FR during the light period. FR mice displayed a metabolism that was oriented to FA oxidation,

which was not the case for FRW mice despite the food restriction and the FAA.

These metabolic data suggest that, in the short term, FRW mice did not adapt properly to their metabolism, with a higher carbohydrate metabolism and a lower fat oxidation during the light period than FR mice. Such a profile was supported by the results obtained in the glucose tolerance test; FRW mice displayed a faster glucose clearance particularly just after glucose injection. This improved glucose capture could explain why FRW mice have a higher RER than FR during the day on *D15*. When the protocol was extended, FRW mice adopted a similar metabolic profile to FR mice. Thus, physical activity may delay the metabolic adaptations to food restriction even if the other parameters (such as liver weight, hepatic glycogen, basal and fasted glycemia, NEFA, leptin, corticosterone, and ghrelin) evolved in a similar way in FR and FRW in the short term. In the long term, FRW mice appeared to be more adapted to these drastic conditions compared with FR mice. Besides the increased body weight, FRW mice had lower corticosterone and acylghrelin levels compared with *D15*, whereas they remained constant in the FR group. Because of their role in the regulation of energy metabolism, glycemia, and food intake, further studies are needed to explore the precise role of these two key hormones in the adaption process of FRW mice. To our knowledge, very few studies have focused on metabolite concentrations related to energy metabolism in AN (9, 10, 55, 72), likely reflecting the discrepant data obtained and the procedures used to measure these metabolites (times of the day, before or after a meal, fasted conditions, etc.), rendering the data difficult to interpret. This underscores the necessity to study the evolution of these parameters in relevant animal models.

It is known that physical activity is generally associated with fuel mobilization, reflected by increases in glycemia and plasma NEFA, as well as feeding that participated in an overload of blood nutrients (59). We showed here that running wheel activity modified the pattern of ingestion of food in FRW mice in shifting the meal initiation. FRW mice ate the delivered food more slowly than FR mice. One explanation, suggested by Woods (71), considered eating to be a homeostatic stressful event, because the digested nutrients that reached the blood during and after a meal markedly disrupt energy homeostasis. Thus, the combination of both events, activity and feeding, could generate a stressful energy event especially in the short term, where FRW mice delayed their time to eat. Thus, the shift in meal initiation observed here might explain the "voluntary food restriction" observed in the ABA protocol (38). In fact, no study has measured the meal initiation in the ABA model, in which food is available for only 2 h. Taken together with our data, we hypothesize that the voluntary food restriction described in the ABA model might be due to the physical activity maintained by the mice that could modify the beginning of feeding. Another critical factor in the ABA model is the dehydration. In contrast to what was observed in the ABA protocol, in which the consumption of water could play a role in the reduction of food intake (6), we did not observe any modification in the water intake pattern. Thus, here physical activity influenced the meal initiation without affecting the water consumption. It can be hypothesized that the moderate and not the high level of activity described in our model is responsible for this observation.

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

E13

Food restriction is also known to disturb reproduction function both in humans and rodents. As demonstrated by Dos Santos et al. (21), female rats submitted to treadmill exercise and a 50% food restriction led to interruption of estrous cyclicity, as we observed in our study where the physical activity was voluntary (21). In AN patients, even if amenorrhea was not considered as a criterion in the DSM-V anymore, disruption of cycles is currently observed in restrictive AN patients (24, 42). Disruption of the estrous cycle as well as reduction of the size of ovaries was observed here in FR and FRW mice along all the protocols. Physical activity alone did not promote such alteration. The combination of energy deficit and activity seems necessary to induce these modifications. These alterations might also be adaptive to avoid the development of offspring in a deleterious nutritional environment. The endocrine changes observed in our study might contribute to the development of this phenotype. Leptin was largely described to play an essential role in reproduction since *db/db* mice, which are deleted for leptin gene receptor, and *ob/ob* mice, which are deleted for leptin gene, are infertile (6, 18). Moreover, upregulation of ghrelin induced a decrease in LH surge (26, 53), even if the mechanisms involved are yet unknown. Chronic exposition to corticosterone inhibited LH secretion and estrous cycle and ovulation in female rodents (9, 10). Thus, both FR and FRW mice displayed high plasma corticosterone and ghrelin levels as well as a strong fall in the leptin concentrations. Therefore, the various endocrine alterations observed in our study are likely to alert hypothalamic brain structures involved in reproductive function and energy metabolism of the energy imbalance to preserve sufficient energy to adapt the body both at short- and long-term protocols. Finally, the body weight gain observed in FRW mice after 30 days of protocol did not induce a recovery of the estrous cycle. Indeed, it remained absent until the end of the long-term protocol.

Finally, another major alteration of AN is a decrease in BMC leading to osteopenia and osteoporosis in 38–50% of cases, which is associated with the high risk of fracture in patients (41–43). Alterations in BMC were described in rats and mice aged 3–14 wk and subjected to protocols where food restriction varied from 30 to 40% for 3–10 wk (19, 32, 54, 63). In FR and FRW mice, bone mass acquisition was stopped similarly after D15, whereas it was increased for AL and ALW mice. Thus, in FRW mice, physical activity that is usually described to stimulate bone formation did not prevent the termination of bone mass acquisition induced by food restriction. Similar data were also described in female mice subjected to a protocol of chronic stress associated with caloric restriction, the “separation based-anorexia” model (73). This confirmed the absence of the protective effect of activity on BMC in AN.

In conclusion, here we have characterized a new rodent model of chronic restriction associated with voluntary physical activity that mimics, at least in part, the physiological alternations that occur in AN. This model was used to determine whether physical activity has a beneficial or detrimental role in this disease in the long term. Our data lead us to suggest a dual effect of exercise. Moderate voluntary exercise accelerates body weight loss (particularly affecting the fat mass), leading to noticeable endocrine alterations, which could impact food anticipatory activity, effects also observed in AN patients. It

did not permit a proper metabolic adaption in the short term with a metabolism similar to that of ad libitum groups. However, a delayed food intake initiation due to physical activity limited a rapid food intake pattern, which was observed only in FR mice. This behavior resembles the binge eating behavior observed in some AN patients, which causes abdominal discomfort and possibly also lower nutriment adsorption. In this case, physical activity might have a beneficial effect. In the long term, we suggest that moderate exercise may have positive effects on energy metabolism regulation. Finally, the evolution of hormone levels noted in both the short term and long term reflected an effect of both activity and food restriction on adaptation to these drastic conditions of negative energy balance, with a potential positive effect in the long term. However, activity did not contribute to prevent lean and bone mass loss induced by food restriction. It remains to be determined whether these specific physiological adaptations in our AN model (metabolic, endocrine) that are related to moderate activity could lead to a better or poorer recovery.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the excellent technical assistance provided by the histological service of the Lille CHRU. Many thanks go to animal facility staff Delphine Taillieu, Mélanie Besegher, Ludovic Mercier and Romain Dehaynin (animal facility, IFR 114) and Flore Miellot (animal facility, PMOI EA 4490) for their help and technical assistance. We are very grateful to Suzanne L. Dickson for scientific counsel and for help with the language and spelling in this paper.

GRANTS

This work was supported by grants from the Nord-Pas de Calais Région “ARCIR-GIRAM.” M. Méquignon was supported by a doctoral fellowship from the University of Lille 2.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors. AQ: 12

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.M., E.C., S.Z., A.S., P.Z., C.C., and O.V. performed experiments; M.M., E.C., V.T., C.C., and O.V. analyzed data; M.M., V.T., B.C., S.L., C.C., and O.V. interpreted results of experiments; M.M., C.C., and O.V. prepared figures; M.M., C.C., and O.V. drafted manuscript; M.M., E.C., S.Z., A.S., P.Z., V.T., B.C., S.L., V.P., C.C., and O.V. edited and revised manuscript; M.M., E.C., S.Z., A.S., P.Z., V.T., B.C., S.L., V.P., C.C., and O.V. approved final version of manuscript; C.C. and O.V. conception and design of research.

REFERENCES

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.
2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, DSM-5*. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
3. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiyu M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120: 337–345, 2001.
4. Austad SN. Does caloric restriction in the laboratory simply prevent overfeeding and return house mice to their natural level of food intake? *Sci Aging Knowledge Environ*: pe3, 2001.
5. Avena NM, Bocarsly ME. Dysregulation of brain reward systems in eating disorders: neurochemical information from animal models of binge eating, bulimia nervosa, and anorexia nervosa. *Neuropharmacology* 63: 87–96, 2012.
6. Bellefontaine N, Chachlaki K, Parkash J, Vanacker C, Colledge W, d'Anglemont de Tassigny X, Garthwaite J, Bouret SG, Prevot V.

- Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J Clin Invest* 124: 2550–2559, 2014.
7. Bookes RA, Juraskova I. The role of drinking in the suppression of food intake by recent activity. *Behav Neurosci* 115: 718–730, 2001.
 8. Bookes RA. Self-starvation in the rat: running versus eating. *Span J Psychol* 10: 251–257, 2007.
 9. Brann DW, Mahesh VB. Role of corticosteroids in female reproduction. *FASEB J* 5: 2691–2698, 1991.
 10. Breen KM, Thackray VG, Hsu T, Mak-McCully RA, Coss D, Mellon PL. Stress levels of glucocorticoids inhibit LH β -subunit gene expression in gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 26: 1716–1731, 2012.
 11. Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E108–E116, 2010.
 12. Casper RC, Pandey G, Jaspan JB, Rubenstein AH. Eating attitudes and glucose tolerance in anorexia nervosa patients at 8-year followup compared to control subjects. *Psychiatry Res* 25: 283–299, 1988.
 13. Casper RC. Carbohydrate metabolism and its regulatory hormones in anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 62: 85–96, 1996.
 14. Dalle Grave R, Calugi S, Marchesini G. Compulsive exercise to control shape or weight in eating disorders: prevalence, associated features, and treatment outcome. *Compr Psychiatry* 49: 346–352, 2008.
 15. Davis C. Eating disorders and hyperactivity: a psychobiological perspective. *Can J Psychiatry* 42: 168–175, 1997.
 16. de Moura LP, Sponton AC, de Araújo MB, Dalia RA, Pauli JR, Rostom de Mello MA. Moderate physical activity from childhood contributes to metabolic health and reduces hepatic fat accumulation in adult rats. *Lipids Health Dis* 12: 29, 2013.
 17. Delhanty PJ, Neggers SJ, van der Lely AJ. Should we consider des-acyl ghrelin as a separate hormone and if so, what does it do? *Front Horm Res* 42: 163–174, 2014.
 18. de Luca C, Kowalski TJ, Zhang Y, Elmquist JK, Lee C, Kilmann MW, Ludwig T, Liu SM, Chua SC Jr. Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEP-R transgenes. *J Clin Invest* 115: 3484–3493, 2005.
 19. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, Baron R, Rosen CJ, Bouxsein ML. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res* 25: 2078–2088, 2010.
 20. DiFiori JP, Benjamin HJ, Brenner JS, Gregory A, Jayanthi N, Landry GL, Luke A. Overuse injuries and burnout in youth sports: a position statement from the American Medical Society for Sports Medicine. *Br J Sports Med* 48: 287–288, 2014.
 21. Dos Santos ZA, Da Silva RJ, Bacuran RF, Tirapegui J, Ribeiro SM. Effect of food restriction and intense physical training on estrous cyclicity and plasma leptin concentrations in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 57: 1–8, 2011.
 22. Duclos M, Gatti C, Bessière B, Mormède P. Tonic and phasic effects of corticosterone on food restriction-induced hyperactivity in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34: 436–445, 2009.
 23. Duclos M, Ouerdani A, Mormède P, Keesman JP. Food restriction-induced hyperactivity: addition or adaptation to famine? *Psychoneuroendocrinology* 38: 884–897, 2013.
 24. Estour B, Germain N, Diconne E, Frère D, Cottet-Emard JM, Carrot G, Lang F, Galusca B. Hormonal profile heterogeneity and short-term physical risk in restrictive anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 2203–2210, 2010.
 25. Exner C, Hebebrand J, Remschmidt H, Wewetzer C, Ziegler A, Herpertz S, Schweiger U, Blum WF, Preibisch G, Heldmaier G, Klingenspor M. Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 5: 476–481, 2000.
 26. Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Aguilar E, Pinilla L. Direct stimulatory effect of ghrelin on pituitary release of LH through a nitric oxide-dependent mechanism that is modulated by estrogen. *Reproduction* 133: 1223–1232, 2007.
 27. Gairdner SE, Amara CE. Serum leptin is not correlated with body fat in severe food restriction. *Appl Physiol Nutr Metab* 37: 1063–1071, 2012.
 28. Gelezen C, Collier DA, Campbell IC, Oppelaar H, van den Heuvel J, Adan RA, Kas MJ. Difference in susceptibility to activity-based anorexia in two inbred strains of mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 17: 199–205, 2007.
 29. Germain N, Galusca B, Grouselle D, Frère D, Billard S, Epelbaum J, Estour B. Ghrelin and obestatin circadian levels differentiate bingeing-purging from restrictive anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3057–3062, 2010.
 30. Germain N, Galusca B, Le Roux CW, Bossu C, Ghatei MA, Lang F, Bloom SR, Estour B. Constitutional thinness and lean anorexia nervosa display opposite concentrations of peptide YY, glucagon-like peptide 1, ghrelin, and leptin. *Am J Clin Nutr* 85: 967–971, 2007.
 31. Greenwood BN, Foley TE, Le TV, Strong PV, Loughbridge AB, Day HE, Fleshner M. Long-term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behav Brain Res* 217: 354–362, 2011.
 32. Hamrick MW, Ding KH, Ponnala S, Ferrari SL, Isaacs CM. Caloric restriction decreases cortical bone mass but spares trabecular bone in the mouse skeleton: implications for the regulation of bone mass by body weight. *J Bone Miner Res* 23: 870–878, 2008.
 33. Hillebrand JJ, Koesters MP, de Rijke CE, Kas MJ, Adan RA. Leptin treatment in activity-based anorexia. *Biol Psychiatry* 58: 165–171, 2005.
 34. Hillebrand JJ, van Elburg AA, Kas MJ, van Engeland H, Adan RA. Olanzapine reduces physical activity in rats exposed to activity-based anorexia: possible implications for treatment of anorexia nervosa? *Biol Psychiatry* 58: 651–657, 2005.
 35. Hoek HW. Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and other eating disorders. *Curr Opin Psychiatry* 19: 389–394, 2006.
 36. Jéssus P, Ouelaa W, François M, Riachy L, Guérin C, Aziz M, Do Rego JC, Déchelotte P, Fétissov SO, Coeffier M. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin Nutr* 33: 1046–1053, 2014.
 37. Kanarek RB, D'Anci KE, Jurdak N, Mathes WF. Running and addiction: precipitated withdrawal in a rat model of activity-based anorexia. *Behav Neurosci* 123: 905–912, 2009.
 38. Kirilanis P, Malliou P, Beneka A, Giannakopoulos K. Occurrence of acute lower limb injuries in artistic gymnasts in relation to event and exercise phase. *Br J Sports Med* 37: 137–139, 2003.
 39. Klenotich SJ, Dulawa SC. The activity-based anorexia mouse model. *Methods Mol Biol* 829: 377–393, 2012.
 40. Legroux-Gérot I, Vignau J, Biver E, Pigny P, Collier F, Marchandise X, Duquesnoy B, Cortet B. Anorexia nervosa, osteoporosis and circulating leptin: the missing link. *Osteoporos Int* 21: 1715–1722, 2010.
 41. Legroux-Gérot I, Vignau J, Collier F, Cortet B. Bone loss associated with anorexia nervosa. *Joint Bone Spine* 72: 489–495, 2005.
 42. Legroux-Gérot I, Vignau J, Collier F, Cortet B. Factors influencing changes in bone mineral density in patients with anorexia nervosa-related osteoporosis: the effect of hormone replacement therapy. *Calcif Tissue Int* 83: 315–323, 2008.
 43. Legroux-Gérot I, Vignau J, D'Herbomez M, Collier F, Marchandise X, Duquesnoy B, Cortet B. Evaluation of bone loss and its mechanisms in anorexia nervosa. *Calcif Tissue Int* 81: 174–182, 2007.
 44. Lucas AR, Beard CM, O'Fallon WM, Kurland LT. 50-year trends in the incidence of anorexia nervosa in Rochester, Minn.: a population-based study. *Am J Psychiatry* 148: 917–922, 1991.
 45. Lusk G. Animal calorimetry analysis of the oxidation of mixtures of carbohydrate and fat. A correction. *J Biol Chem* 59: 41–42, 1924.
 46. McLean JA, Tobin G. *Animal and Human Calorimetry*. New York: Cambridge University, 1987.
 47. Méquignon M, Langlet F, Zgheib S, Dickson S, Dehouck B, Chauveau C, Viltart O. Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 15, 2013.
 48. Merkestien M, Brans MA, Luijckendijk MC, de Jong JW, Egecioglu E, Dickson SL, Adan RA. Ghrelin mediates anticipation to a palatable meal in rats. *Obesity (Silver Spring)* 20: 963–971, 2012.
 49. Merkestien M, van Gestel MA, van der Zwaal EM, Brans MA, Luijckendijk MC, van Rozen AJ, Hendriks J, Garner KM, Boender AJ, Pandit R, Adan RA. GHS-R1a signaling in the DMH and VMH contributes to food anticipatory activity. *Int J Obes (Lond)* 38: 610–618, 2014.
 50. Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Aggarwal A, Herzog DB, Neubauer G, Breen J, Klibanski A. Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3486–3495, 2004.
 51. Morton GJ, Kaiyala KJ, Fisher JD, Ogimoto K, Schwartz MW, Wisse BE. Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E392–E401, 2011.
 52. Nybo L, Secher NH. Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. *Prog Neurobiol* 72: 223–261, 2004.

CHRONIC FOOD RESTRICTION AND PHYSICAL ACTIVITY

E15

53. Ogata R, Matsuzaki T, Iwasa T, Kiyokawa M, Tanaka N, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Hypothalamic Ghrelin suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone via beta-endorphin in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 90: 364–370, 2009.
54. Padovani M, Lavigne JA, Chandramouli GV, Perkins SN, Barrett JC, Hursting SD, Bennett LM, Berrigan D. Distinct effects of caloric restriction and exercise on mammary gland gene expression in C57BL/6 mice. *Cancer Prev Res (Phila)* 2: 1076–1087, 2009.
55. Pirke KM, Pahl J, Schweiger U, Warnhoff M. Metabolic and endocrine indices of starvation in bulimia: a comparison with anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 15: 33–39, 1985.
56. Routtenberg A, Kuznesof AW. Self-starvation of rats living in activity wheels on a restricted feeding schedule. *J Comp Physiol Psychol* 64: 414–421, 1967.
57. Russell J, Baur LA, Beaumont PJ, Byrnes S, Gross G, Touyz S, Abraham S, Zipfel S. Altered energy metabolism in anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 26: 51–63, 2001.
58. Sasse SK, Greenwood BN, Masini CV, Nyhuis TJ, Fleshner M, Day HE, Campeau S. Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. *Stress* 11: 425–437, 2008.
59. Scheurink AJ, Ammar AA, Benthem B, van Dijk G, Södersten PA. Exercise and the regulation of energy intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, Suppl 3: S1–S6, 1999.
60. Scheurink AJ, Boersma GJ, Nergårdh R, Södersten P. Neurobiology of hyperactivity and reward: agreeable restlessness in anorexia nervosa. *Physiol Behav* 100: 490–495, 2010.
61. Smolak L, Murnen SK, Ruble AE. Female athletes and eating problems: a meta-analysis. *Int J Eat Disord* 27: 371–380, 2000.
62. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 32: 159–221, 2011.
63. Tatsumi S, Ito M, Asaba Y, Tsutsumi K, Ikeda K. Life-long caloric restriction reveals biphasic and dimorphic effects on bone metabolism in rodents. *Endocrinology* 149: 634–641, 2008.
64. Torstveit MK, Rosenvinge JH, Sundgot-Borgen J. Prevalence of eating disorders and the predictive power of risk models in female elite athletes: a controlled study. *Scand J Med Sci Sports* 18: 108–118, 2008.
65. Torstveit MK, Sundgot-Borgen J. Participation in leanness sports but not training volume is associated with menstrual dysfunction: a national survey of 1276 elite athletes and controls. *Br J Sports Med* 39: 141–147, 2005.
66. Uzun AK, Yucel B, Omer B, Issever H, Ozbey NC. Leptin concentration indexed to fat mass is increased in untreated anorexia nervosa (AN) patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71: 33–39, 2009.
67. Verhagen LA, Eggecioglu E, Luijendijk MC, Hillebrand JJ, Adan RA, Dickson SL. Acute and chronic suppression of the central ghrelin signaling system reveals a role in food anticipatory activity. *Eur Neuropsychopharmacol* 21: 384–392, 2011.
68. Verhagen LA, Luijendijk MC, Hillebrand JJ, Adan RA. Dopamine antagonism inhibits anorectic behavior in an animal model for anorexia nervosa. *Eur Neuropsychopharmacol* 19: 153–160, 2009.
69. Wasinski F, Bacurau RF, Moraes MR, Haro AS, Moraes-Vieira PM, Estrela GR, Paredes-Gamero EJ, Barros CC, Almeida SS, Câmara NO, Araújo RC. Exercise and caloric restriction alter the immune system of mice submitted to a high-fat diet. *Mediators Inflamm* 2013: 395672, 2013.
70. Watanabe K, Hara C, Ogawa N. Feeding conditions and estrous cycle of female rats under the activity-stress procedure from aspects of anorexia nervosa. *Physiol Behav* 51: 827–832, 1992.
71. Woods SC. The eating paradox: how we tolerate food. *Psychol Rev* 98: 488–505, 1991.
72. Zák A, Vecka M, Tvrdická E, Hruší M, Novák F, Papezová H, Lubanda H, Veselá L, Staníková B. Composition of plasma fatty acids and non-cholesterol sterols in anorexia nervosa. *Physiol Res* 54: 443–451, 2005.
73. Zgheib S, Méquinion M, Lucas S, Leterme D, Ghali O, Tolle V, Zizzari P, Bellefontaine N, Legroux-Gérot I, Hardouin P, Broux O, Villart O, Chauveau C. Long-term physiological alterations and recovery in a mouse model of separation associated with time-restricted feeding: a tool to study anorexia nervosa related consequences. *PLoS One* 9: e103775, 2014.
74. Zhang W, Majumder A, Wu X, Mulholland MW. Regulation of food intake and body weight by recombinant proghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E1269–E1275, 2009.

Résultats complémentaires : phase de récupération après un déficit énergétique sévère sur le long terme

Les altérations tissulaires et endocriniennes ont été rarement étudiées dans les différents modèles de restriction alimentaire chronique. En effet, la plupart des études cible majoritairement les facteurs susceptibles d'être impliqués dans le rallongement de l'espérance de vie ou dans la sénescence (Speakman, 2011). Les études qui utilisent souvent des restrictions plus sévères s'arrêtent aux conséquences et aux mécanismes impliqués dans ces conditions de déficit énergétique (Siegfried *et al.*, 2003 ; Avena *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2012) et délaissent la phase de récupération. Or durant la maladie, les patients anorexiques adoptent un certain nombre de stratégies nécessaires à la survie qui conduisent à un grand nombre d'altérations comme nous l'avons souligné (Méquinion *et al.*, 2013). Néanmoins, un certain nombre de ces adaptations physiologiques peuvent constituer un obstacle à la phase de récupération chez les malades (Lawson *et al.*, 2008 ; Estour *et al.*, 2010). Il apparaît qu'après regain de poids corporel avec des niveaux comparables à des individus contrôles, les anorexiques présentent toujours des perturbations de la fonction reproductrice, mais aussi une récupération lente de leur densité minérale osseuse (Misra et Klibanski, 2014).

Il n'existe que très peu de données sur l'influence que peut avoir l'activité physique sur la phase de récupération. En effet, de par ses actions aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau central, on est en droit de se demander si l'activité physique a une influence notable sur le retour à un poids au niveau de la normale, mais également si ces effets sont bénéfiques ou délétères.

Dans cette étude préliminaire, des souris préalablement soumises à un protocole de restriction alimentaire sévère sur le long terme (voir point A ; Mequinion *et al.*, 2014 en révision) sont ensuite placées dans un protocole dit de récupération. Dans cette étude, 3 groupes de souris femelles ont été étudiés : les souris FRW (Food Restriction and Wheel) et FR (Food Restriction) précédemment soumises à une restriction quantitative de nourriture de 50% avec ou non accès à une roue d'activité (Méquinion *et al.*, 2014 en révision) ont de nouveau accès libre à la nourriture (*ad libitum*). Ces 2 groupes ont été comparés à un troisième groupe ayant eu accès libre à la nourriture AL (*Ad libitum*). Ainsi, les 3 groupes ont été suivis pendant 3 semaines. Il apparaît que la période de récupération révèle une grande capacité de correction des différentes altérations précédemment observées.

3.1. Récupération du poids corporel et de la fonction reproductrice

Au terme des 3 semaines de récupération, le retour d'une nourriture à volonté entraîne une augmentation rapide et importante de poids corporel dans les 2 groupes FR et FRW (**Fig. 1 A**). Le

gain de poids corporel est significativement différent entre les souris FR et FRW et les souris AL ($F_{2-15}=262,29$ $p < 0.001$) et entre les souris FR et FRW ($p < 0.05$) (**Fig. 1 B**). Ce gain de poids corporel apparaît fortement lié au comportement alimentaire. En effet, les souris des groupes FR et FRW présentent une phase d'hyperphagie dans les jours qui suivent le retour de l'alimentation (jusqu'au 3^{ème} et 5^{ème} jour du protocole pour les groupe FRW et FR respectivement, $p < 0.05$). Cette hyperphagie est ainsi plus prolongée dans le groupe FR (effet temps $F_{19-120} = 25$ $p < 0,001$; effet groupe $F_{2-120} = 7,51$ $p < 0,001$, **Fig. 1 C**). L'hyperphagie transitoire conduit à une prise alimentaire cumulée significativement plus importante chez les souris FR par rapport aux souris AL ($p < 0,05$) et une tendance entre les souris FRW et AL ($p = 0,063$, **Fig. 1 D**). Cette différence est à prendre avec précaution car elle peut être liée au faible effectif sur lequel ces mesures ont été réalisées ($n = 6$ par groupe ; 3 cages). Les groupes FR et FRW ne présentent pas de différence significative pour la quantité de nourriture consommée cumulée.

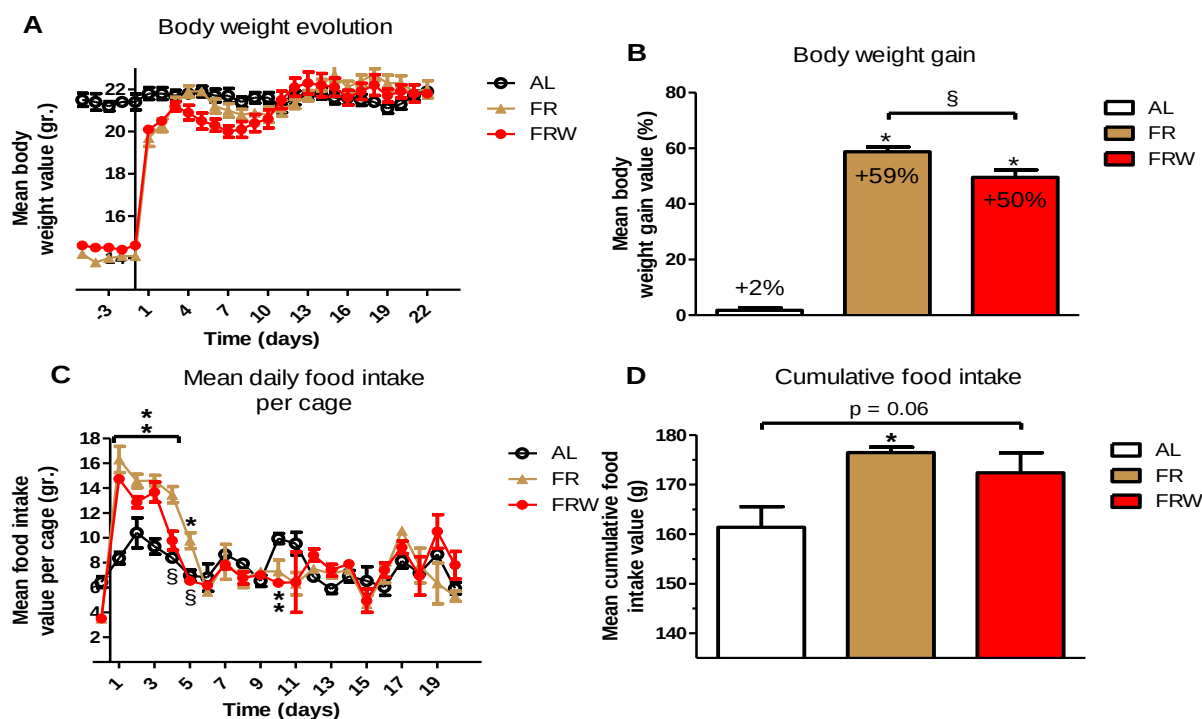


Figure 1. Weight evolution, body weight gain, daily and cumulative food intake of mice submitted to 3-weeks of recovery of food restriction protocol. **A:** Body weights were recorded before the the dark phase. **B:** Daily mean food intake per cage was recorded for each group. **C:** Body weight gain was calculated from body weight difference between D-1 and D20 of protocol. **D:** Cumulative food intake was calculated from D1 to D20 of protocol. Differences were tested by a One-way Anova or Kruskal Wallis test followed by a Bonferroni or Tukey post-hoc test respectively. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 3$. $p < 0.05$ * AL vs. FR or FRW; § FR vs. FRW.

Le retour à un poids comparable au groupe AL est suivi par un retour du cycle oestral dans les groupes FR et FRW, 6 à 7 jours après la consommation *ad libitum* de nourriture (**Fig. 2**). Cette

récupération du cycle est associée un retour à la normale du poids de l'utérus et des ovaires (**Table 1**) avec des valeurs comparables à celles du groupe AL.

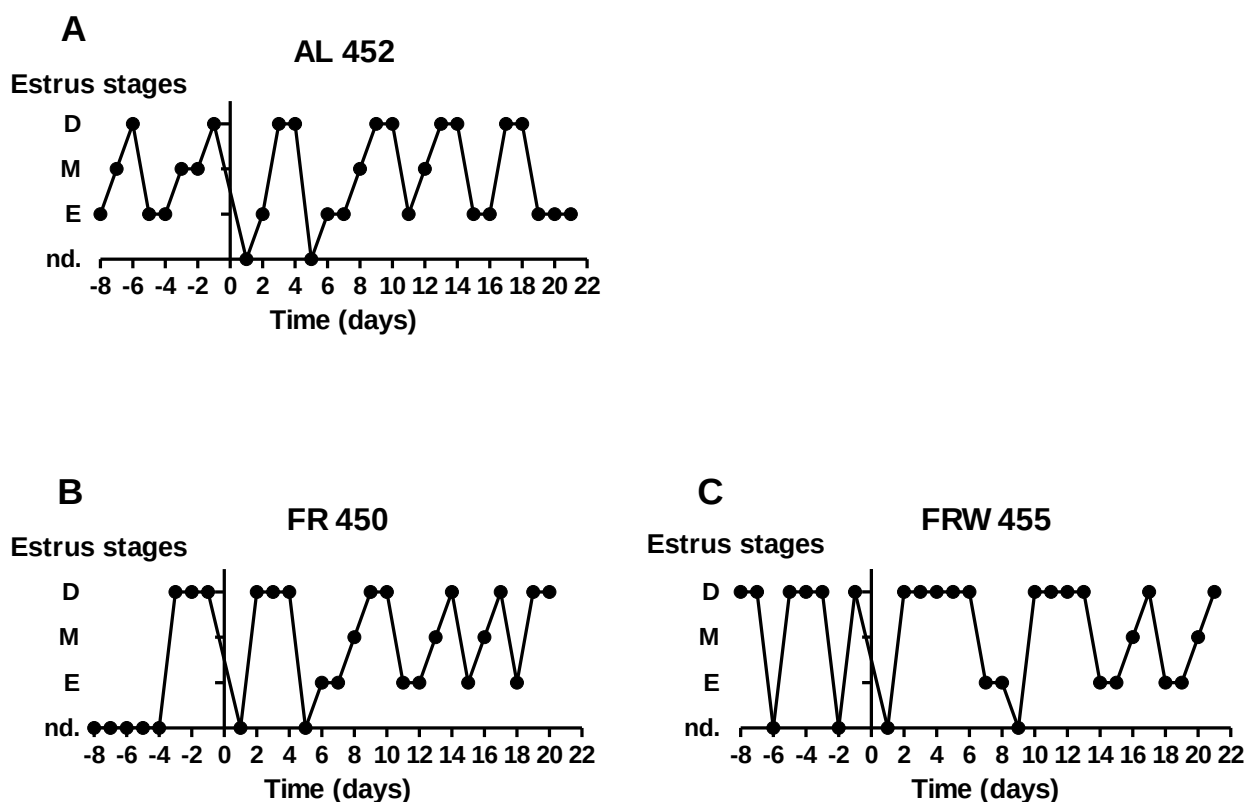


Figure 2. Estrous cycle recovery. Estrous cycle determined according to the observation of the cell population of vaginal washes was daily followed on mice in each group. D= diestrus, M= metestrus, E = estrus, P = proestrus, nd. = no cell observed or undetermined stage. **A:** A representative example of estrous cycle of AL mice. **B:** A representative example of cycles observed in FR mice, with the onset of long duration with the onset of estrus during the recovery period. **C:** A representative example of cycles observed in FRW mice, with the onset of estrus during the recovery period.

3.2. Récupération des altérations tissulaires et endocriniennes

Différents tissus sont impactés par le retour de la nourriture *ad libitum*. Les 3 semaines de protocole permettent une récupération de la masse du foie, des triceps de l'utérus et des ovaires (Table 1 et Table 1 du point II, Mequinion *et al.*).

En ce qui concerne les tissus adipeux, la masse de tissu adipeux sous cutané n'est pas significativement différente entre les 3 groupes alors que la masse de tissu adipeux viscéral est significativement plus faible dans le groupe FRW par rapport aux 2 autres groupes ($H = 12.78$, $p < 0,05$).

	Tissue	AL	FR	FRW
3 weeks recovery	SCAT (mg)	188,20 ± 42,74	140,93 ± 15,29	123,33 ± 24,26
	VAT (mg)	291,63 ± 35,96	238,97 ± 16,55	159,30 ± 9,64*§
	Liver (mg) a	1060,67 ± 25,84	1169,55 ± 24,92	1101,87 ± 49,14
	Triceps (mg) a	129,17 ± 2,24	115,35 ± 5,47	126,58 ± 3,25
	Uterus (mg)	66,10 ± 5,81	84,30 ± 12,66	79,67 ± 16,60
	Ovary length (µm)	1560,14 ± 77,53	1485,75 ± 104,62	1556,00 ± 111,62
	Ovary width (µm)	1083,92 ± 54,10	1106,61 ± 69,38	1014,62 ± 33,27

Table 1. Weights and size of different tissues impacted by the protocol of 3 weeks recovery. These these included main adipose tissues: subcutaneous adipose tissue (SCAT) and visceral adipose tissue (VAT); and main lean tissues: liver, triceps and reproductive organs (uterus and ovaries) impacted by food restriction. Differences were tested by a Kruskal-Wallis test following by a Tukey post-hoc test. Data represent mean ± SEM n ≥ 6. p < 0.05 * AL vs. FR or FRW; § FR vs. FRW.

Par ailleurs, après 3 semaines de récupération les souris FRW montrent des concentrations circulantes de leptine significativement plus faibles (**Fig. 3 A**), par rapport aux souris AL (H = 15.96 p < 0,0.5) et FR (H = 15.96 p < 0,0.5). Alors que les résultats préliminaires concernant les taux circulants de ghréline dans les différents groupes n'indiquent pas de différences significatives. (**Fig. 3 B-C**)

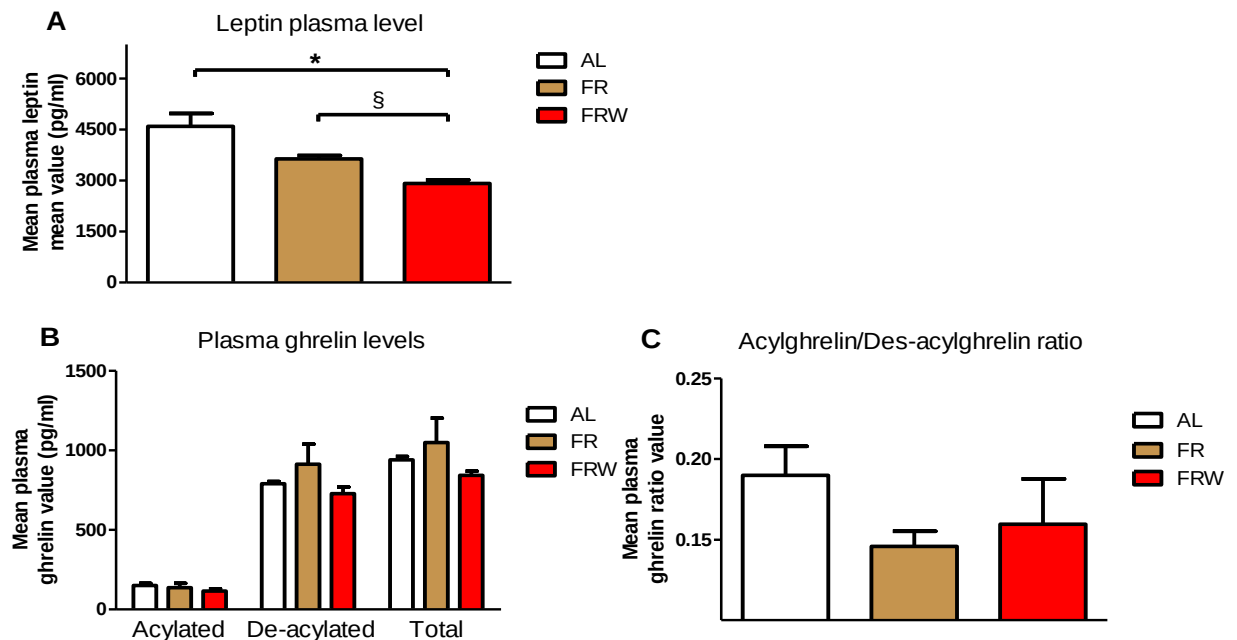


Figure 3. Leptin and ghrelin. Plasma concentrations of leptin and ghrelin in mice in standard condition (AL) or submitted to food restriction 10 weeks with or without wheel running access (FRW and FR respectively) followed by 3 weeks of recovery **A:** Plasma leptin concentrations; **B:** Plasma ghrelin concentrations; **C:** acylghrelin on des-acylghrelin ratio. Differences were tested by a One-way ANOVA followed by Dunn post hoc. Data represent mean ± SEM n ≥ 2/group. p < 0.05 * AL vs. FRW; § FR vs. FRW

La leptine et la ghréline impliquées dans le métabolisme énergétique jouent également un rôle direct ou indirect dans le métabolisme glucidique. Ainsi, à jeun, les souris FRW tendent à avoir une glycémie plus faible que les groupes AL et FR ($p = 0,051$). En condition basale, les résultats bien que préliminaires ne montrent pas de différences entre les groupes (**Table 2**). Pour compléter ces résultats, un test de tolérance au glucose a été réalisé après 2 semaines de récupération. Les souris FRW tendent à avoir une meilleure sensibilité au glucose par rapport au souris FR (effet du protocole $F_{2-105} = 3,16$ $p = 0,056$) (**Fig. 4 A**). Malgré cette tendance aucune différence significative n'est apparue avec les calculs d'aire sous la courbe (**Fig. 4 B**).

Tissue		AL	FR	FRW
3 weeks recovery	Fasted glycemia (mg/dl)	131,83 ± 9,06	126,17 ± 5,90	106,67 ± 5,12
	Basal glycemia (mg/dl)	153,25 ± 11,01	136,75 ± 5,57	155,75 ± 11,75

Table 2. Impact of 3 weeks recovery after 10 weeks of food restriction protocol with or without wheel running access on fasted and basal glycemia. All samplings were done in the morning (8:30 to 11:00). Differences were tested by a One-way ANOVA. Data represent mean ± SEM; $n \geq 2$ /group

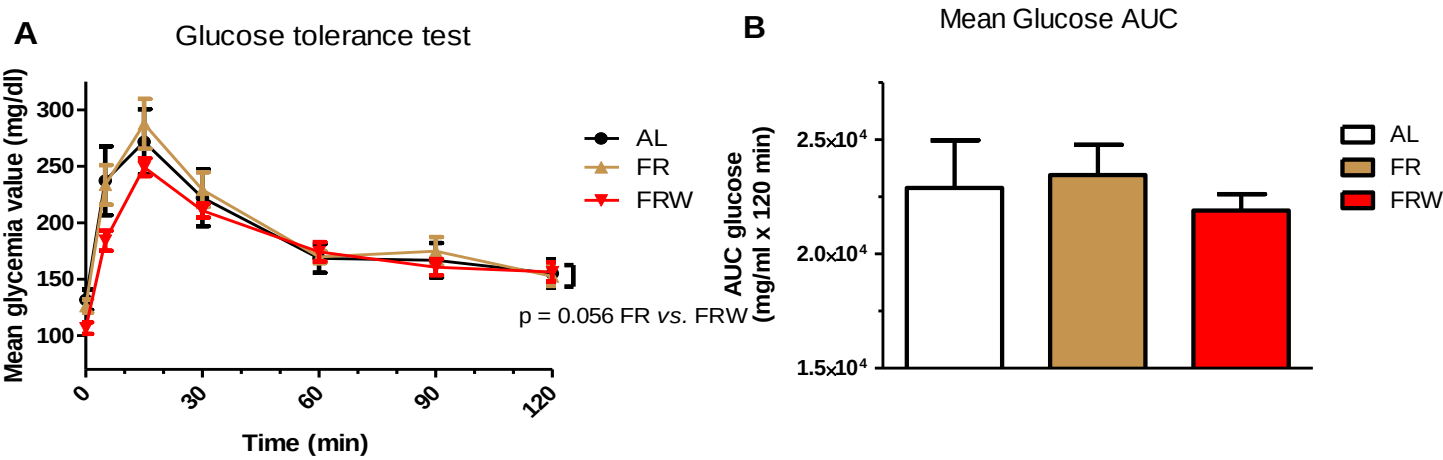


Figure 4. Intraperitoneal glucose tolerance test in mice after 3 weeks recovery of 10 weeks of food restriction protocol with or without wheel running access. Mice were fasted during about 14-16h and they were received intraperitoneal of glucose solution (1,5g/kg). **A:** Time course of glycemia during glucose tolerance test; **B:** Area under curves calculated from trapezoidal method. In A, differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Tukey post-hoc test. In B, differences were tested by a One-way ANOVA. Data represent mean ± SEM $n \geq 6$ /group.

3.3. Discussion générale

Ces résultats préliminaires obtenus après 3 semaines de récupération apparaissent intéressants et prometteurs. En effet, bien que soumis à une restriction alimentaire chronique sur une période prolongée de 10 semaines, les groupes FR et FRW restent sensibles aux signaux orexigènes, car le retour à un accès libre à la nourriture entraîne rapidement une augmentation du poids corporel et de la prise alimentaire associées à un retour du cycle oestral et d'un regain des masses tissulaires. Toutefois, l'accès à la roue d'activité influence la masse grasse viscérale ainsi que la sécrétion de leptine et a tendance à améliorer la sensibilité au glucose, car la réactivité des souris FRW diffère de celle des souris FR. Il semble donc que l'activité physique limite le regain excessif de masse grasse viscérale comme cela est observé pour les souris FR qui pourrait engendrer sur une plus longue période l'apparition d'une lipodystrophie.

La récupération du poids corporel des souris FR et FRW est associée à un comportement d'hyperphagie transitoire. Ce comportement apparaît totalement indépendant de l'activité physique ou du stress. En effet, cette hyperphagie a été décrite aussi bien dans des modèles de restriction ou de jeûne (Pénicaud et Le Magnen, 1980) que dans le modèle ABA (avec 7 jours de récupération après 7 jours de protocole ; Dixon *et al.*, 2003) ou plus récemment dans le modèle SBA (Zgheib *et al.*, 2014). Toutefois, nos résultats indiquent un effet non négligeable de l'activité physique sur le gain de poids corporel, étant donné que les souris FRW reprennent moins de poids que les souris FR, du moins sur cette période de 3 semaines. Il conviendrait de prolonger l'expérience afin de vérifier si cet écart se maintient. L'exercice physique modéré aurait donc un effet protecteur sur une reprise rapide de poids et sur une augmentation conséquente de la masse grasse. Dans le point II de ce chapitre, nous avons déjà montré que l'activité physique influence la masse grasse en induisant un gain moins important de tissu adipeux viscéral, tissu généralement associé aux perturbations métaboliques et à l'obésité (Lam *et al.*, 2011). De plus, il a été montré récemment que l'activité physique augmente la sensibilité au glucose indépendamment de la leptine et de la ghréline (Borg *et al.*, 2014) et que cette sensibilité accrue pourrait participer à la différence de poids corporel entre FR et FRW.

Les autres organes, foie et triceps, également impliqués dans le métabolisme énergétique ont une masse similaire pour les trois groupes. Il a été montré que 16h de renutrition *ad libitum*

sont suffisantes pour que les masses du foie et des muscles retrouvent leur valeur initiale (Björntorp et Yang, 1982 ; Tai *et al.*, 2010), ce qui témoigne d'une grande plasticité adaptative de ces organes.

L'effet de l'activité physique se traduit également par des concentrations plasmatiques de leptine plus basses chez les souris FRW que les FR. Cette variation peut être mise en parallèle avec la masse adipeuse viscérale moins importante chez les FRW par rapport aux FR. Ces taux plasmatiques plus faibles pourraient constituer un facteur favorisant à un retour à la normale du comportement alimentaire. Cette hormone anorexigène est sécrétée suite au repas mais aussi en proportion du tissu adipeux. On peut donc penser qu'une élévation trop rapide dans le temps des concentrations plasmatiques de leptine chez des patients AM aurait des effets « coupe faim » pouvant nuire à une phase de récupération efficace (Skibicka et Grill, 2009). En effet, le comportement d'hyperphagie observé au début du retour de la nourriture à volonté apparaît comme transitoire et les animaux FR et FRW adoptent très vite une alimentation comparable à celle des souris AL mais légèrement décalée dans le temps. Il serait intéressant de regarder plus précisément le pattern de prise alimentaire dans les cages métaboliques, comme cela a été fait dans le point II, afin de déterminer le pattern de réalimentation optimum dans ce genre de situation.

Le regain de poids corporel est également associé à un retour du cycle oestral dans les groupes FR et FRW. Il semblerait que ce soit le regain de masse grasse qui constitue le facteur le plus important pour le retour de la fertilité, étant donné que les cycles apparaissent de nouveau après 6 à 7 jours de reprise alimentaire comme chez les patientes où un certain seuil de masse grasse doit être atteint (Misra et Klibanski, 2014). Certains auteurs (Zamiri, 1978 ; Nelson *et al.*, 1985) soulignent le fait que la restriction alimentaire entraîne un arrêt du cycle sexuel aussi bien chez l'humain que les rongeurs, .qui permettrait une préservation des stocks folliculaires . Ainsi, dans notre modèle, il serait intéressant de vérifier la fonctionnalité de l'axe reproducteur des souris FR et FW soit par une exposition à l'odeur de mâle reproducteur (Bronson *et al.* 1973 ; Bellefontaine *et al.*, 2014), soit une mise en contact direct avec des mâles matures sexuellement et ce à différents moments de la phase de récupération. Ce type d'expérience permettrait de déterminer à quel moment l'axe gonadotrope redevient fonctionnel et si les souris sont fertiles.

Un autre point d'intérêt correspond au rôle positif que l'activité physique joue sur la formation

osseuse (Morseth *et al.*, 2011) en particulier sur la récupération de la composition minérale osseuse des souris FRW. En effet, la pratique d'une activité physique modérée est préconisée pour réduire les risque d'ostéoporoses chez les femmes en ménopause (Bonaiuti *et al.*, 2009). Or comme les patients AM présentent des altérations osseuses persistantes dans le temps avec des taux de récupération faible (Legroux-Gerot *et al.*, 2005 ; Misra *et al.*, 2008), l'activité physique modérée et encadrée pourrait être une solution alternative aux traitements actuels.

CHAPITRE 2

Altérations centrales induites à court terme
dans un modèle murin de restriction
alimentaire chronique :
implication de la ghréline

Article en préparation :

**Chronic food restriction and physical activity induced
central alterations in a mouse model of anorexia
nervosa : implication of ghrelin**

I. Introduction

L'anorexie mentale est une maladie chronique caractérisée, comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, par une restriction alimentaire sévère, une perte de poids importante et une activité physique excessive pouvant concerner jusqu'à 80% des patients (Dalle Grave *et al.*, 2009). L'absence de traitements efficaces (Roerig *et al.*, 2005) et la grande mortalité observée dans cette maladie justifie parfaitement l'utilisation de modèles animaux (Hoek *et al.*, 2006 ; Arcelus *et al.*, 2011) pour tenter de mieux comprendre les substrats physiologiques et neurologiques qui pourraient sous-tendre le maintien du patient dans cet état de restriction qui peut amener progressivement à l'épuisement des ressources énergétiques. Les traitements actuels, psychiatriques et psycho-pharmacologiques, ne sont pas systématiquement couronnés de succès (Fairburn *et al.*, 2003 ; Pederson *et al.*, 2003). L'objectif premier des cliniciens utilisant ces traitements est d'augmenter la prise alimentaire des patients AM afin d'éviter une issue fatale. Les stratégies mises en œuvre sont souvent difficiles à maintenir du fait de l'inconfort gastrique dont souffrent les patients qui recommencent à manger (constipation, troubles de la digestion, nausées...). Jusqu'à présent, il n'existe que peu d'essais cliniques visant à rétablir ou restaurer un système hormonal défaillant, en particulier le système impliqué dans la stimulation de la prise alimentaire. En effet, comme indiqué par ailleurs, les patients anorexiques de type restrictif montrent une augmentation de la forme acylée ghréline (Germain *et al.*, 2007). Cette augmentation, adaptative étant donné le déficit énergétique, est d'autant plus surprenante que les patients n'émettent pas le comportement adéquat de prise de nourriture. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette absence de réactivité : 1) le signal ghréline ne serait pas perçu de manière efficace au niveau central laissant suggérer, à l'instar de la leptine dans l'obésité, à une forme de résistance ou d'absence de sensibilité à la ghréline au niveau du SNC ; 2) les récepteurs de la ghréline sont moins nombreux/fonctionnels ; 3) il existe une compétition entre les deux formes de la ghréline acylée et non-acylée et l'obestatine, ces deux derniers composants ayant un effet anorexigène. A l'heure actuelle, aucune de ces hypothèses n'est validée.

Cependant, des essais cliniques, réalisés le plus souvent sur un faible effectif de patients, ont évalué les effets induits par une ou plusieurs injections de ghréline acylée (Miljic *et al.*, 2006; Hotta *et al.*, 2009; Ogiso *et al.*, 2011). Les données obtenues sont encourageantes, mais il reste néanmoins un énorme travail de mise au point pour connaître la dose adéquate, la durée d'injection (une seule ou plusieurs) ou encore la voie d'injection la plus adéquate. L'étude de Miljic *et al.*, (2006) montre par exemple que l'administration continue de ghréline pendant 5h n'a pas d'effet chez les patients AM, alors que des patients recevant deux injections

quotidiennes de ghréline par injection intraveineuse montrent un meilleur confort gastro-intestinal et une sensation de faim accrue (Hotta *et al.*, 2009).

Focaliser sur le signal « ghréline » chez les patients anorexiques semble d'autant plus pertinent que cette hormone est impliquée dans différentes fonctions (voir introduction) qui sont perturbées chez les anorexiques (Méquinion *et al.*, 2013). En effet, la ghréline stimule la sécrétion de GH et module par conséquent la production d'IGF-1 hépatique (Peino *et al.*, 2000) par une action sur les neurones GHRH hypothalamiques ainsi que sur les cellules GH de l'adénohypophyse (Veldhuis et Bowers, 2010). Une étude récente montre que l'implication de la GH dans le maintien de la glycémie en condition de restriction alimentaire. En effet, des souris déficientes pour la GOAT et placées sous une restriction alimentaire de 40% présentent une hypoglycémie sévère qui est corrigée par l'administration de GH (Goldstein *et al.*, 2011). Ces données laissent supposer un rôle prépondérant de la GH dans le maintien de la glycémie. L'action régulatrice de la ghréline sur la prise alimentaire fait intervenir 2 systèmes majeurs, comme nous l'avons indiqué dans l'introduction: le système homéostatique et le système hédonique, non homéostatique.

Ainsi, afin de mieux comprendre comment la ghréline peut potentiellement exercer une action déterminante dans les mécanismes physiopathologiques associés à l'AM, nous avons tenté d'apporter quelques réponses mécanistiques à partir de notre modèle murin associant restriction alimentaire chronique et activité physique volontaire (Méquinion *et al.*, 2014 en révision), et ce sur un protocole « court-terme ».

La première partie concerne une évaluation de différents paramètres en situation basale, i.e. suite à 15 jours de protocole. Nous avons tout d'abord étudié l'évolution des concentrations plasmatiques de ghréline acylée et dé-acylée au cours de la journée, en particulier avant le repas (soir) et après le repas (matin). En parallèle, étant donné l'implication étroite entre la ghréline, l'axe somatotrope et la glycémie, nous avons évalué les concentrations plasmatiques de GH, d'IGF-1 et de glucose. La sécrétion pulsatile de la GH a également été mesurée. Au niveau central, nous nous sommes intéressés à l'expression des neuropeptides hypothalamiques et de leurs récepteurs impliqués directement dans la régulation de la prise alimentaire. Enfin, nous avons obtenu certaines données préliminaires concernant les concentrations de dopamine dans le circuit méso-limbique. L'ensemble de ces neuromédiateurs étant directement ou indirectement impliqués dans l'adaptation aux conditions drastiques de restriction alimentaire, mais aussi dans l'activité anticipatoire à la prise de nourriture.

Dans un deuxième temps, pour faire écho aux essais cliniques, nous avons étudié l'impact

d'une injection aigue de ghréline en injection intrapéritonéale sur la prise alimentaire, l'activation de l'axe somatotrope, la glycémie et sur l'activation des neurones des noyaux hypothalamiques.

II. Procédures expérimentales

2.1. Animaux

Des souris femelles adultes C57Bl/6J (âgées de 7 semaines d'un poids moyen initial de $18,3 \pm 0,1g$; Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) ont été hébergées à deux par cage pour éviter le stress d'isolement jusqu'à la fin du protocole. Elles ont été maintenues dans une animalerie SPF à une température de $22 \pm 1^\circ C$ sous un éclairage artificiel jour/nuit de 12 heures (extinction de la lumière à 8h). Durant une semaine d'acclimatation, les souris ont été pesées tous les jours afin de les habituer à être manipulées ; durant cette semaine, les souris ont eu un accès libre à la boisson et à de la nourriture standard (Special Diet Service RM3 lipides : 4,30% ; protéines : 22,30% et glucides : 51,20% Dietex, Essex, Royaume Uni). Les souris ont ensuite été divisées en quatre groupes. Dans le groupe expérimental : « Food restriction and Wheel » (groupe FRW), les souris ont été placées dans une cage avec un accès libre à une roue d'activité (Intellibio, Seichamps, France) et soumises à une restriction quantitative de nourriture, comportant une restriction de 30% par jour pour les 3 premiers jours puis 50% par jour jusqu'à la fin du protocole. Cette restriction a été calculée à partir de la quantité totale de nourriture consommée par des souris en conditions *ad libitum* (groupe AL) le jour précédent. Nous avons aussi utilisé deux autres groupes contrôles : un groupe pair fed (groupe FR) et un groupe de souris nourries *ad libitum* mais ayant un accès libre à une roue d'activité (groupe ALW). Le poids corporel et la prise alimentaire (distribuée à 18:30) ont été mesurés quotidiennement sur un protocole court terme (15 jours). Ce protocole a fait l'objet d'une caractérisation lors d'une précédente étude (Méquinion *et al.*, in press). Le nombre de souris utilisé durant les différentes expériences était de 6 par groupes. Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la Directive du Conseil des Communautés Européennes (86/609/EEC) et approuvés par le comité d'éthique régional du Nord-Pas-de-Calais de Lille, France (protocole CEEA 392012).

2.2. Protocoles expérimentaux

Les études décrites dans ce chapitre ont été réalisées à partir de les différentes manipulations, décrites en détail dans les points suivants, et menées sur deux séries d'expériences.

2.2.1. Expérience 1 : impact de la ghréline sur l'axe somatotrope

Après 15 jours de protocole, différents prélèvements sanguins ont été réalisés afin de mesurer la glycémie et les concentrations plasmatiques de ghréline (acylée et des-acylée), de GH, et d'IGF-1. Dans une première série d'expériences, les mesures de ces hormones, excepté IGF-1, ont été effectuées en condition basale le matin (entre 8:00 et 10:00) après la période d'alimentation et l'après-midi (entre 16:00 et 18:00) avant la distribution de la nourriture (pour les groupes FR et FRW). Afin de déterminer l'impact du protocole de restriction sur la pulsativité de la GH, les quatre groupes de souris ont subi des prélèvements de sang (4µl) toutes les 10min durant 6 heures consécutives, dans une deuxième série d'expériences,. Les échantillons ont été collectés durant un laps de temps précis entre 12:15 et 18:15 (**Fig. 1**). Pendant la période de prélèvement, les souris ont été maintenues à deux par cage pour limiter le stress. La queue des souris a été délicatement incisée une heure avant le début des échantillonnages. Après 2 jours de récupération durant lesquelles les souris n'ont pas été manipulées, les quatre groupes reçoivent la même quantité de nourriture (4g par cage), 14 h avant d'être anesthésiés par un mélange de kétamine (100 mg/kg) et xylasine (20 mg/kg) et sacrifiés par ponction intra-cardiaque de sang. Le sang ainsi collecté placé en tube neutre, puis centrifugé (8000 rpm, 10 min, 4°C Centrifugeuse 5414 R, Eppendorf, Hamburg, Allemagne) a ensuite été utilisé pour doser les taux d'IGF-1 plasmatiques.

2 souris par cage

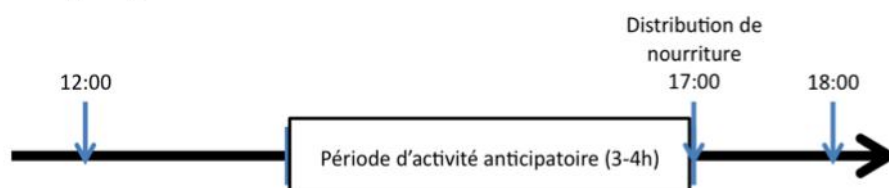


Figure 1. Protocole de mesure de la pulsativité de la GH. Après 14 jours de protocole, les souris sont placées dans une pièce séparée et le pointe de la queue des souris est incisée 1h avant le début des prélèvements. Les prélèvements ont été effectués entre 12h et 18h. Cette période comprend différentes phases : une période précédant l'activité anticipatoire à la prise de nourriture, la période d'activité anticipatoire et enfin une période d'accès à la nourriture pour les groupes FR et FRW dont les quantités distribuées se confèrent à la restriction mise en place dans le protocole de restriction.

Enfin, afin de vérifier l'impact de la ghréline sur la prise alimentaire, la glycémie et les concentrations de GH dans notre protocole, les souris des quatre groupes ont reçu une injection intrapéritonéale aiguë de ghréline (2 mg/kg, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) diluée dans du NaCl 0.9% ou de solution saline (NaCl 0,9%) immédiatement suivie d'un accès

libre à la nourriture. Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant l'injection, 15 min après l'injection et enfin 120 min après l'injection. La quantité de nourriture consommée a été mesurée.

2.2.2. Expérience 2 : impact de la ghréline au niveau central

Dans une autre série d'expériences toujours menées sur un protocole court-terme de 15 jours, deux lots de souris ont été sacrifiés à des temps différents (**Fig. 2**). Les souris ont été sacrifiées par décapitation et le cerveau est rapidement disséqué.

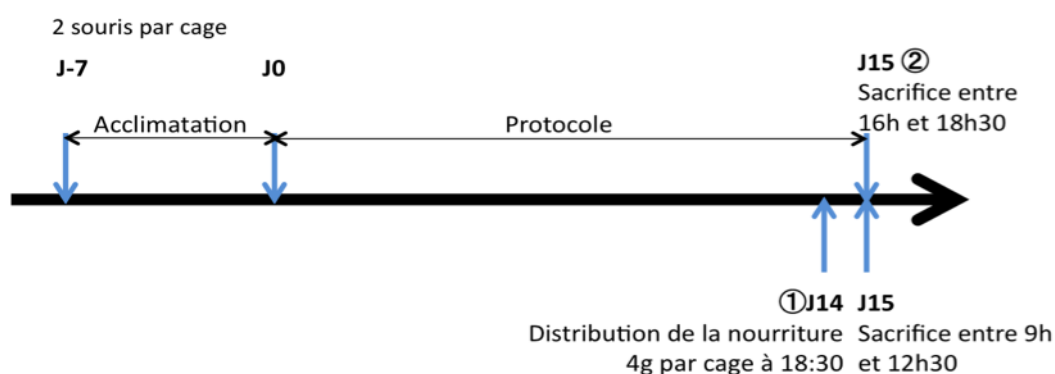


Figure 2. Chronologie des sacrifices. Après 15 jours de protocole, un premier groupe de souris (1) est sacrifié le matin entre 9:00 et 12:30 en ayant reçu la même quantité de nourriture la veille. Un deuxième groupe de souris (2) est sacrifié le soir avant la distribution de la nourriture pour les groupes FR et FRW.

Les cerveaux sont disséqués sur glace afin de récupérer l'hypothalamus qui est congelé immédiatement dans l'azote liquide. Pour les souris du groupe (2), les noyaux accumbens, l'aire ventrale tegmentale/substance noire des deux hémisphères ont été également disséqués et congelés dans de l'azote liquide. L'ensemble des tissus collectés dans l'azote liquide a ensuite été conservé à -80°C jusqu'à leur traitement.

Enfin, dans une troisième série d'expériences, les souris des quatre groupes ont reçu une injection aigüe de solution ghréline (2 mg/kg) ou de solution saline (NaCl 0,9%) immédiatement suivi d'un accès libre à la nourriture (voir expérience 1). Au bout de 2h la nourriture de chaque cage a été mesurée, puis les souris ont été anesthésiées par administration d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) et xylazine (20 mg/kg). Elles sont sacrifiées par perfusion intracardiaque de solution saline (0.9%) puis fixées par une solution de paraformaldéhyde 4% dilué dans du tampon phosphate pH 7,4. Les cerveaux ont été récupérés puis post-fixés pendant 2h dans une solution de paraformaldéhyde 4% à 4°C, avant d'être transférés dans une solution de cryconservation de sucrose 20% sur une nuit. Les cerveaux ont ensuite été enrobés dans des cuves remplies de Tissue Tek (Sakura Finetek,

Villeneuve d'Ascq, France) pour être congelés par immersion progressive dans de l'isopentane préalablement refroidi par de l'azote liquide et conservé à -80°C.

2.3. Dosages sanguins

La glycémie a été mesurée (OneTouch Vita, Lifescan, Milpitas, United States) à la fin du protocole le matin (entre 8:00 et 10:00), l'après-midi (entre 16:00 et 18:00) avant la distribution de la nourriture dans les groupes.

Les concentrations plasmatiques d'acylghréline et des-acylghréline ont été mesurées par kit EIA spécifiques (A05117 pour la forme acylée et A05118 pour la forme desacylée, SPIbio Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France). Les échantillons sanguins ont été collectés à partir de la veine caudale dans des tubes microvettes cb 300 coatés EDTA (Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Allemagne) contenant de l'acide p-hydroxy-mercuribenzoïque (0,4 mM final), un inhibiteur de sérine protéase, puis centrifugés (8000 rpm, 10 min, 4°C Centrifugeuse 5414 R, Eppendorf, Hamburg, Allemagne) pour obtenir le plasma. Il est ensuite acidifié (0,1 N final) pour préserver l'acylation de la ghreline. Les coefficients de variations inter-assays et intra-assays étaient de 5,40% et 3,70% pour l'acylghréline et 3,30% et 2,90% pour la des-acyghréline.

Les concentrations plasmatiques d'IGF-1 ont été déterminées avec des kits Quantikine Immunoassay kits (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). Les coefficients de variations inter et intra-assays étaient de <4,1% et <4,3% respectivement.

Les concentrations plasmatiques de GH ont été mesurées par ELISA sandwich adapté de Steyn *et al.*, (2011). Le sang (4µl) a été collecté à partir de la veine caudale, homogénéisé dans 116µl de tampon PBS-Tween (1X 0,05% Tween) et congelé à -20°C jusqu'au dosage de la GH. Un anticorps de capture anti-rGH-IC-1 (AFP411S) produit chez le singe et un anticorps de détection anti-rGH produit chez le lapin (AFP5672099) avec une dilution finale de 1:40 000. La GH de rat (rGH-RP2) a été utilisée comme standard. Les coefficients de variations inter et intra-assays étaient de 5%.

2.4. Mesure de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel.

Les ARN totaux ont été extraits des hypothalamus selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987). Une fois précipités dans l'isopropanol et centrifugé (14 000 rpm, 15 min, 4°C Centrifugeuse 5414 R, Eppendorf, Hamburg, Allemagne), les ARN précipités sont rincés à l'éthanol 75%. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les culots mis à sécher puis repris dans de l'eau distillée. La concentration en ARN est mesurée à 260nm au Nanodrop (ND-2000, Thermo Scientific, Waltham, USA). Pour chaque échantillon, le

volume d'ARN nécessaire pour obtenir 2µg est complété par de l'eau distillée afin d'atteindre un volume de 11µl pour réaliser la reverse transcription. Les ARN ont été RNA transcript en ADNc en utilisant l'enzyme SuperScript III (Invitrogen, Thermo Scientific, Waltham, USA). La PCR en temps réel a été réalisée sur des plaques 96 puits (TEBU Science, Le Perray-en-Yvelines, France) en utilisant le mix SyberGreen (2X, Roche, Diagnostics, Meylan, France) auquel est ajouté les amorces des gènes d'intérêts. L'amplification a été réalisée en utilisant un Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisé comme contrôle interne pour normaliser l'expression des gènes et le $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et Schmittgen, 2001) représente le facteur de variation de l'expression génique. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le Dr C Rovère et Ophelia Le Thuc (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire -IPMC, CNRS-UMR 7275, Valbonne, France).

2.5. Dosage des monoamines et leurs métabolites par HPLC.

La détermination du contenu en dopamine, sérotonine et de leurs métabolites, acide 3,4-Dihydroxyphenylacétique (DOPAC), acide homovanillique (HVA) et d'acide 5 hydroxy indole acétique (5HIA), a été réalisée par dosage HPLC en collaboration avec le Dr N Rouaix (CBP, Lille, France). Les échantillons de noyaux accumbens/striatum et de VTA/SN de chaque groupe ont été homogénéisés dans une solution d'acide perchlorique (0,1M), du sulfite de sodium (Na_2SO_3 2,6 mM) et d'Éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA 0,7 mM). Du 3,4-dihydroxybenzilamine (DHBA, 25 ng/ml) a été ajouté comme standard interne. Un aliquot de 50µl de solution d'homogénéisation a été utilisé par mg de tissu. Les échantillons ont été centrifugés 10 min (16 000g à 4°C) et le surnageant a été récupéré pour des analyses ultérieures. Les surnageants ont été injectés dans un système HPLC. La dopamine et la DOPAC ont été séparées en utilisant une colonne Chromsystems 6100 (Chromsystems Instruments & Chemicals, Gräfelfing, Allemagne), suivi par élution avec la phase mobile Chromosystems (ref. 5001). Le HVA a été séparé en utilisant une colonne Uptishère (Interchim, Montluçon, France), suivi par élution avec une phase mobile formée de monosodium phosphate (21,7 mM), d'EDTA (0,14 mM), de pic B7 (Waters, Guyancourt, France) et 5% de méthanol, le pH a été ajusté à 3,5. Pour les mesures de sérotonine et de 5HIA, les injections et les séparations ont été réalisées sur une colonne Novapack C18 (Waters, Guyancourt, France) et élution par une phase mobile une phase mobile formée de monosodium phosphate (21,7 mM), d'EDTA (0,14 mM), de pic B7 (Waters, Guyancourt, France) et 10% de méthanol, le pH a été ajusté à 3,5. Les effluents des colonnes ont été détectés par un détecteur colorimétrique Coulochem III (ThermoFisher,

Illkirch, France). Les pics ont été enregistrés et intégrés par un logiciel informatique Empower (Waters, Guyancourt, France).

2.6. Immunohistochimie et observation microscopique

Des coupes frontales de cerveau de 40 μm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome à congélation (SM2010 R, Leica Microsystems, Nanterre, France), rinçées dans du tampon phosphate salin (PBS) et placées dans une solution de stockage (10% PBS, 30% glycérol, 30% éthylène glycol). Ces coupes ont ensuite été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Pour détecter l'activation neuronale, suite à l'injection intrapéritonéale de solution ghréline (2mg/kg, Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, USA) ou de solution saline (NaCl 0,9%), les coupes flottantes ont été traitées par immunohistochimie. Les coupes ont été rinçées dans une solution tampon potassium phosphate salin (KPBS 0,2M) puis incubées 1h à température ambiante dans un tampon de blocage (2% Normal Goat Serum, 0,3% Triton 100X dans du KPBS 0,2M) et incubées 48h à 4°C avec un anticorps « Rabbit anti-cFos » (1:5000 Sc-52, Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, USA). Les coupes ont ensuite été rincées dans du KPBS (0,2M), puis incubées 90 min à température ambiante dans l'anticorps biotinylé « goat anti-rabbit » (1:500 Jackson Laboratory, Sacramento, USA) et incubées 90 min à température ambiante avec la « Streptavidin horseradish peroxidase conjugate » (1:200 Jackson Laboratory, Sacramento, USA). La révélation a été réalisée à l'aide d'un kit DAB (Vector laboratories, Eurobio/ABCYS, Les Ulis, France). Les coupes ont été montées sur lame gélatinées, puis déshydratées par des bains d'alcool croissants et de xylène, puis montées entre lame et lamelle en utilisant une résine Eukitt (Dutscher, Brumath, France). La quantification des neurones immunoréactifs pour la protéine Fos a été faite unilatéralement dans le noyau arqué, le noyau paraventriculaire et l'aire hypothalamique latérale sur des coupes comprises entre les bregma -0,58 à -1,94 (Franklin et Paxinos, 1997) à l'aide d'un microscope Zeiss Axio Imager Z1 (CarlZeiss, LePecq, France) et sous un grossissement 40.

2.7. Représentations graphiques et analyses statistiques.

Tous les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Sigmaplot (Systat Software, San Jose, USA). Les représentations graphiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.01 (Abacus Concepts, Berkley, USA). Les tests de normalité et d'équivalence à la variance ont été effectués en utilisant les tests statistiques adéquats. Selon les situations, des three-way ANOVA ou des two-way ANOVA suivis par un test post-hoc Bonferroni ou un ANOVA non

paramétriques suivi par un test post-hoc Tukey ont été utilisés lorsqu'ils étaient appropriés. Des tests de corrélation de Pearson ont été appliqués entre les concentrations de GH et de glucose sanguines. Les aires sous la courbe (AUC) ont été calculées en utilisant la méthode trapézoïdale. La significativité a été fixée à $p < 0,05$ et les effets d'interactions ont été indiqués sur les figures.

III. Résultats

3.1. Expérience 1 : Impact de la ghréline sur l'axe somatotrope

3.1.1. Variation des concentrations plasmatiques de la ghréline au cours de la journée

Après 14 jours de protocole, les souris des groupes FR et FRW présentent une augmentation significative des concentrations circulantes de ghréline aussi bien le matin que l'après-midi (**Fig. 3**).

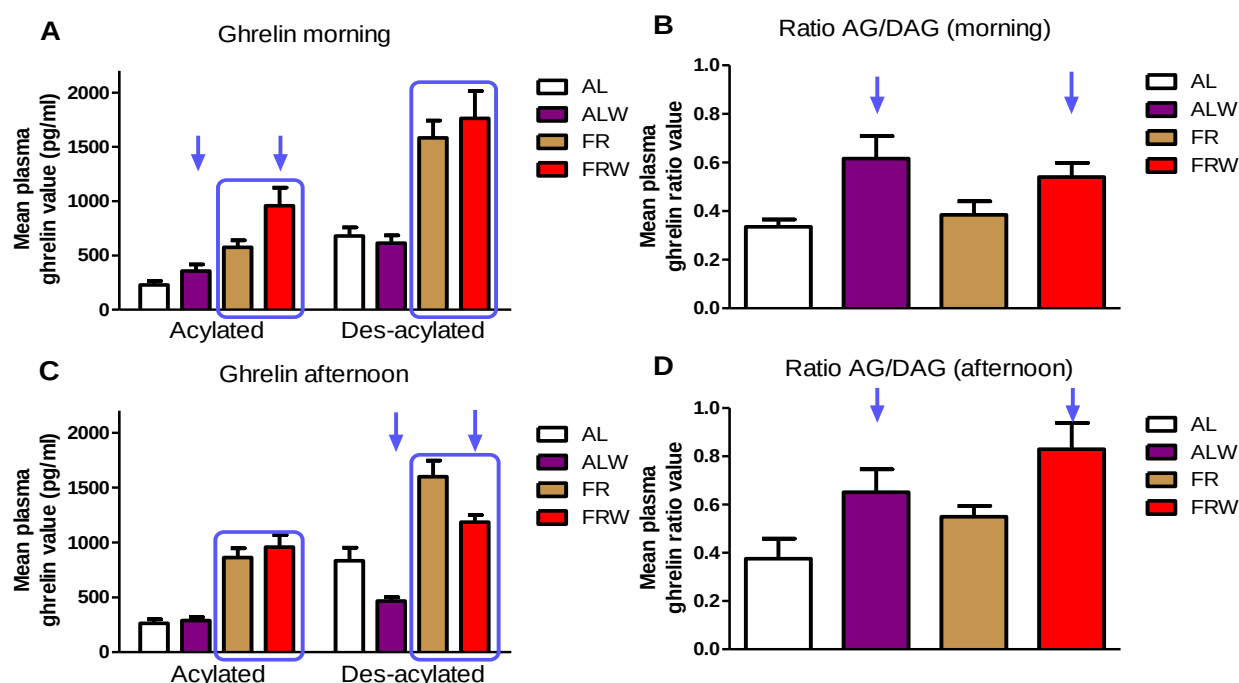


Figure 3 Measures of plasma ghrelin secretion in basal conditions. Acyl ghrelin and des-acylghrelin levels were measured by enzyme immunoassay (EIA) in the morning (**A**) and the afternoon (**B**). These values were used to calculate acyl-ghrelin on des-acylghrelin (**B** and **D**). Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Tukey post-hoc test. Blue squares indicate a food effect and blue arrows indicate an activity effect $p < 0.05$. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 6$ /group.

Ainsi, le matin nous avons observé une augmentation significative des concentrations plasmatiques de ghréline aussi bien sous la forme acylée (effet activité $F_{1-26} = 6,24$, $p < 0,05$; effet restriction $F_{1-26} = 21,48$, $p < 0,001$) que la forme des-acylée (effet restriction $F_{1-26} = 36,82$, $p < 0,001$) par rapport aux groupes placés en conditions *ad libitum* AL et ALW ($p < 0,05$) (**Fig. 3 A**). L'après-midi, avant la distribution du repas, les groupes FR et FRW présentent des concentrations plasmatiques plus importantes d'acylghréline : (effet restriction $F_{1-25} = 60,68$, $p < 0,001$) et de des-acylghréline (effet de l'activité $F_{1-26} = 15,16$, $p < 0,001$; effet restriction $F_{1-26} = 54,74$, $p < 0,001$) que les groupes AL et ALW (**Fig. 3 C**). Le ratio « forme acylée sur forme

des-acylée » est significativement plus élevé pour les groupes qui ont une activité physique (ALW et FRW) par rapport aux groupes AL et FR (matin: effet de l'activité $F_{1-26} = 10,43$, $p < 0,01$; après-midi: effet de l'activité $F_{1-25} = 9,44$ $p < 0,01$) (**Fig. 3 B et D**). Au vu de ces résultats, il apparaît clairement que la restriction alimentaire induit une augmentation des concentrations plasmatiques de ghréline, mais que l'activité physique module également la sécrétion de cette hormone avec au final des proportions plus élevées d'acyl-ghréline chez les souris ALW et FRW.

3.1.2.Impact du protocole sur l'axe somatotrope : sécrétion de GH et d'IGF-1

En parallèle, la GH a été mesurée dans les différents groupes (**Table 1**).

Time	AL	ALW	FR	FRW
GH morning (ng/ml)	5,53 ± 2,45	1,67 ± 0,54*	0,50 ± 0,35*	1,53 ± 0,29
GH afternoon (ng/ml) a	2,94 ± 0,95	0,85 ± 0,53	1,76 ± 0,83	0,85 ± 0,22

Table 1 Measure of mean GH secretion in four groups in basal conditions. Samplings were made in the morning between 9:00 and 11:00 and the afternoon between 16:00 and 18:00 before food distribution in FR and FRW groups. Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Tukey post-hoc test. Data represent mean ± SEM n ≥ 6/group. **a** physical activity effect ; $p < 0.05$ * AL vs. ALW or FR

La restriction alimentaire induit une diminution de la concentration sanguine de GH (effet restriction $F_{1-43} = 4,66$, $p < 0,05$) chez les souris FR par rapport aux souris AL ($p < 0,05$) uniquement le matin. L'après midi, les concentrations de GH sont significativement plus basses chez les souris qui ont une activité physique (ALW et FRW) que les souris AL et FR (effet activité $F_{1-43} = 4,82$, $p < 0,05$) La sécrétion de la GH étant pulsatile, nous avons entrepris de mesurer sa sécrétion sur un intervalle de temps donné de 6h (cf. procédures expérimentales **Fig. 1**). Le choix de cette fenêtre temporelle repose sur le fait que plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer la sécrétion de GH. Parmi ces facteurs, on trouve la ghréline, l'activité physique, l'état de la balance énergétique, ou encore le stress.

Les mesures effectuées dans les différents groupes montrent un maintien de la pulsatilité dans les différents groupes (**Fig. 4**). Toutefois, il apparaît un pic important de sécrétion de GH suite au retour de l'alimentation dans les groupes FR et FRW (**Fig. 4 et 5**). Ce pic quasi synchrone chez ces souris est significativement plus élevé par rapport aux groupes AL et ALW (effet restriction $F_{1-20} = 19,80$, $p < 0.001$). Les mesures des aires sous les courbes réalisées en prenant en compte l'ensemble des points a montré une tendance à une augmentation de la sécrétion de GH chez souris FR et FRW (**Fig. 6 A**) (effet restriction $F_{1-20} = 4,34$ $p = 0,050$) (**Fig. 6 B**).

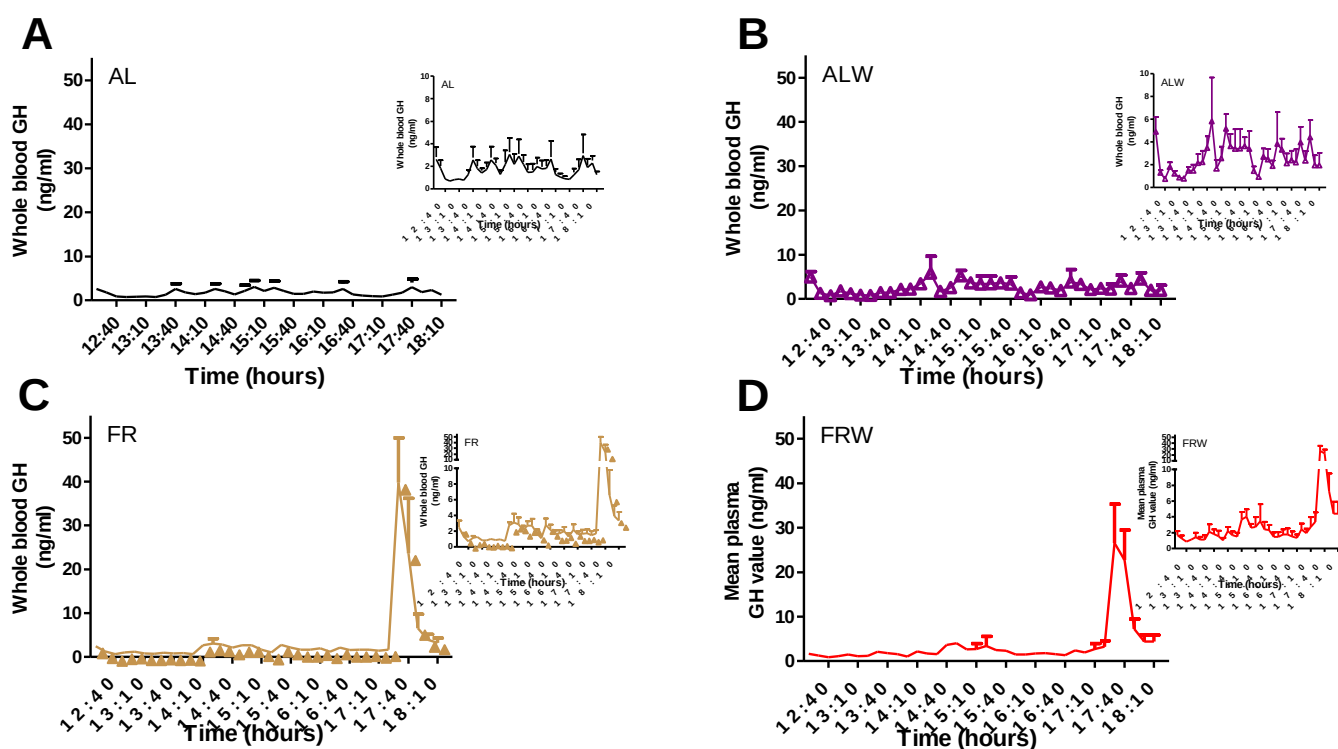


Figure 4 Plasma measures of mean GH secretion in four groups in basal conditions. Whole blood GH was measured during 6h in AL (A), ALW (B), FR (C) and FRW (D) groups from blood sampling collected at 10 min intervals between 12:00 and 18:00 at the end of food restriction protocol. GH secretion in FR and FRW mice was characterized by a huge GH peak following the food distribution. FR and FRW groups received the same quantity of food (3,5g per cage) at 17:10. Data represent mean $\pm$ SEM $n = 6$ /group.

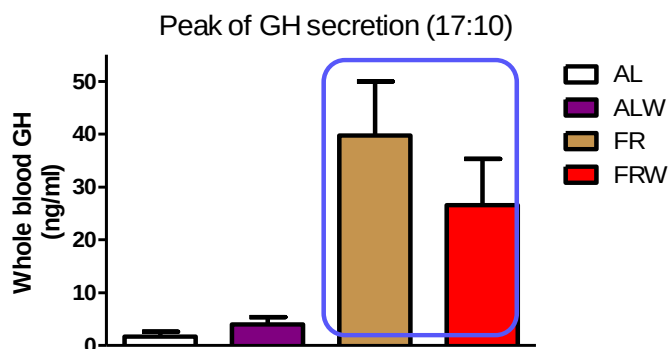


Figure 5 Measure of blood GH in four groups extract from pulsatility secretion. GH measure 10 minutes after the food distribution displayed a huge peak only in FR and FRW groups. FR and FRW groups received the same quantity of food (3,5g per cage) at 17:10. Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Tukey post-hoc

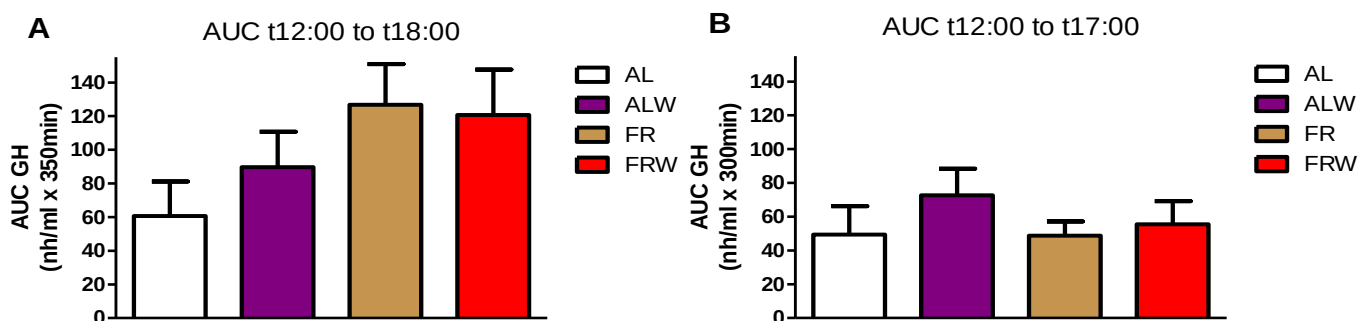


Figure 6 Area under curve from GH assays. **A**: all points of measurement were used to calculate AUC from the beginning to the time before distribution of food ; **B**: all points of measurement excepted those before food distribution were used to calculated AUC. AUC were calculated from trapezoidal method. Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Tukey post-hoc test. Square indicates a food effect. Data represent mean $\pm$ SEM n = 6/group.

Afin de compléter l'investigation de l'axe somatotrope, les concentrations plasmatiques d'IGF-1 ont été mesurées à l'issue du protocole (**Fig. 7**). Il est apparu que seul le groupe FRW

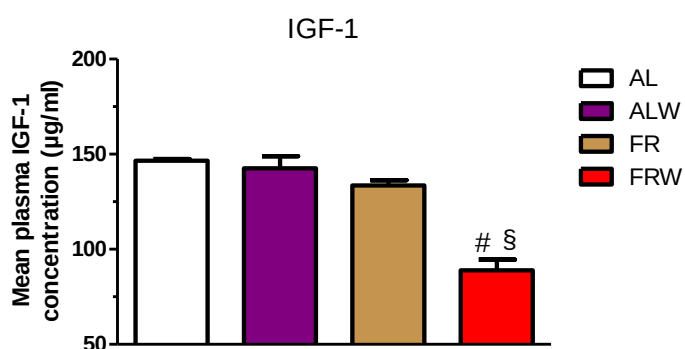


Figure 7 Measures of plasma IGF-1 levels. The day before blood collection, mice received the same quantity of food and they were sacrificed by anesthesia. Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Tukey post-hoc test. Data represent mean $\pm$ SEM n $\geq$ 5/group. p < 0.05 # ALW vs. FRW; § FR vs. FRW.

présente des niveaux plasmatiques plus faibles de d'IGF-1 par rapport aussi bien aux souris ALW qu'aux souris FR (effet restriction $F_{1-19} = 36,49$, $p < 0,001$; effet activité $F_{1-19} = 20,62$, $p < 0,001$; interaction restriction x activité $F_{1-19} = 14,93$, $p < 0,001$).

Comme indiqué dans l'introduction générale, la ghréline est impliquée dans le maintien de la glycémie de part ses actions stimulatrices sur la sécrétion de GH qui à son tour intervient dans le métabolisme lipidique et glucidique afin de participer au maintien du niveau de glycémie.

3.1.3. Impact sur la glycémie

De par les actions hyperglycémiantes de la ghréline et de la GH, nous avons mesuré les concentrations sanguines de glucose (**Table 2**). Comme pour la ghréline et la GH, des mesures ponctuelles ont été réalisées le matin et l'après-midi. Une diminution significative de la glycémie dans les 2 groupes FR et FRW est notée (matin ; effet restriction $F_{1-67} = 73,40$, $p < 0,001$; après-midi $F_{1-57} = 116,11$, $p < 0,001$) par rapport aux groupes AL et ALW. A noter que bien que la glycémie apparait plus élevée l'après-midi chez les souris FRW par rapport aux souris FR, aucune différence significative n'a été notée.

Time	AL	ALW	FR	FRW
Glycemia morning (mg/dl) b	137,59 ± 7,83	129,39 ± 5,52	86,67 ± 3,63	84,61 ± 4,79
Glycemia afternoon (mg/dl) b	153,27 ± 10,78	152,21 ± 7,18	82,42 ± 2,46	98,53 ± 4,04

Table 2 Measure of blood glycemia in four groups in basal conditions. Samplings were made in the morning between 9:00 and 11:00 and the afternoon between 16:00 and 18:00 before food distribution in FR and FRW groups. Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Tukey post-hoc test. Data represent mean ± SEM n ≥ 11/group. **a** physical effect **b** food effect ; $p < 0.05$ * AL vs. ALW or FR

Bien qu'une partie des mesures des concentrations plasmatiques ait été réalisée de manière concomittante, il n'est pas apparu de lien clair entre les niveaux élevés de ghréline et les concentrations sanguines de GH sur celles de la glycémie. Au vu de tels résultats, et sachant que la ghréline a déjà été utilisée en clinique sur des patients AM, nous avons souhaité valider l'impact d'une dose supraphysiologique de ghréline acylée sur l'évolution de la GH et de la glycémie.

3.1.4. Effet de la ghréline sur la sécrétion de GH et sur la glycémie

a) Sécrétion de GH

Pour essayer de distinguer les effets propres de la ghréline de ceux de la nourriture sur la sécrétion de GH, les souris des quatre groupes ont reçu la même quantité de nourriture (4g) la veille de l'injection. Suite à l'injection réalisée le matin, les souris ont eu un accès libre à la

nourriture. Les analyses statistiques ont révélé que la mise à disposition de croquettes suite à l'injection ip de solution saline a entraîné une augmentation significative des concentrations plasmatiques de GH (effet accès à la nourriture $F_{2,56} = 13,074$, $p < 0,001$) (**Fig. 8 A**). Cette augmentation est influencée aussi par les conditions dans lesquelles les souris ont été maintenues. En effet, il a été observé des concentrations plus élevées dans les groupes ALW et FRW (effet activité $F_{1,56} = 7,96$, $p < 0,01$). De même, la restriction alimentaire participe à l'augmentation de la sécrétion de GH (effet restriction $F_{1,56} = 10,08$, $p < 0,05$). Le même type de résultats a été observé avec les calculs d'AUC. Toutefois, aucune interaction entre l'activité et la restriction n'a été observée ($F_{1,56} = 3,34$, $p = 0,085$). L'injection ip de ghréline (2mg/kg) entraîne une augmentation des concentrations de GH significativement plus importante que lors de l'injection de saline à t15min ($p < 0,05$) (**Fig. 8 B**) (augmentation d'un facteur 100 chez les AL et FR et d'un facteur 50 à 60 pour ALW et FRW respectivement). Les souris FR et FRW répondent donc de manière similaire aux groupes AL et ALW à une injection de ghréline laissant supposer un système ghrélinergique central intact

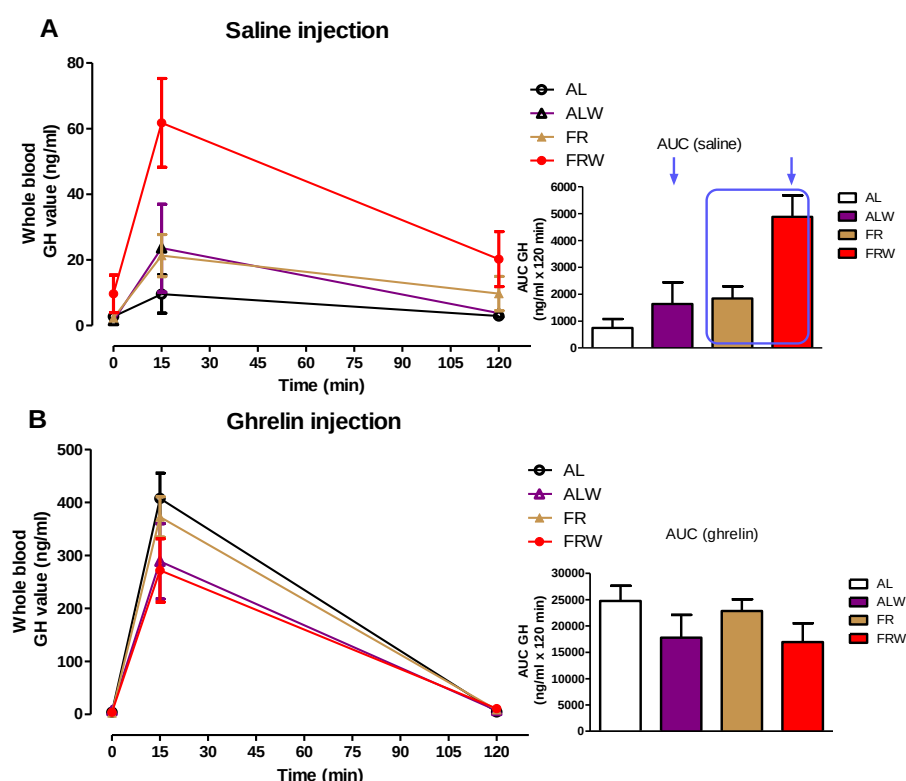


Figure 8 Measures of mean GH plasma concentrations following saline or ghrelin ip injections. Samplings were done before the injection, 15 and 120min after saline (A) or ghrelin (B) injection. Areas under curves were calculated from whole blood GH measures. Differences were tested by a Three-way ANOVA following by a Tukey post-hoc test and by a Two-way ANOVA following by a Tukey post-hoc test for whole blood GH value and AUC respectively. **Squares** indicate a food effect and **Arrows** indicate an activity effect $p < 0,05$. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 6$ /group.

Il serait intéressant de réaliser le même type d'injection de ghréline mais cette fois sans accès

libre aux croquettes afin de déterminer si la ghréline a un effet synergique avec le retour de la nourriture sur les augmentations de niveaux de GH.

b) Glycémie

Des mesures de la glycémie ont été effectuées en même temps que les prélèvements pour la GH (**Fig. 9**). Comme pour la GH, le retour de l'alimentation suite à l'injection de solution saline est associé à une augmentation de la glycémie (effet accès à la nourriture $F_{2-60} = 11,44$, $p < 0,001$). Dans ces conditions, il a également été noté que les groupes disposant d'une roue d'activité ALW et FRW présentent des glycémies plus faibles que les groupes en cage classique (effet activité $F_{1-60} = 5,05$, $p < 0,05$) (**Fig. 9 A**).

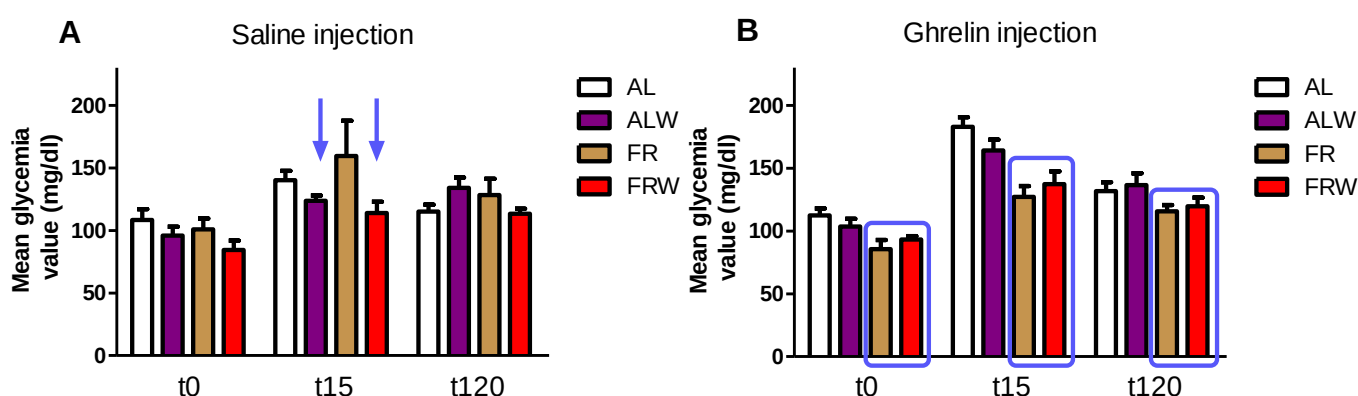


Figure 9 Measures of glycemia in four groups in basal conditions. Differences were tested by Two-way ANOVA following by a Tukey post-hoc test for whole blood GH value and AUC respectively. Squares indicate a food effect. Arrows indicate activity effect Data represent mean $\pm$ SEM $n = 6$ /group.

L'injection i.p. de ghréline, révèle également un effet de l'accès à la nourriture sur la glycémie ($F_{2-60} = 54,21$, $p < 0,001$) mais cette fois il n'y a plus d'effet de l'activité physique sur les concentrations mesurées. En revanche, les groupes soumis à la restriction alimentaire affichent des concentrations plus faibles de t0 à t 120 min par rapport aux groupes contrôles (effet restriction $F_{1-60} = 35,95$, $p < 0,001$; **Fig. 9 B**).

Les calculs de corrélation à t15min entre les niveaux sanguins de glucose et de GH ont révélé une absence de corrélation chez les animaux qui ont été soumis à une injection de solution saline alors que chez les animaux ayant reçu une injection de ghréline seules les souris FR présentent une tendance ($r=0.766$, $p = 0,07$). Afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats, il faudrait augmenter le nombre d'animaux et ainsi augmenter la puissance statistique. Ces

données laissent à penser que la GH interviendrait dans la régulation de la glycémie dans les cas de restriction alimentaire.

3.1.5. Conclusion/discussion

En résumé, les résultats obtenus montrent de nombreuses similitudes entre ce qui est observé chez les patients anorexiques et notre modèle FR/FRW.

Comme ce qui est retrouvé chez les patients anorexiques, les souris FR et FRW montrent des augmentations des concentrations plasmatiques de ghréline. Ces augmentations concernent aussi bien la forme acylée que la forme des-acylée et ce aussi bien après la période d'alimentation normale (le matin) qu'avant la distribution de la nourriture (le soir). L'activité physique avec ou sans restriction alimentaire influence également le ratio forme acylée sur forme des-acylée de la ghréline dans le sens d'une augmentation. Il n'existe pas de données claires dans la littérature sur ce type de modifications. Alors que chez les patients un état de résistance hépatique à la GH a été décrit avec des niveaux élevés de GH associés à une réduction de l'IGF-1 circulante, de telles altérations n'ont pas été observées dans nos expériences. Pour la GH, aucune différence significative n'a été notée entre les différents groupes en dehors de la période d'alimentation. De plus, seules les souris FRW présentent une réduction des concentrations plasmatiques d'IGF-1. Nos données montrent également que la prise alimentaire influence fortement la sécrétion de GH avec l'observation d'un pic notable durant le repas plus important chez les souris FR et FRW. Un dernier point essentiel de cette série d'expériences correspond à la glycémie, souvent utilisée comme témoin de déséquilibre de la balance énergétique. La restriction alimentaire avec ou sans activité motrice a entraîné une diminution de la glycémie aussi bien le matin que l'après-midi. Toutefois, même si les valeurs observées de glycémie apparaissent plus faibles que dans les groupes contrôles, elles n'atteignent pas des valeurs extrêmes qui signent un état hypoglycémique sévère (en dessous de 70mg/dl et en dessous de 50mg/dl les souris sont hypotoniques).

GH et IGF-1. Alors qu'il a été démontré que la mise à jeun chez le rongeur entraîne une diminution de la sécrétion et de la pulsativité de la GH (Tannenbaum *et al.*, 1979; Steyn *et al.*, 2011), nos résultats ne paraissent au final pas aussi tranchés. En effet, certaines études montrent comme chez l'Homme une augmentation des concentrations circulantes de GH (Luque *et al.*, 2007 ; Zgheib *et al.*, 2014). Toutefois, l'ensemble de ces études se distingue par le fait que les conditions de prélèvement appliquées ne sont pas les mêmes que celles utilisées dans notre protocole avec par exemple une limitation du temps d'accès à la nourriture (Zgheib *et al.*, 2014) ou des jeûnes plus ou moins prolongés de 12h à 48h (Luque *et al.*, 2007 ; Steyn *et*

al., 2011). Comme nous l'avons vu dans notre étude, le moment auquel le prélèvement est effectué est également susceptible d'influencer les résultats obtenus. Ainsi sur un prélèvement unique le matin, nous avons observé une diminution de la sécrétion de GH chez les souris FR, alors que l'après-midi nous avons montré un effet de l'activité physique. Il apparaît clairement que l'état de la balance énergétique influence la sécrétion de GH. En effet, le retour de la nourriture chez les souris FR et FRW a entraîné un pic de sécrétion important non retrouvé avec une telle ampleur chez les souris AL et ALW. Nous avons observé une diminution des concentrations plasmatiques d'IGF-1 seulement dans le groupe FRW après 15 jours de protocole. Une telle diminution a également été observée dans le groupe FR après 55 jours de protocole (données non présentées) suggérant qu'il y a probablement un certain seuil de poids corporel ou de réserves lipidiques à atteindre avant de voir un impact sur la sécrétion d'IGF-1. Chez les patients AM, il a été décrit un état de résistance hépatique à la GH qui serait responsable de l'absence de sécrétion d'IGF-1 (Germain *et al.*, 2007). Le facteur de croissance FGF-21 interviendrait dans cette résistance en réduisant l'expression de STAT5, le médiateur majeur des actions de la GH (Inagaki *et al.*, 2008). De plus, il a été montré un lien clair entre le FGF-21 et le jeûne. Ce facteur de croissance intervient dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique (Potthoff *et al.*, 2009). Afin d'élucider les différences de résultats obtenus entre les patients AM et les souris FR/FRW, l'étude de l'expression hépatique de FGF-21 apporterait des indications complémentaires sur la dérégulation GH-IGF-1. Ce point reste donc à investiguer dans notre protocole, pour déterminer l'implication de ces protéines dans la diminution de la glycémie observée chez les souris FR et FRW.

Ghréline, GH et Glycémie. La ghréline a longtemps été suspectée comme responsable de l'augmentation de la sécrétion de GH qui interviendrait à son tour dans la métabolisme glucidique (Goldstein *et al.*, 2011). Un tel lien n'a pas été observé dans notre protocole. En effet, alors que les souris FR et FRW présentaient des concentrations plasmatiques plus élevées de ghréline, aucune augmentation particulière de GH n'a été observée, sauf au moment de la distribution de la nourriture. Il a été montré qu'en condition *ad libitum*, la ghréline est clairement impliquée dans la sécrétion de la GH (Hassouna *et al.*, 2014). Mais les données restent plus conflictuelles lors d'un jeûne ou d'une restriction alimentaire. Ceci est peut être le reflet des différents sites d'action potentielle de la ghréline. Ainsi, elle agit sur les neurones à GHRH et NPY/AgRP de l'ARC, mais aussi sur les neurones SRIF (Luque *et al.*, 2007 ; Veldhuis et Bowers, 2010). La ghréline cible aussi les cellules somatotropes de l'adenohypophyse qui expriment le récepteur GHSR-1a (Reichenbach *et al.*, 2012). Toutefois, d'autres hormones peuvent également influencer la sécrétion de GH hypophysaire telles que

l'obestatine et l'adiponectine qui induisent respectivement une diminution ou une augmentation de la libération de GH (Steyn *et al.*, 2009 ; Luque *et al.*, 2014).

Cependant, comme chez les patients AM et les sujets sains, l'injection de ghréline a un rôle stimulateur sur la sécrétion de GH. En effet, une injection intraveineuse de ghréline entraîne dans l'heure qui suit une augmentation des concentrations plasmatique de GH (Miljic *et al.*, 2006). Dans notre expérience, l'ensemble des groupes a répondu de manière similaire à l'injection intra péritonéale de ghréline avec une augmentation majeure de GH sanguine. De plus, nos résultats semblent indiquer que la sécrétion de GH obtenue suite l'injection contribuerait à la régulation de la glycémie dans les cas de restriction alimentaire seule nous montrons une forte tendance corrélative positive entre la glycémie et la GH suite à l'injection de ghréline pour les souris FR. Bien qu'une étude récente ait montré l'action régulatrice de la ghréline sur la glycémie en faisant intervenir les neurones AgRP de l'ARC (Wang *et al.*, 2013), sans pour autant exclure une intervention de la GH, le lien entre ghréline, GH et glycémie reste à déterminer précisément.

Perspectives : GH, ghréline et prise alimentaire. Différents points restent cependant à finaliser dans cette étude. Il apparait un effet évident du retour de la nourriture sur la sécrétion de GH, en particulier pour les souris FR et FRW dont les concentrations de ghréline sont très élevées par rapport à leurs contrôles respectifs. Il serait intéressant de regarder comment évolue la sécrétion de GH durant toute la période alimentaire associée à une mesure précise au cours du repas. De même, il semble essentiel pour compléter ce point de déterminer dans quelle mesure les différents neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la sécrétion de GH sont impactés par le retour de la nourriture et de vérifier si la ghréline a un potentiel impact. Pour étudier ce dernier point, il faudrait dans un premier temps mesurer les concentrations plasmatiques des différentes formes de cette hormone après la distribution des croquettes et dans un second temps mesurer la sécrétion de GH chez des souris déficientes pour le récepteur de la ghréline afin de déterminer l'implication potentielle de l'acylghréline dans les modifications observées.

Ces données soulignent sur un plan mécanistique l'intrication complexe de la ghréline et de son effecteur principal, la GH, sur la glycémie. L'activité physique semble être un facteur favorisant la forme acylée et un pic accru de GH lors d'une prise alimentaire ponctuelle (le matin). Ces données sont à mettre en parallèle avec le point suivant où les concentrations de GH n'évoluent pas de manière similaire l'après midi, malgré des concentrations de ghréline

inchangées. La pulsativité de la GH semble perturbée chez les animaux FR et FRW pouvant rendre compte des résultats obtenus. L'origine centrale ou périphérique reste à élucider.

3.2. Expérience 2 : impact de la ghréline au niveau central

3.2.1. Impact du protocole court terme sur les peptides orexigènes/anorexigènes de l'hypothalamus

A partir d'une étude pilote (collaboration, Dr I Nilsson, Suède) durant laquelle nous avons mis au point notre protocole, nous avons étudié par immunohistochimie la distribution du neuropeptide AgRP dans l'ARC. En condition basale une accumulation de peptides AgRP au niveau du noyau arqué hypothalamique est observée seulement dans le groupe FRW (**Fig. 10**).

A partir de ce constat, nous avons entrepris de déterminer les neuropeptides potentiellement

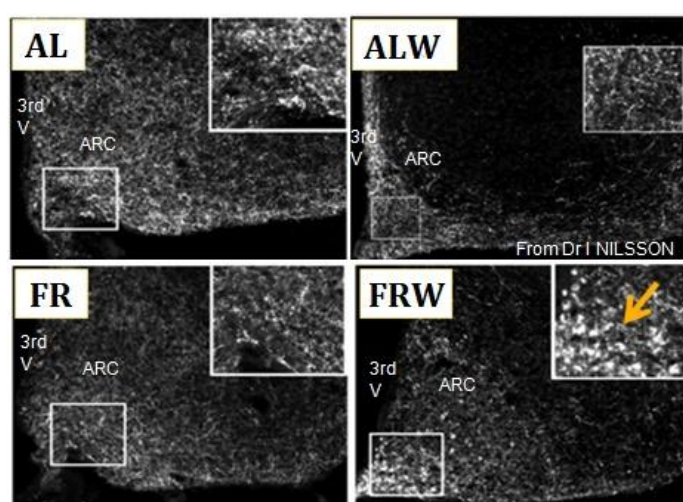


Figure 10 AgRP immunostaining in the arcuate nucleus (ARC) in basal condition. Accumulation of AgRP was observed only in FRW group compared to three other groups AL, ALW and FR at postnatal day 7 in control vs. AgRP. Picture performed from fluorescence microscope Axio skop (Zeiss, Germany) connected to Digital camera (Sony, Japan) (Data from Dr Ida Nilsson)

impliqués dans les adaptations et les altérations observées induites par le protocole de restriction alimentaire, mais aussi dans la mise en place de l'activité anticipatoire à la prise de nourriture. Nous avons mesuré l'expression des principaux neuropeptides hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire le matin, c'est-à-dire après la phase normale d'alimentation des souris et l'après-midi avant le distribution de la nourriture.

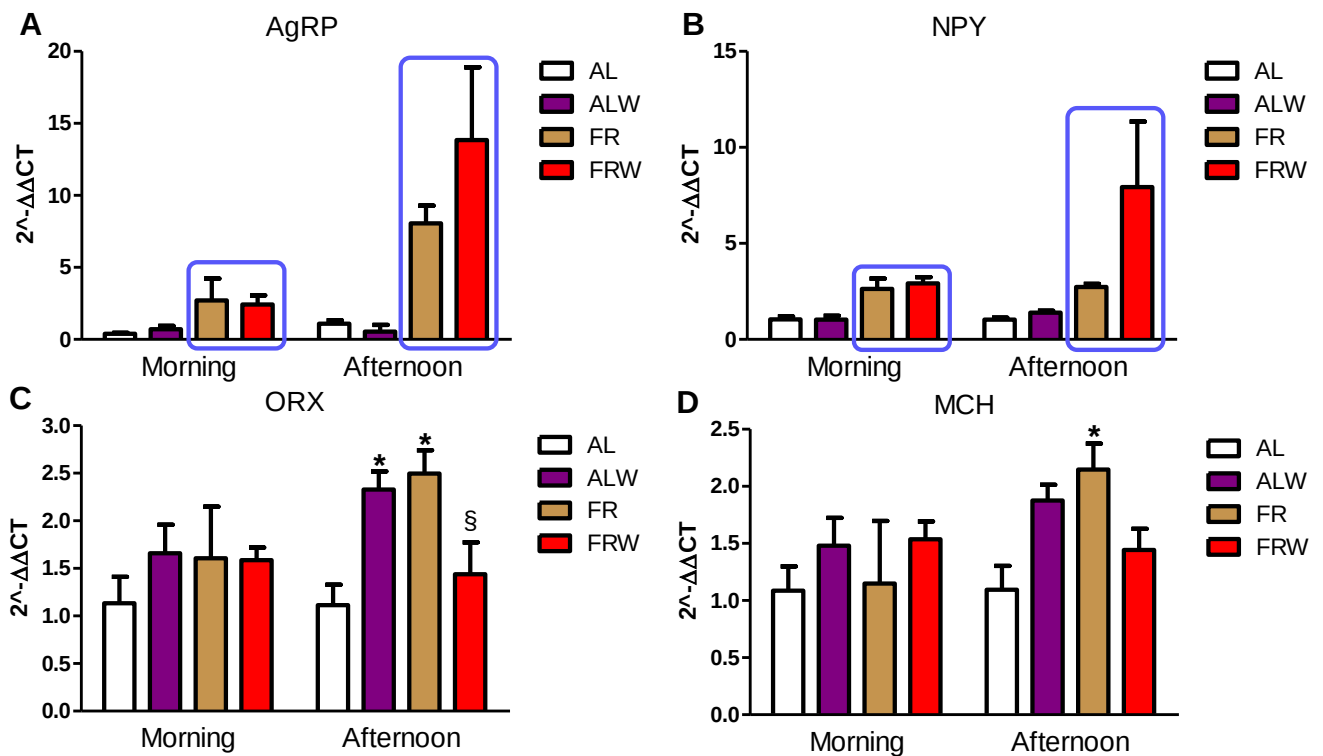


Figure 11 Relative expression of main orexigenic hypothalamic neuropeptides in the morning and the afternoon. Agouti related peptide (AgRP), neuropeptide Y (NPY), prepro-orexin (ORX) and Melanin-concentrating hormone (MCH) expression in the hypothalamus were semi-quantitatively measured by semi quantitative RT-PCR in mice exposed to food restriction protocol (details see material&methods). Analyses were done after 15 days of protocol from samples collected in the morning (between 8:30 and 12:30) and the afternoon (between 16:00 and 18:00). Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Bonferoni or Tukey post-hoc test. Squares indicate a food effect. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 5$ /group. * AL vs ALW or FR; § FR vs. FRW

Ainsi, dès le matin, les souris FR et FRW montrent des niveaux d'expression plus élevés d'AgRP et de NPY (AgRP: effet restriction $F_{1-19} = 5,23$, $p < 0,05$; NPY: effet restriction $F_{1-19} = 24,29$ $p < 0,001$,**Fig. 11 A et B**) par rapport à leur groupes contrôles AL et ALW. En ce qui concerne les deux autres peptides orexigènes, la prepro-orexine et le MCH, aucune différence significative n'a été observée pour ces peptides pour l'ensemble des groupes (**Fig. 11 C et D**). Pour compléter ces résultats, nous avons regardé l'expression des deux principaux peptides anorexigènes à savoir la POMC et le CART. Ainsi, seules les souris du groupe FRW ont présenté une diminution de l'expression de la POMC (effet restriction $F_{1-18} = 17,03$, $p < 0.001$; interaction restriction x activité $F_{1-18} = 4,84$, $p < 0,05$) par rapport aux souris ALW ($p < 0,001$) et aux souris FR ($p < 0,05$) (**Fig. 12 A**). Concernant l'expression de CART, les souris FR présentent une augmentation de leurs niveaux d'expression (interaction restriction x activité $F_{1-19} = 2,39$ $p < 0,05$) par rapport au groupe AL et FRW ($p < 0,05$) (**Fig. 12 B**). Les données obtenues l'après

midi sont différentes sur plusieurs aspects. On retrouve une up-regulation des gènes des peptides de l'AgRP et du NPY (AgRP: effet restriction $F_{1-19} = 19,79$, $p < 0,001$; NPY: effet restriction $F_{1-19} = 7,32$, $p < 0,05$) par rapport aux groupes contrôles AL et ALW (**Fig. 11 A et B**). Pour la prepro-orexine et le MCH, seules les souris FR montrent une augmentation de leur niveaux d'expressions (ORX : interaction restriction x activité $F_{1-20} = 20,37$, $p < 0,001$; MCH: interaction restriction x activité $F_{1-19} = 14,44$ $p = 0,001$) par rapport aux souris AL ($p < 0,05$) (**Fig. 11 C et D**). De plus, les niveaux d'expression de la prepro-orexine du groupe FR sont

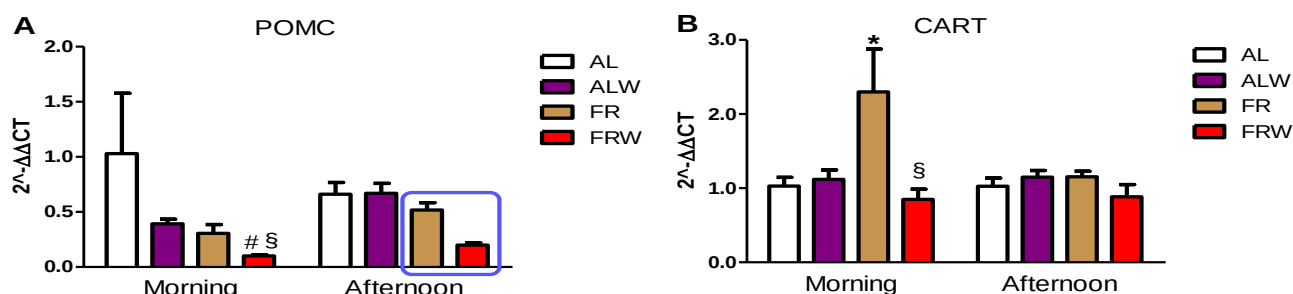


Figure 12 Relative expression of main anorexigenic hypothalamic neuropeptides in the morning and the afternoon. Pro-opiomelanocortin (POMC) and Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) expression in the hypothalamus were semi-quantitatively measured by semi quantitative RT-PCR in mice exposed to food restriction protocol (details see material&methods). Analyses were done after 15 days of protocol from samples collected in the morning (between 8:30 and 12:30) and the afternoon (between 16:00 and 18:00). Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Bonferoni or Tukey post-hoc test. Square indicates a food effect. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 5$ /group. * AL vs ALW or FR; # ALW vs. FRW; § FR vs. FRW

significativement plus élevés que chez les souris FRW ($p < 0,05$) (**Fig. 11 C**). Les souris ALW ont présenté aussi une augmentation de l'expression de ce gène par rapport au groupe AL ($p < 0,05$) laissant supposer une influence de l'exercice sur ce peptide (**Fig. 11 C**).

Pour l'ensemble des groupes, excepté les souris ALW, une augmentation significative de l'expression d'AgRP a été observée entre le matin et l'après-midi ($p < 0.05$). Il semble donc que l'AgRP soit particulièrement impliqué dans la phase d'anticipation à la prise de nourriture et que cette anticipation semble exacerbée par la restriction alimentaire. A partir de ce constat nous avons décidé de nous intéresser plus spécifiquement à cette période et donc de regarder l'expression des récepteurs hypothalamiques du NPY et de l'AgRP (**Fig. 13**), ainsi que les récepteurs à la ghréline (GHSR-1a) et à la leptine (**Fig. 14**).

La différence principale concerne les souris AL et FR et ALW et FRW soulignant le rôle de l'exercice physique dans l'expression de certains récepteurs. Ainsi, le gène codant le récepteur Y1 est moins exprimé chez les souris ALW et FRW (effet activité $F_{1-20} = 11,84$, $p < 0,05$) par

rapport au groupes AL et FR, tout comme l'expression du récepteur Y5. Il est significativement diminué chez les souris ALW par rapport au souris AL (effet activité $F_{1-20} = 29,44$ $p < 0,001$). De plus une action synergique de la restriction alimentaire et de l'activité a été observée chez les souris FRW (interaction restriction x activité $F_{1-20} = 5,34$, $p < 0,05$) dont l'expression de Y5 est diminué par rapport aux groupes ALW et FR ($p < 0,05$). Mais aucune différence n'a été observée quant à l'expression du gène codant le récepteur Y2 (**Fig. 13 A**). De même, l'expression des récepteurs de l' α MSH et de l'AgRP ont été affectés dans les groupes disposant d'une roue. En effet, une down regulation des gènes codant pour le MC3R et pour le MC4R a été observée (MC3R : effet activité $F_{1-20} = 276,23$, $p < 0,001$; MC4R : effet activité $F_{1-20} = 69,63$, $p < 0,001$) par rapport au souris AL et FR ($p < 0,05$) (**Fig. 13 B**).

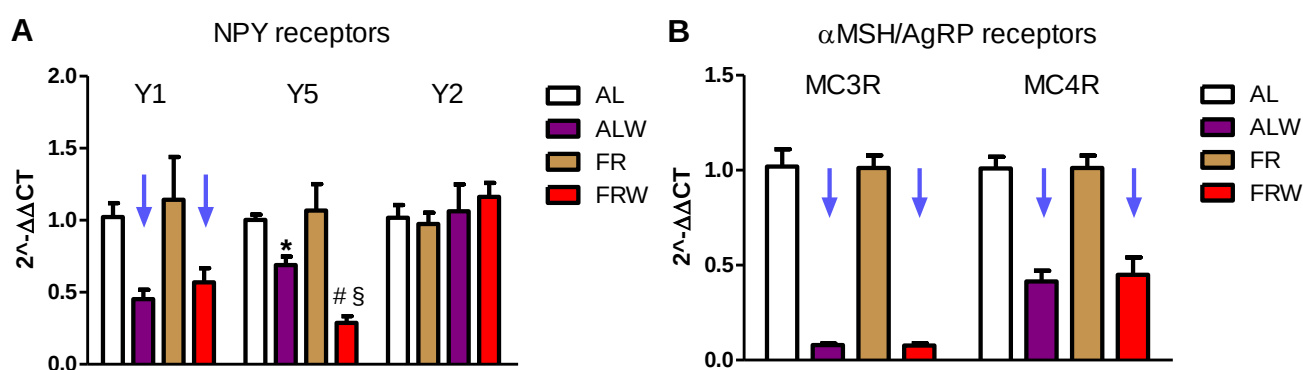


Figure 13 Relative expression of main orexigenic hypothalamic neuropeptide receptors in the afternoon. **A:**NPY receptors Y1, Y2 and Y5 Agouti-related protein, **B:** α MSH/AgRP receptors MC3R and MC4R expression in the hypothalamus were semi-quantitatively measured by semi quantitative RT-PCR in mice exposed to food restriction protocol (details see material&methods). Analyses were done after 15 days of protocol from samples collected in the afternoon (between 16:00 and 18:00). Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Bonferoni or Tukey post-hoc test. Arrows indicate an activity effect. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 5$ /group. * AL vs ALW or FR; # ALW vs. FRW; § FR vs. FRW.

Après 15 jours de protocole, seules les souris FRW présentent une diminution de l'expression du gène du récepteur codant pour la ghréline (interaction restriction x activité $F_{1-20} = 6,53$, $p < 0,05$) par rapport aux groupes ALW et FR ($p < 0,05$) (**Fig. 14 A**). A côté de cela, aucune modification de l'expression du gène du récepteur de la leptine n'a été observée entre les groupes (**Fig. 14 B**).

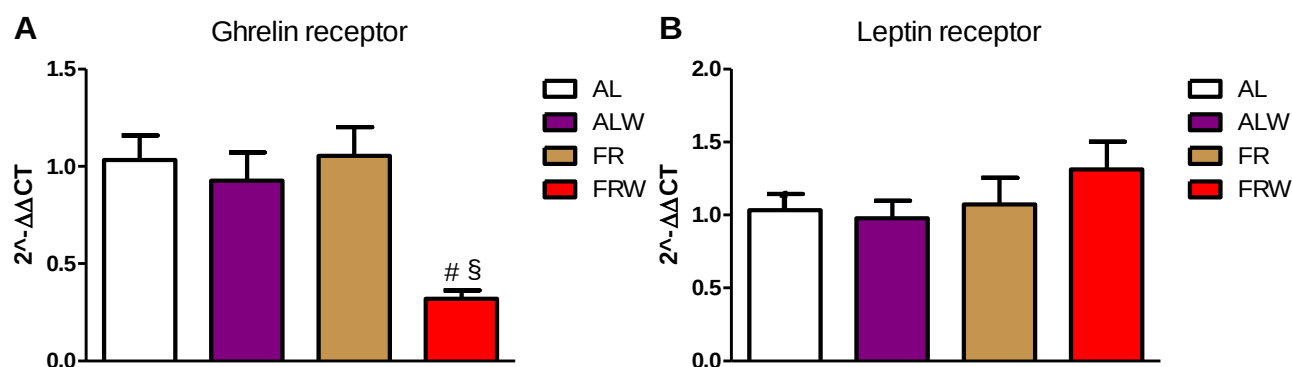


Figure 14 Relative expression of ghrelin and leptin receptors in hypothalamus. GHSR (A) and leptin (B) receptors expression in the hypothalamus were semi-quantitatively measured by semi quantitative RT-PCR in mice exposed to food restriction protocol (details see material&methods). Analyses were done after 15 days of protocol from samples collected in the afternoon (between 16:00 and 18:00). Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Bonferoni post-hoc test. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 5$ /group. $p < 0,05$ # ALW vs. FRW; § FR vs. FRW

3.2.2. Altérations dopaminergiques et sérotoninergiques

Pour compléter ces données et pousser l'investigation plus en profondeur, nous nous sommes également intéressés aux structures impliquées dans le contrôle non homéostatique de la prise alimentaire et sur lesquelles les neurones ORX et MCH projettent. Les structures en question correspondaient à la VTA-substance noire et le noyau accumbens.

Il est apparu une nouvelle fois que l'activité physique associée ou non à la restriction alimentaire a entraîné une augmentation significative du contenu en dopamine de la VTA/substance noire dans les groupes ALW et FRW (effet activité $F_{1-20} = 7,87$ $p < 0,01$) par rapport aux groupes AL et FR ($p < 0,05$) (**Fig. 15 A**). Cette augmentation a été associée à une réduction significative de la DOPAC (effet activité $F_{1-20} = 34,83$, $p < 0,001$) par rapport aux groupes AL et FR ($p < 0,05$) (**Fig. 15 A**). Ces modifications ont été associées à une réduction du turnover de la dopamine toujours dans les groupes ALW et FRW (effet de l'activité $F_{1-20} = 17,48$ $p < 0,001$) par rapport aux groupes AL et FR ($p < 0,05$) (**Fig. 15 C**). Aucune différence significative n'a été notée au niveau des noyaux accumbens principale cible de la VTA (**Fig. 15 B et D**). Toutefois, la comparaison réalisée uniquement entre les groupes FR et FRW, nous laisse supposer que l'activité physique associée à la restriction alimentaire est susceptible d'altérer le turnover dopaminergique au niveau des noyaux accumbens (t-test FR vs. FRW $p = 0,005$) (**Fig. 15 D**) ; ces résultats restant à confirmer ultérieurement.

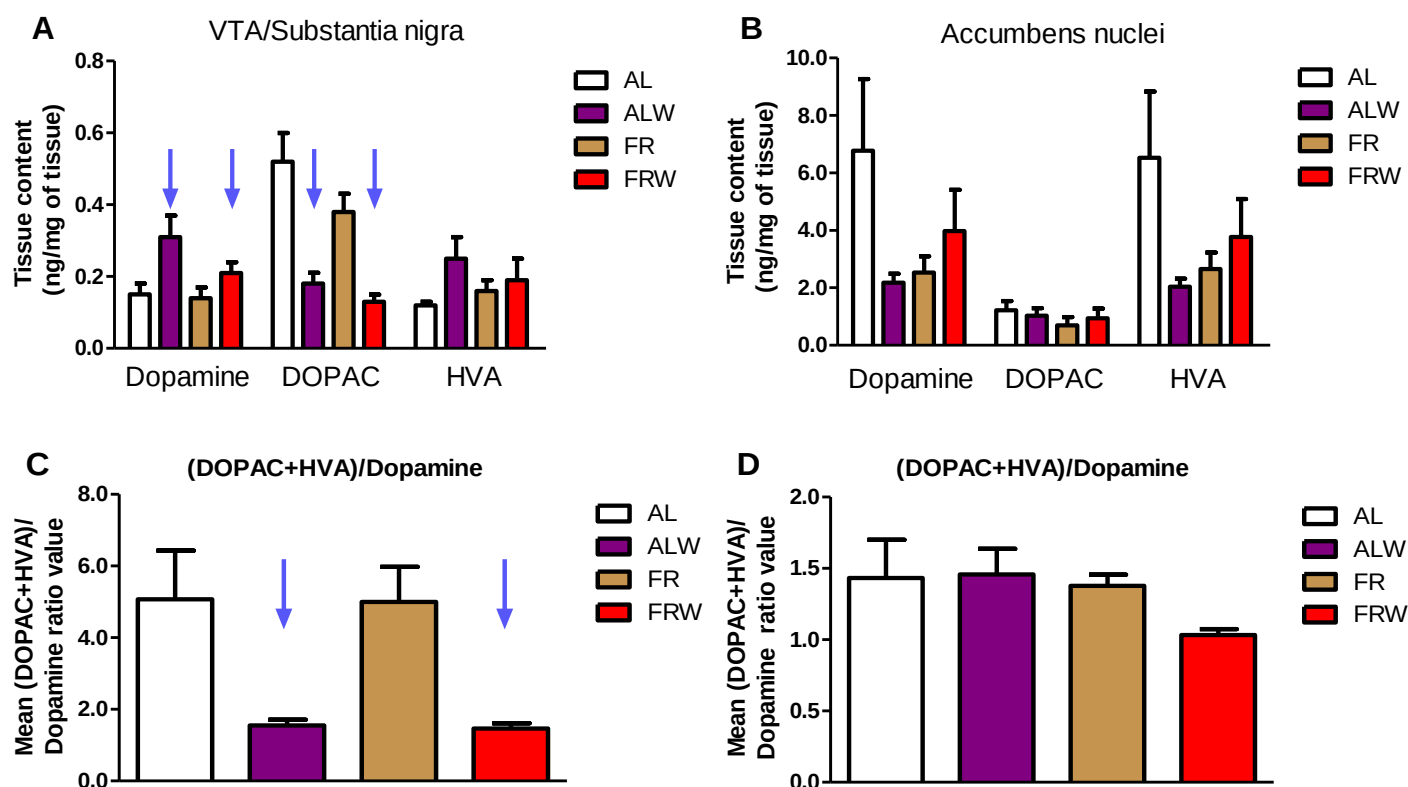


Figure 15 Measure of dopamine and its metabolites (DOPAC and HVA) content by HPLC. Samplings were collected after 15 days of protocol in the afternoon (between 16:00 and 18:00). Measures were made from VTA/substantia nigra (**A**) and Accumbens nuclei (**B**) dissected on ice and immediately frozen in liquid nitrogen. From these measures ratios were calculated (**C and D**). Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Bonferoni or Tukey post-hoc test. Arrows indicate an activity effect. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 5$ /group.

Comme pour la dopamine, l'activité physique a un effet notable sur le contenu en sérotonine de la VTA/substance noire. Il a été observé une augmentation du contenu en sérotonine et une diminution de la quantité de 5HIA chez les souris ALW et FRW (5HT: effet activité $F_{1-20} = 21,86$ $p < 0,001$; 5HIA: effet activité $F_{1-20} = 14.25$ $p < 0,001$) par rapport aux groupes AL et FR ($p < 0,05$) (**Fig. 16 A**). Ces modifications ont été associées à une diminution du turnover de la sérotonine dans les groupes ALW et FRW (effet activité $F_{1-20} = 26,30$, $p < 0,001$) comparativement aux groupes AL et FR ($p < 0,05$) (**Fig. 16 C**). En parallèle, aucune modification notable n'a été observée entre les groupes (**Fig. 16 B et D**).

Ces données supposent un rôle prédominant de l'activité physique, mais aussi de la ghréline sur l'ensemble de ces circuits. Au vu de ces résultats et de l'utilisation potentielle de la ghréline comme traitement de l'anorexie mentale, nous nous sommes posés la question des effets d'une injection aigüe de ghréline par voie intrapéritonéale sur la prise alimentaire et sur

l'activation des régions impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire.

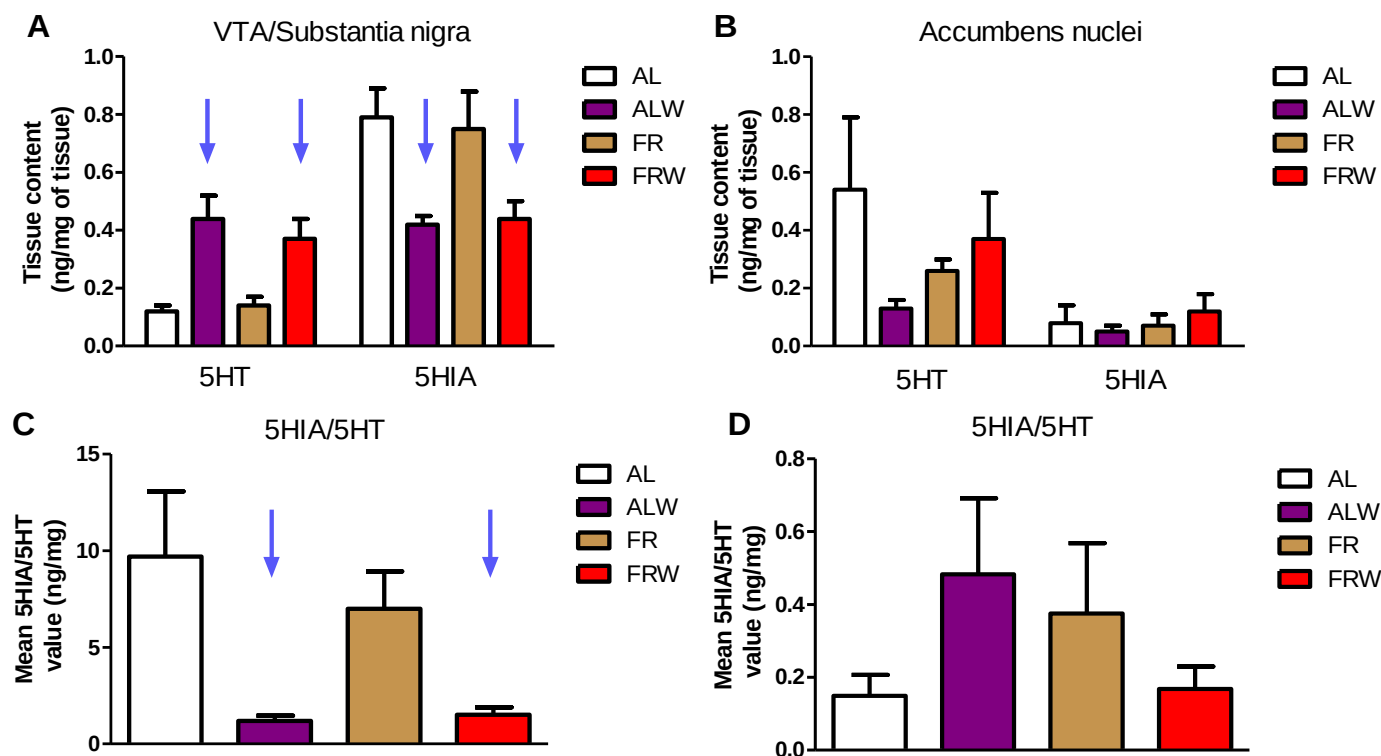


Figure 16 Measure of serotonin (5HT) and 5-Hydroxyindoleacetic acid (5HIA) by HPLC. Samplings were collected after 15 days of protocol in the afternoon (between 16:00 and 18:00). Measures were made from VTA/substantia nigra (A) and Accumbens nuclei (B) dissected on ice and immediately freezed in liquid nitrogen. From these measures ratios were calculated (C and D). Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Bonferoni or Tukey post-hoc test. Arrows indicate an activity effect. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 5$ /group

3.2.3. Effet de la ghréline sur la prise alimentaire et l'activation centrale

A l'issue des deux semaines de protocole, les souris des quatre groupes reçoivent la même quantité de nourriture par cage la veille de l'injection.

a) Prise alimentaire

Les animaux des groupes FR et FRW présentent des prises alimentaires cumulées significativement plus élevées que leur contrôles respectifs AL et ALW ($p < 0,05$) (effet de la restriction $F_{1-8} = 49,86$, $p < 0.001$) suite à l'injection de solution saline (Fig. 17 A) et de ghréline (2mg/KG) (effet restriction $F_{1-8} = 98,55$, $p < 0,001$ effet activité $F_{1-8} = 5,87$, $p < 0,05$, Fig. 17 B).

La comparaison intragroupe pour voir les effets de l'injection de ghréline sur la prise alimentaire ont permis de confirmer son effet orexigène seulement dans le groupe AL. En effet, seuls les animaux de ce groupe ont présenté une augmentation significative de leur prise alimentaire ($p < 0,05$) suite à l'administration de ghréline.

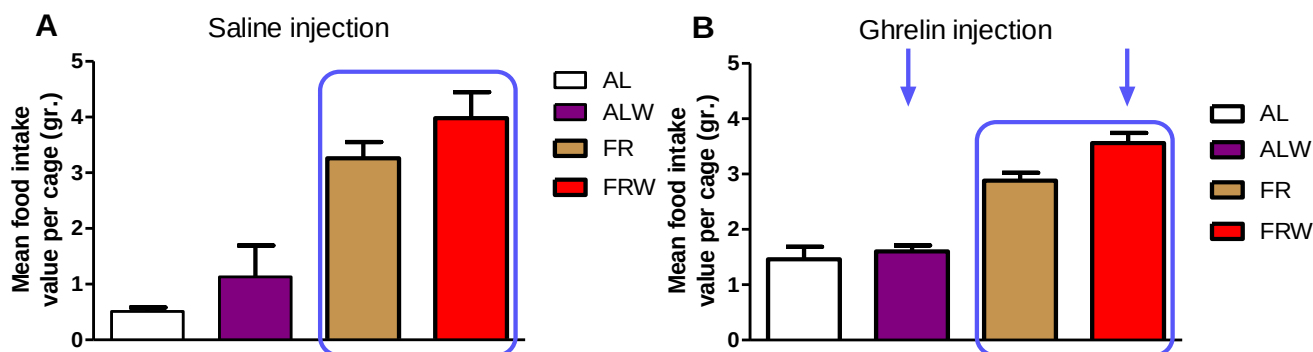
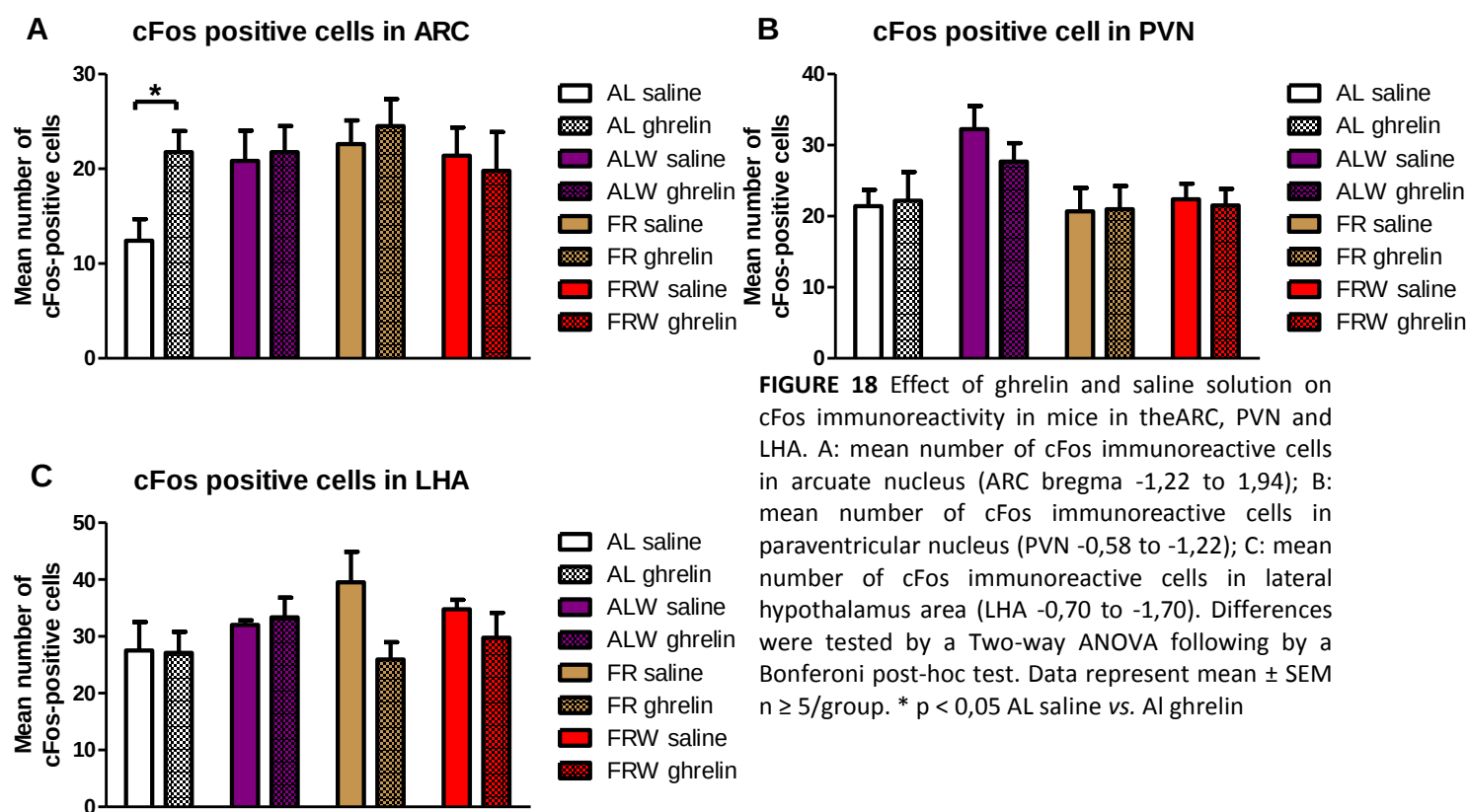


Figure 17 Effect of saline or ghrelin injection on cumulative food intake. Mean cumulative food intake (120min) after ip injection of saline solution (**A**) and ghrelin (20mg/kg) (**B**). Differences were tested by a Two-way ANOVA following by a Bonferoni post-hoc test. Squares indicate an activity effect. Data represent mean $\pm$ SEM $n \geq 3$ /group.

b) Activation centrale

Afin de déterminer les populations neuronales activées par le traitement saline vs ghréline suivi de la prise alimentaire, un marquage immunohistochimique dirigée contre la protéine c-Fos a été réalisé. Ainsi, il est apparu que seules les souris du groupe AL présentent une augmentation significative de l'activation des cellules du noyau arqué ($p < 0,05$) (**Fig 18 A**). Dans les autres structures aucune différence significative n'a été observée pour l'ensemble des groupes (**Fig. 18 B et C**).



3.2.4. Conclusion/discussion

En résumé, les résultats obtenus montrent de nombreuses variations dans l'expression de neuropeptides et neurotransmetteurs après 15 jours de protocole soulignant un effet net de la restriction alimentaire au niveau hypothalamique alors que l'activité physique module davantage le circuit non-homéostatique.

Ainsi, il est apparu que la restriction alimentaire est responsable d'une modification adaptative de l'expression des neuropeptides orexigènes, AgRP/NPY et MCH/ORX, et anorexigènes, POMC. Ces altérations sont impactées par la présence d'une roue d'activité et en particulier par l'activité physique anticipatoire. En effet, bien que la restriction alimentaire induit une augmentation de l'expression d'AgRP et de NPY dans les groupes FR et FRW, les niveaux d'expression ne sont pas les mêmes entre le matin et l'après-midi avant la distribution de la nourriture où l'expression est plus élevée. Cette période de la journée est associée à une augmentation des concentrations plasmatiques de ghreline et une diminution de l'expression des récepteurs hypothalamiques à la ghreline uniquement chez les FRW. Ces données

pourraient laisser supposer que les souris FRW présentent une plus forte sensibilité à la ghréline par rapport aux FR. De plus, l'expression de la prepro-orexine et du MCH est augmentée chez les souris FR avant la distribution de nourriture, ce qui n'est pas retrouvé chez les souris FRW. L'expression du MCH est comme nous l'avons indiqué dans l'introduction bibliographique, modulé par les neurones POMC/CART, par l'hypoglycémie et l'anxiété. Cette augmentation de MCH pourrait être la combinaison de plusieurs facteurs tels que l'augmentation de l'expression de CART chez ces souris ou encore l'hypoglycémie chronique. L'absence de variation chez les souris FRW serait à mettre en relation avec l'activité. En effet, les modèles de souris KO pour MCH présentent entre autre une activité nocturne accrue et une augmentation du métabolisme de base (Shimada *et al.*, 1998). Or, les résultats du chapitre I nous indiquent que les souris FR ont un métabolisme de base moins important que les souris FRW, ce qui soutiendrait le rôle potentiel du MCH dans cette régulation.

Nos résultats apparaissent en partie confirmés par les résultats obtenus dans la modèle ABA où l'expression d'AgRP et du NPY est également augmentée, mais aussi l'absence de modification de l'expression de MCH et de la prepro-orexine (Rijke *et al.*, 2006). Toutefois, bien que cette étude s'intéresse à l'expression de nombreux gènes hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, aucun effet notable n'a été observé en lien avec l'activité physique en condition *ad libitum*. Ceci est peut être lié au durée du protocole appliqué avec un sacrifice des rongeurs au bout de 4 jours seulement (Rijke *et al.*, 2006).

Pour les deux principaux peptides anorexigènes, les résultats sont encore plus contrastés entre les groupes FR et FRW. Ainsi, même si la diminution de l'expression de la POMC s'observe aussi bien chez les FR que les FRW, elle est plus marquée le matin chez les FRW. Une fois de plus, l'activité physique peut être responsable de ce résultat. Cette réponse est adaptative, car malgré une dépense physique plus importante que les souris FR, elles ne montrent pas de différence dans la dépense énergétique (chapitre I). En revanche, aucune modification n'a été notée concernant la CART chez les souris FRW alors que son expression est augmentée le matin dans le groupe FR. L'implication de ce neuropeptide reste à étudier de manière plus précise.

Il semble donc que l'activité physique a une influence non négligeable sur l'expression des différents neuropeptides hypothalamiques, ce qui se traduit par des variations notables dans l'expression des récepteurs au NPY et AgRP. En effet, seuls les groupes ALW et FRW montrent des différences significatives dans l'expression en ce qui de Y1, Y5, MC3R et MC4R. Ces

variations sont en quelque le reflet des augmentations d'expression d'AgRP et de NPY. On peut s'interroger toutefois sur l'absence de variations chez les souris FR qui présentent aussi des niveaux d'expression élevés pour ces neuropeptides.

De plus, l'activité physique (souris ALW et FRW) affecte également la VTA où les turnovers dopaminergique et sérotoninergique sont tous deux diminués. Les données combinées entre VTA/Substance noire et noyau accumbens permettent de montrer un effet lié à l'activité, mais aussi de manière plus spécifique à la motivation. En effet, seules les souris FRW ont une diminution (en tendance) du turnover de la dopamine dans le noyau accumbens. La pose de sondes de microdialyse au niveau du noyau accumbens permettrait d'établir plus précisément les variations de libération de la dopamine et ses métabolites dans les différentes conditions. Des traitements avec des antagonistes de la dopamine entraîne effectivement une réduction du comportement d'hyperactivité dans le protocole ABA (Verhagen *et al.*, 2008). En ce qui concerne la sérotonine, de manière similaire, le turnover est diminué dans la VTA/Substance noire uniquement chez les souris ALW et FRW. Or, les travaux de l'équipe de V. Compan (Compan *et al.*, 2004 ; Jean *et al.*, 2012) ont souligné le rôle essentiel des récepteurs 5HT_{1B} et 5HT_{4C} dans l'hyperactivité associée à l'anorexie induite par un stress. Au vu des variations observées, il conviendrait de vérifier si l'expression de ces récepteurs est modifiée de manière différentielle chez les souris FR et FRW.

Dans un deuxième temps, étant donné les résultats obtenus en périphérie, nous avons recherché si l'injection intrapéritonéale de ghréline avait un effet notable sur la prise alimentaire et l'activation des populations neuronales des circuits homéostatique et non homéostatique. Cette étude est préliminaire, car il nous faudrait évaluer de manière parallèle l'évolution de l'expression des neuropeptides étudiés ci-dessus et de vérifier si ce protocole modifie l'activité motrice. Les résultats obtenus montrent sans surprise un effet orexigène de la ghréline sur la prise alimentaire et l'activation neuronale, mais uniquement chez les souris AL. Le fait que l'injection de ghréline, largement connue pour ces effets orexigènes, observés entre autres dans le groupe AL n'a pas induit de modification dans les autres groupes peut être lié au protocole lui-même. En effet, après l'injection, les souris FR et FRW ont eu un accès libre à la nourriture ce qu'il leur a permis de manger le maximum de croquettes aussi bien dans le groupe saline que le groupe ghréline. Toutefois, les résultats des marquages immunohistochimiques semblent indiquer que les souris FR et FRW n'ont pas été sensibles à cette injection. Il faudrait étudier l'effet de l'injection sans reprise alimentaire pour les souris

FR et FRW (en cours). Une autre explication serait qu'elles se trouvaient dans un état de déséquilibre de la balance énergétique si importante, qu'aucune différence n'a pu être observée par le marquage. Afin de compléter notre étude, il serait judicieux de refaire le même traitement soit dans les heures qui suivent la distribution du repas soit directement sur des souris rassasiées. Une autre alternative serait de mesurer l'activité locomotrice des souris suite à une injection de ghréline. En effet, il a été montré que cette hormone et son récepteur sont directement impliqués dans la mise en place de l'activité anticipatoire (Verhagen *et al.*, 2010). Toutefois, la ghréline ne semble pas la seule protéine impliquée dans cette activité physique ; en effet, d'autres molécules ont été montrées comme étant impliquées tels que l' α MSH (Hillebrand *et al.*, 2005d), l'orexine (Mieda *et al.*, 2004), le MCH (Whiddon et Palmiter, 2013), la dopamine dans les circuits méso-limbiques (Mistlberger 2011 ; Szczypka *et al.*, 1999). En ce qui concerne la VTA, aucun marquage c-Fos n'a été observé, ce qui pourrait être lié soit à une absence d'expression de ce proto-oncogène et nécessiterait l'utilisation d'un autre marqueur d'activation cellulaire, soit être due à une hyperpolarisation membranaire qui se traduit par une absence d'activation du gène c-fos.

Bien que la ghréline ne soit pas la seule molécule impliquée dans la prise alimentaire et l'activité physique, elle n'en reste pas moins la cible idéale de par ses sites d'actions et ses fonctions pour espérer trouver des cibles potentiellement impliquées dans les altérations associées à la restriction alimentaire chronique telles qu'observées dans l'anorexie mentale. Des souris présentant une délétion conditionnelle des neurones AgRP présentent une absence d'anticipation à la prise de nourriture lorsque qu'elles sont placées dans un protocole d'alimentation programmée (Tan *et al.*, 2014). Ces souris bien que présentant une réduction du nombre de neurones AgRP maintiennent une prise alimentaire normale même après une injection de ghréline. Ce dernier point est peut être lié au fait que l'action orexigène de la ghréline passe aussi par une activation des neurones dopaminergiques de la VTA (Skibicka *et al.*, 2013). Il faudrait ainsi évaluer si dans nos conditions d'expérimentation, il existe une modification notable de l'expression du récepteur de la ghréline au niveau de la VTA.

Ces données, bien qu'encore préliminaires, montrent que notre protocole induit sur le court terme des modifications notables dans l'expression des neuropeptides hypothalamiques et des neurotransmetteurs du circuit méso-limbique. A priori, les résultats obtenus ne semblent pas valider notre hypothèse d'une « résistance » ou « insensibilité » à la ghréline dans les conditions de restriction alimentaire associée à l'activité, mais plutôt d'une adaptation à cette situation chronique. Adaptation qui sur le long terme se maintient (analyse en cours) et permettrait une reprise plus progressive de nourriture comme nous l'avons observé. En revanche, les animaux en situation de restriction alimentaire seule (souris FR) montrent une réactivité différentielle des structures hypothalamiques et méso-limbiques laissant supposer une adaptation physiologique moins élaborée, ce qui se traduit lors de la phase de récupération par une hyperphagie beaucoup plus marquée et plus durable.

Ainsi, une fois encore l'exercice physique modéré apparaît être un facteur favorisant l'adaptation à des conditions de restriction alimentaire sévère chronique. Une étude sur le plus long terme, puis en phase de récupération avec des régimes alimentaires enrichis ou non, permettrait de valider cet aspect.

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse nous a permis de mettre en place un nouveau modèle animal mimant plusieurs symptômes clé de l'anorexie mentale. Contrairement à la plupart des modèles déjà existants qui s'étendent sur des durées relativement courtes, nous avons pu mimer un certain nombre d'altérations sur du long terme, qui sont jusqu'à ce jour très peu étudiées. Comme cela a été souligné dans les différentes parties, quelques aspects restent à compléter, car préliminaires, mais ont ouvert de nouvelles interrogations, et ouvrent sur des perspectives mécanistiques qu'il conviendrait d'investiguer à plus long terme.

1^{er} objectif : Caractérisation du phénotype d'un modèle "Activity-based Anorexia" modifié:

Impact de l'activité physique.

Les données obtenues dans cette partie ont abouti à la caractérisation d'un modèle ABA modifié permettant un suivi sur le long terme. Le principal message qui semble émerger reste que l'activité physique modérée, bien que contribuant à la perte de masse grasse dans une première phase de restriction alimentaire, se révèle en fait comme un facteur positif. Bien que l'activité physique soit associée à une augmentation des dépenses énergétiques, quand elle est associée à une restriction alimentaire, elle semble favoriser une adaptation plus efficace de l'organisme lui permettant d'économiser son énergie. Sur le long terme, nous avons ainsi pu montrer qu'elle contribue à une amélioration du poids corporel en stabilisant la perte de masse grasse et permet aussi une normalisation de facteurs circulants tels que le glucose ou la corticostérone. Toutefois, les mécanismes d'action permettant de telles améliorations restent à préciser. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait amener à réfléchir sur de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant aussi bien le comportement (durée, intensité de l'exercice physique) que l'usage de traitements pharmacologiques adaptés, voire personnalisés selon les types d'AM rencontrés. De plus, nous ne pouvons pas exclure le fait que la diminution de l'activité anticipatoire soit liée à ses améliorations. Les résultats complémentaires obtenus pendant la phase de récupération indiquent également un impact positif de l'activité physique. En effet, elle ne constitue pas un obstacle au regain de poids et pourrait réduire les risques d'hyperphagie observée dans les comportements boulimiques qui sont régulièrement décrits dans cette maladie. De plus elle apparaît limiter le développement de masse grasse viscérale fréquemment associée au syndrome métabolique. Pour parfaire l'étude de cette phase de récupération, l'observation des modifications métaboliques est envisageable afin de déterminer si un impact sur les dépenses énergétiques, l'oxydation des acides gras ou le quotient respiratoire sont durablement modifiés ou reviennent à un état normal. Un autre aspect sur lequel il faudrait également s'arrêter est la non récupération des concentrations

plasmatiques de leptine chez les souris FRW à l'instar des souris SBA développées à Boulogne. Y aurait il également une reprogrammation de la synthèse de leptine dans les adipocytes (Zgheib et al., 2014) ? Quel en serait l'utilité physiologique ? Beaucoup d'études se penchent sur le rôle de la leptine dans la perte osseuse chez les patients anorexiques et elle pourrait apparaître comme une hormone clé dans la récupération de l'intégrité osseuse, sans compter l'implication de la leptine au niveau central dans la régulation de la prise alimentaire et la fonction de reproduction. Enfin, nous ne pouvons pas exclure un impact direct ou indirect des glucocorticoïdes. En effet, les souris FRW présentent des altérations de leur rythme circadien d'activité qui pourrait impacter les rythmes de sécrétion de différentes hormones dont la corticostérone.

2^{ème} objectif : Altérations centrales induites à court terme dans un modèle murin de restriction alimentaire chronique : implication de la ghréline.

Dans ce 2^{ème} objectif, il est apparu que la prise alimentaire a une influence non négligeable sur la sécrétion de GH. En effet, la consommation de nourriture entraîne un pic de GH particulièrement marqué chez les souris FR et FRW. De plus, ces souris répondent toujours positivement à l'injection de ghréline. Nous n'avons donc pas validé complètement notre hypothèse de travail sur la potentielle résistance ou insensibilité centrale à la ghréline induite par les conditions de restriction. De plus, il apparaît étonnant qu'en dehors des repas, la ghréline, dont les concentrations sont augmentées le matin et l'après midi, n'induit pas de modifications notables dans les concentrations de GH. On peut soulever la question d'une perte de pulsativité de la sécrétion de la ghréline qui pourrait expliquer son manque d'effet sur la sécrétion de GH.

Au vu des résultats obtenus au niveau central suite à l'injection de ghréline, on ne peut pas écarter une action stimulatrice de la ghréline sur la sécrétion de GH qui se ferait indépendamment de la stimulation des neurones GHRH de l'ARC et qui impliquerait les cellules somatotropes de l'adénohypophyse. Il est apparu aussi que l'activité physique a un effet non négligeable sur les circuits de régulation de la prise alimentaire, elle influence l'expression des récepteurs des peptides orexigènes et anorexigènes de l'hypothalamus ainsi que les turnovers dopaminergique et sérotoninergique au niveau de la VTA. Toutefois, les injections de ghréline réalisées n'ont pas permis de déterminer le rôle prédominant d'une structure plutôt qu'une autre dans le contrôle de la prise alimentaire dans les conditions dans lesquelles nous les avons appliquées.

Ainsi, pour parfaire l'étude de l'implication de l'axe somatotrope, il faudrait distinguer l'influence que peut avoir l'hypothalamus dans le contrôle de la sécrétion de GH et le rôle des

cellules somatotropes de l'hypophyse. Au niveau hypothalamique, il faudrait caractériser spécifiquement les modifications potentielles affectant les neurones à GHRH (expression du GHRH, du récepteur de la ghréline, des récepteurs à la somatostatine). Au niveau des cellules somatotropes de l'hypophyse, il faudrait étudier, si dans ces conditions, une variation de l'expression du récepteur GHRH est observée. On peut également envisager d'étudier, à partir de culture d'explants d'hypophyse issus de nos souris FR et FRW, l'implication de facteurs périphériques tels que la ghréline ou encore l'adiponectine dans la dynamique d'expression de ce récepteur (western blot, immunohistochimie...).

Au cours de la mise au point et de la caractérisation de notre modèle de restriction alimentaire chronique, nous avons vu que l'activité physique et plus particulièrement l'activité anticipatoire pouvait contribuer à la perte de poids corporel et de masse grasse. Les études précédemment réalisées ont montré qu'un certain nombre de structures (ARC, LHA, DMH ou VTA) sont impliquées ou impactées par l'activité anticipatoire et que la ghréline constitue un acteur majeur. La microdissection et l'analyse de l'expression de signaux de transduction de GHSR-1a au niveau de ces différents noyaux permettraient de distinguer leur implication dans les adaptations observées. De plus, l'étude des altérations centrales impliquant l'hypothalamus et le système méso-limbique est également envisageable après la restriction à long terme, mais aussi après la phase de récupération afin de déterminer si les altérations observées à long terme persistent dans le temps. Dans cette optique, l'étude des variations de l'expression des opioïdes et leurs récepteurs constituerait un apport essentiel non négligeable à notre étude, étant donné leur implication directe dans la prise alimentaire, l'activité physique et le système de récompense. Enfin, au vu des études précédentes menées dans le laboratoire sur la plasticité des organes circumventriculaires et l'hypoglycémie, il serait intéressant de regarder l'état de la barrière hémato-encéphalique. En effet, les études de Langlet *et al.* (2013) et Schaeffer *et al.* (2013) ont montré qu'un jeûne de 24h induit une réorganisation structurale de l'éminence médiane permettant un accès et une fixation plus importante de la ghréline. Au vu de ces données, il serait judicieux de regarder si la restriction alimentaire chronique associée ou non à l'activité induit le même type d'adaptation ou si d'autres modifications structurales apparaissent. Il pourrait donc être envisagé de réaliser des injections intraveineuses de bleu Evans le matin, en dehors de toute activité anticipatoire, et l'après-midi, durant l'activité anticipatoire à la prise de nourriture et vérifier l'état de la barrière hémato-encéphalique.

Différents modèles animaux mimant certains aspects de l'anorexie mentale ont été décrits dans l'introduction. Cependant, les critères retenus pour valider le lien avec l'anorexie

mentale restent souvent superficiels : perte de poids, activité volontaire, restriction volontaire. Les modèles qui nous ont semblé les plus pertinents par rapport aux perturbations physiologiques observées dans l'anorexie mentale, sont les modèles **SBA**, développé à Boulogne en collaboration avec le Dr Chauveau (*cf* annexe, Zgheib *et al.*, 2014) et le modèle ABA. Le premier pour sa relation avec le stress social chronique associé à la restriction alimentaire et le deuxième pour la combinaison entre activité physique et restriction alimentaire. Face aux limites soulevées dans la littérature pour le modèle ABA et en particulier le paramètre « restriction alimentaire volontaire » (voir introduction p 75-77), nous avons délibérément choisi de modifier ce modèle pour se rapprocher d'un modèle « éthologique » et plus proche d'une réalité physiologique de l'anorexie mentale. Éthologique ? les animaux n'ont pas de stress social (2 par cage) et peuvent mieux réguler leur température corporelle ; les animaux ont un accès libre à la roue, ce qui leur permet moduler librement leur activité ; les animaux ont un accès libre à une quantité de nourriture fixée qu'ils peuvent consommer à loisir. Réalité physiologique ? le protocole ainsi choisi permet de maintenir les animaux dans ces conditions durant une longue période, ce qui mime la chronicité de l'anorexie mentale. Ces paramètres sont absents des modèles ABA et de restriction alimentaire. En effet, l'étude de paramètres qui évoluent dans la durée n'a pas été investiguée dans le modèle ABA, du fait de la brièveté du protocole, avec des animaux qui atteignent des seuils critiques très rapidement (5 à 7 jours). Connaissant les limites du modèle ABA, il aurait été également judicieux d'éprouver notre modèle dans des conditions similaires. En particulier, il aurait été intéressant de vérifier l'impact d'une modification du pattern de distribution de la quantité de nourriture fixée, *i.e.* de distribuer la nourriture en 2 ou 3 fois, afin d'éviter le comportement « d'hyperphagie » observé. Est-ce que ce type de modification pourrait entraîner non seulement des modifications physiologiques (mise en réserve ?), mais aussi des variations dans la durée de l'activité anticipatoire ? De même, est-ce qu'une modification de la température ambiante (augmentation) réduirait la dépense énergétique et conduirait à une meilleure conservation des réserves énergétiques liée à une dépense physique moins importantes ? Les réponses éventuelles que nous pourrions apporter à ces questions seraient judicieuses en vue d'améliorer notre protocole et de répondre aux mieux aux questions soulevées par les cliniciens confrontés à l'anorexie mentale.

Malgré ces limites et critiques, notre modèle **FRW** a néanmoins validé la grande majorité des différents paramètres physiologiques fixés au départ qui restent souvent non étudiés dans les autres modèles, comme par exemple : le pattern d'activité physique et de prise alimentaire, la dépense énergétique, certaines hormones (adiponectine, corticostérone..), la masse osseuse,

l'anxiété et l'évolution de tous ces paramètres sur le long terme (**Tableau 1**). Cependant, les modèles de restriction alimentaire modérée (**FR modéré**) ont permis d'étayer un grand nombre des points que nous avons également étudié, hormis le fait qu'il n'y a pas d'activité physique. Toutefois, les résultats observés dans ces conditions apparaissent souvent en contradiction par rapport à ceux observés dans des protocoles de restriction sévère (**FR sévère**) ; on peut penser que ces différences sont attribuables aux déséquilibres de la balance énergétique qui ne seraient pas assez sévères dans le cas des FR modéré.

Concernant l'activité physique, paramètre commun au modèle ABA et FRW, nos travaux nous ont permis de montrer que l'exercice physique a une influence non négligeable aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau central. Il est apparu également que sur le long terme des adaptations bien spécifiques soient liées à ce facteur. Enfin, les résultats préliminaires nous laissent supposer une reprogrammation de certains systèmes physiologiques qu'il faudrait éprouver dans le modèle FR/FRW. Les questions qui pourraient découler des données obtenues sur la reprise alimentaire seraient les suivantes : est ce que ce type de protocole modifie les préférences alimentaires vers des aliments plus caloriques ? comment évoluent les paramètres physiologiques mesurés (masse grasse, dépense énergétique, plasticité cérébrale, modification de la barrière hémato-encéphalique...) en condition *ad libitum* avec ou sans régime enrichi ? Est-ce que les souris FRW (maintenues dans leur cage avec une roue) résistent plus au syndrome métabolique que les FR sur le long terme ?

Ainsi, les résultats obtenus pendant ma thèse ont permis de répondre aux objectifs fixés, même si certaines données sont encore préliminaires et mériteraient d'être étayées. Ils ouvrent de nouvelles perspectives sur l'utilisation de ce modèle FR/FRW sur le long terme. Ce modèle présente certes certains biais comme la présence de deux souris par cage pour éviter le stress d'isolement, mais il avait pour objectif premier de se rapprocher le plus d'un modèle « éthologique » avec une validité d'apparence acceptable mimant ainsi le plus grand nombre des symptômes observés dans l'anorexie mentale. Il n'en reste pas moins que ce modèle reste un modèle animal et comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, et le terme d'anorexie mentale ne pourrait en aucun cas convenir pour le qualifier. Contrairement au modèle ABA, la restriction alimentaire volontaire n'est pas observée, mais notre protocole visait davantage à éviter les perturbations physiologiques associées au stress chronique d'isolement et une fois de plus tentait d'être le plus proche d'une réalité clinique.

Ainsi pour la première fois, nous montrons l'impact de l'exercice physique en condition de restriction alimentaire en relation avec le métabolisme énergétique. Nous validons la

complexité de la régulation endocrinienne de la prise alimentaire dans ces situations de déficit énergétique chronique et mettons en exergue la ghréline comme acteur potentiel dans une régulation combinée des circuits homéostatiques, non homéostatiques et périphériques. Comme indiqué dans le tableau récapitulatif (**Tableau 1**), nous avons durant ces trois ans ouvert de nombreuses pistes d'investigation qu'il faudrait maintenant étudier sur un plan plus mécanistique.

Tableau 1 Synthèse de l'apport des modèles existants

	AM	FR modéré	FR sévère	SBA	ABA	FRW
Perte importante de poids	+	-	+	+	+	+
Métabolisme énergétique	↘	+	?	-	-	+
Activité physique (anticipatoire)	+/-	-	+/-	?	+	+
Reproduction	↘	+	+	+	+	+
GH/ IGF-1	↗/↘	+	+	+	-	+/-
Hypoleptinémie	↘	+	+	+	+	+
Hyperghrélinémie	↗	?	+	?	+	+
Système ghréline (GOAT)	?	+	+/-	-	-	En cours
Hypercortisolémie	↗	?	+	+	+	+
Hyperadiponectinémie	↗	+/-	?	non	-	En cours
Masse osseuse	↘	+	?	+	-	+
Adiposité médullaire	+/-	+	?	non / en cours	-	En cours
Altérations centrales (système homéostatique)	+/-	+	+	en cours	+	+
Altérations centrales (système non homéostatique)	+/-	+/-	+	?	+	+
Phase longue de restriction	+	+	-	+	-	+
Phase de récupération	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Niveau d'anxiété	+	?	?	?	-	En cours

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbate Daga G, Campisi S, Marzola E, Rocca G, Peris C, Campagnoli C, Peloso A, Vesco S, Rigardetto R, Fassino S. Amenorrhea in eating disorders: poor stability of symptom after a one-year treatment. *Eat Weight Disord*. 2012 Jun;17(2):e78-85. Epub 2011 Sep 26.

Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschöp MH, Gao XB, Horvath TL. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest*. 2006 Dec;116(12):3229-39. Epub 2006 Oct 19.

Abramson E. Computation of Results from Experiments with Indirect Calorimetry . *Acta Physiologica Scandinavica* Article first published online: 8 DEC 2008 DOI: 10.1111/j.1748-1716.1943.tb02822.x

Adamantidis AR, Tsai HC, Boutrel B, Zhang F, Stuber GD, Budygin EA, Touriño C, Bonci A, Deisseroth K, de Lecea L. Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. *J Neurosci*. 2011 Jul 27;31(30):10829-35. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2246-11.2011.

Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*. 1985 Nov;89(5):1070-7.

Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J*. 2008 Aug 15;414(1):1-18. doi: 10.1042/BJ20080595.

Alderdice JT, Dinsmore WW, Buchanan KD, Adams C. Gastrointestinal hormones in anorexia nervosa. *J Psychiatr Res*. 1985;19(2-3):207-13.

Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol*. 2011 Nov;164 Suppl 1:S1-324. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01649_1.x.

Alguacil LF, Salas E, González-Martín C. Identification of new drug targets and biomarkers related to obesity and eating disorders: an approach based on reward deficit and addiction. *Curr Pharm Des*. 2011;17(5):462-70.

Al-Khalili L, Bouzakri K, Glund S, Lönnqvist F, Koistinen HA, Krook A. Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol*. 2006 Dec;20(12):3364-75. Epub 2006 Aug 31.

American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, DSM-4. American Psychiatric Association

American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, DSM-5. American Psychiatric Association

Anand BK, Brobeck JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1951 Jun;77(2):323-4.

Anderson IM, Parry-Billings M, Newsholme EA, Fairburn CG, Cowen PJ. Dieting reduces plasma tryptophan and alters brain 5-HT function in women. *Psychol Med*. 1990 Nov;20(4):785-91.

Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci*. 2011 Mar;14(3):351-5. doi: 10.1038/nn.2739. Epub 2010 Jan 5.

Arase K, Fisler JS, Shargill NS, York DA, Bray GA. Intracerebroventricular infusions of 3-OHB and insulin in a rat model of dietary obesity. *Am J Physiol*. 1988 Dec;255(6 Pt 2):R974-81.

Arcelus J, Mitchell AJ, Wales J, Nielsen S. Mortality rates in patients with anorexia nervosa and other eating disorders. A meta-analysis of 36 studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2011 Jul;68(7):724-31. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.74.

Argilés JM, Azcón-Bieto J. The metabolic environment of cancer. *Mol Cell Biochem*. 1988 May;81(1):3-17.

Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*. 2005 Jan;146(1):355-64. Epub 2004 Oct 7.

Arletti R, Benelli A, Bertolini A. Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiol Behav*. 1990 Dec;48(6):825-30.

Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS One*. 2009 Sep 23;4(9):e7125. doi: 10.1371/journal.pone.0007125.

Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*. 2005 Jan;54(1):18-24.

Atalayer D, Robertson KL, Haskell-Luevano C, Andreasen A, Rowland NE. Food demand and meal size in mice with single or combined disruption of melanocortin type 3 and 4 receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 Jun;298(6):R1667-74. doi: 10.1152/ajpregu.00562.2009. Epub 2010 Apr 7.

Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012 Aug 9;488(7410):172-7. doi: 10.1038/nature11270.

Attia E, Roberto CA. Should amenorrhea be a diagnostic criterion for anorexia nervosa? *Int J Eat Disord*. 2009 Nov;42(7):581-9. doi: 10.1002/eat.20720.

Atzmon G, Yang XM, Muzumdar R, Ma XH, Gabriely I, Barzilai N. Differential gene expression between visceral and subcutaneous fat depots. *Horm Metab Res*. 2002 Nov-Dec;34(11-12):622-8.

Aucouturier J, Meyer M, Thivel D, Taillardat M, Duché P. Effect of android to gynoid fat ratio on insulin resistance in obese youth. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2009 Sep;163(9):826-31. doi: 10.1001/archpediatrics.2009.148.

Austad SN. Does caloric restriction in the laboratory simply prevent overfeeding and return house mice to their natural level of food intake? *Sci Aging Knowledge Environ*. 2001 Nov 7;2001(6):pe3.

Avena NM, Bocarsly ME. Dysregulation of brain reward systems in eating disorders: neurochemical information from animal models of binge eating, bulimia nervosa, and anorexia nervosa. *Neuropharmacology*. 2012 Jul;63(1):87-96. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.11.010. Epub 2011 Nov 27.

Avraham Y, Hao S, Mendelson S, Berry EM. Tyrosine improves appetite, cognition, and exercise tolerance in activity anorexia. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Dec;33(12):2104-10.

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15718-23. Epub 2004 Oct 25.

Bailer UF, Frank GK, Henry SE, Price JC, Meltzer CC, Mathis CA, Wagner A, Thornton L, Hoge J, Ziolkowski SK, Becker CR, McConaha CW, Kaye WH. Exaggerated 5-HT_{1A} but normal 5-HT_{2A} receptor activity in individuals ill with anorexia nervosa. *Biol Psychiatry*. 2007 May 1;61(9):1090-9. Epub 2007 Jan 22.

Bailer UF, Frank GK, Price JC, Meltzer CC, Becker C, Mathis CA, Wagner A, Barbarich-Marsteller NC, Bloss CS, Putnam K, Schork NJ, Gamst A, Kaye WH. Interaction between serotonin transporter and dopamine D₂/D₃ receptor radioligand measures is associated with harm avoidant symptoms in anorexia and bulimia nervosa. *Psychiatry Res*. 2013 Feb 28;211(2):160-8. doi: 10.1016/j.psychres.2012.06.010. Epub 2012 Nov 13.

Bakshi VP, Kelley AE. Dopaminergic regulation of feeding behavior: II. Differential effects of amphetamine microinfusion into three striatal subregions. *Psychobiology* September 1991, Volume 19, Issue 3, pp 233-242

Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prévot V. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit

for leptin into the brain. *Cell Metab.* 2014 Feb 4;19(2):293-301. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.015.

Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Pocai A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science.* 2004 Feb 20;303(5661):1195-8.

Banks WA, Burney BO, Robinson SM. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. *Peptides.* 2008 Nov;29(11):2061-5. doi: 10.1016/j.peptides.2008.07.001. Epub 2008 Jul 17.

Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L, Cattin L, Biolo G, Zanetti M, Guarnieri G. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Jan;288(1):E228-35. Epub 2004 Aug 24.

Barbarich-Marsteller NC, Foltin RW, Walsh BT. Does anorexia nervosa resemble an addiction? *Curr Drug Abuse Rev.* 2011 Sep;4(3):197-200.

Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell.* 2012 Sep 14;150(6):1196-208. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.032.

Basso AM, Kelley AE. Feeding induced by GABA(A) receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. *Behav Neurosci.* 1999 Apr;113(2):324-36.

Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA, Park AJ, Ellis SM, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Aug;88(8):3989-92.

Bazin H. Tumeurs secretant des immunoglobulines chez le rat LOU/Wsl. Etude portant sur 200 immunocytoplastes. 1974. *Ann. Immunol. (Paris)* 125C, 277-279

Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011 Mar;63(1):182-217. doi: 10.1124/pr.110.002642. Epub 2011 Feb 8.

Beaumont K, Kenney MA, Young AA, Rink TJ. High affinity amylin binding sites in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1993 Sep;44(3):493-7.

Begg DP, Woods SC. The endocrinology of food intake. *Nat Rev Endocrinol.* 2013 Oct;9(10):584-97. doi: 10.1038/nrendo.2013.136. Epub 2013 Jul 23.

Beigneux AP, Davies BS, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, Peale F, Bunting S, Walzem RL, Wong JS, Blaner WS, Ding ZM, Melford K, Wongsiriroj N, Shu X, de Sauvage F, Ryan RO, Fong LG, Bensadoun A, Young SG. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab.* 2007 Apr;5(4):279-91.

Beinfeld MC, Meyer DK, Brownstein MJ. Cholecystokinin in the central nervous system. *Peptides.* 1981;2 Suppl 2:77-9.

Beinfeld MC, Palkovits M. Distribution of cholecystokinin (CCK) in the rat lower brain stem nuclei. *Brain Res.* 1982 Apr 22;238(1):260-5.

Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT. Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature.* 1983 Apr 21;302(5910):716-8.

Bellefontaine N, Chachlaki K, Parkash J, Vanacker C, Colledge W, d'Anglemont de Tassigny X, Garthwaite J, Bouret SG, Prevot V. Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J Clin Invest.* 2014 Jun 2;124(6):2550-9. doi: 10.1172/JCI65928. Epub 2014 May 8.

Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crépin D, Ould Hamouda H, Riffault L, Taouis M. Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes.* 2013 Jan;62(1):102-14.

doi: 10.2337/db12-0237. Epub 2012 Sep 6.

Benomar Y, Wetzler S, Larue-Achagiotis C, Djiane J, Tomé D, Taouis M. In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol*. 2005 Oct 20;242(1-2):59-66.

Benrick A, Schéle E, Pinnock SB, Wernstedt-Asterholm I, Dickson SL, Karlsson-Lindahl L, Jansson JO. Interleukin-6 gene knockout influences energy balance regulating peptides in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *J Neuroendocrinol*. 2009 Jul;21(7):620-8. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01879.x. Epub 2009 Apr 13.

Beretta M. Imaging the experiments on respiration and transpiration of Lavoisier and Séguin: two unknown drawings by Madame Lavoisier. *Nuncius*. 2012;27(1):163-91.

Bergh C, Södersten P. Anorexia nervosa, self-starvation and the reward of stress. *Nat Med*. 1996 Jan;2(1):21-2.

Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav*. 2010 Jun;95(4):375-82. doi: 10.1016/j.pbb.2010.03.012. Epub 2010 Mar 27.

Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci Biobehav Rev*. 1993 Summer;17(2):141-93.

Berridge KC, Robinson TE, Aldridge JW. Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Feb;9(1):65-73. doi: 10.1016/j.coph.2008.12.014. Epub 2009 Jan 21.

Berridge KC. Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav*. 2004 Apr;81(2):179-209.

Beshyah SA, Freemantle C, Thomas E, Rutherford O, Page B, Murphy M, Johnston DG. Abnormal body composition and reduced bone mass in growth hormone deficient hypopituitary adults. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1995 Feb;42(2):179-89.

Bewick GA, Gardiner JV, Dhillon WS, Kent AS, White NE, Webster Z, Ghatgei MA, Bloom SR. Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J*. 2005 Oct;19(12):1680-2. Epub 2005 Aug 11.

Bi S, Kim YJ, Zheng F. Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides*. 2012 Dec;46(6):309-14. doi: 10.1016/j.npep.2012.09.002. Epub 2012 Oct 18.

Bi S, Robinson BM, Moran TH. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Nov;285(5):R1030-6. Epub 2003 Jul 3.

Bjørbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997 Dec 19;272(51):32686-95.

Björntorp P, Yang MU. Refeeding after fasting in the rat: effects on body composition and food efficiency. *Am J Clin Nutr*. 1982 Sep;36(3):444-9.

Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth*. 1996 Jul;77(1):110-7.

Blaxter KL. Adair Crawford and calorimetry. *Proc Nutr Soc*. 1978 May;37(1):1-3.

Blevins JE, Eakin TJ, Murphy JA, Schwartz MW, Baskin DG. Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Res*. 2003 Dec 12;993(1-2):30-41.

Boakes RA, Juraskova I. The role of drinking in the suppression of food intake by recent activity. *Behav Neurosci*. 2001 Jun;115(3):718-30.

Boakes RA. Self-starvation in the rat: running versus eating. *Span J Psychol*. 2007 Nov;10(2):251-7.

Boden G, Chen X, Rosner J, Barton M. Effects of a 48-h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. *Diabetes*. 1995 Oct;44(10):1239-42. *Diabetes*. 1995 Oct;44(10):1239-42.

Boghi A, Sterpone S, Sales S, D'Agata F, Bradac GB, Zullo G, Munno D. In vivo evidence of global and focal brain alterations in anorexia nervosa. *Psychiatry Res*. 2011 Jun 30;192(3):154-9. doi: 10.1016/j.psychres.2010.12.008. Epub 2011 May 5.

Bolles RC, Duncan PM, Grossen NE, Matter CF. Relationship between activity level and body temperature in the rat. *Psychol Rep*. 1968 Dec;23(3):991-4.

Bonaiuti D, Shea B, Iovine R, Negrini S, Robinson V, Kemper HC, Wells G, Tugwell P, Cranney A. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(3):CD000333.

Boraska V, Franklin CS, Floyd JA, Thornton LM, Huckins LM, Southam L, Rayner NW, Tachmazidou I,... Bulik CM. A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Mol Psychiatry*. 2014 Feb 11. doi: 10.1038/mp.2013.187. [Epub ahead of print]

Bordi C, D'Adda T, Azzoni C, Ferraro G. Classification of gastric endocrine cells at the light and electron microscopical levels. *Microsc Res Tech*. 2000 Mar 1;48(5):258-71.

Borg MA, Sherwin RS, Borg WP, Tamborlane WV, Shulman GI. Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *J Clin Invest*. 1997 Jan 15;99(2):361-5.

Borg ML, Andrews ZB, Watt MJ. Exercise training does not enhance hypothalamic responsiveness to leptin or ghrelin in male mice. *J Neuroendocrinol*. 2014 Feb;26(2):68-79. doi: 10.1111/jne.12130.

Bornhorst GM, Paul Singh R. Gastric digestion in vivo and in vitro: how the structural aspects of food influence the digestion process. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2014;5:111-32. doi: 10.1146/annurev-food-030713-092346. Epub 2014 Jan 2.

Bossu C, Galusca B, Normand S, Germain N, Collet P, Frere D, Lang F, Laville M, Estour B. Energy expenditure adjusted for body composition differentiates constitutional thinness from both normal subjects and anorexia nervosa. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Jan;292(1):E132-7. Epub 2006 Aug 15.

Bouillaud F1, Raimbault S, Ricquier D. The gene for rat uncoupling protein: complete sequence, structure of primary transcript and evolutionary relationship between exons. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Dec 15;157(2):783-92.

Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*. 2004 Mar 17;24(11):2797-805.

Boyar RM, Katz J, Finkelstein JW, Kapen S, Weiner H, Weitzman ED, Hellman L. Anorexia nervosa. Immaturity of the 24-hour luteinizing hormone secretory pattern. *N Engl J Med*. 1974 Oct 24;291(17):861-5.

Boye SM, Grant RJ, Clarke PB. Disruption of dopaminergic neurotransmission in nucleus accumbens core inhibits the locomotor stimulant effects of nicotine and D-amphetamine in rats. *Neuropharmacology*. 2001 May;40(6):792-805.

Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. 1973 Jan 5;179(4068):77-9.

Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*. 1998 Dec 28;402(4):460-74.

Broglia F, Gianotti L, Destefanis S, Fassino S, Abbate Daga G, Mondelli V, Lanfranco F, Gottero C, Gauna C, Hofland L, Van der Lely AJ, Ghigo E. The endocrine response to acute ghrelin administration is

blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004 May;60(5):592-9.

Bronson FH, Stetson MH. Gonadotropin release in prepubertal female mice following male exposure: a comparison with the adult cycle. *Biol Reprod*. 1973 Dec;9(5):449-59.

Bruss MD1, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Jan;298(1):E108-16. doi: 10.1152/ajpendo.00524.2009. Epub 2009 Nov 3.

Burdakov D, González JA. Physiological functions of glucose-inhibited neurones. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 Jan;195(1):71-8. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01922.x. Epub 2008 Oct 28.

Burnett CM, Grobe JL. Dietary effects on resting metabolic rate in C57BL/6 mice are differentially detected by indirect (O₂/CO₂ respirometry) and direct calorimetry. *Mol Metab*. 2014 Mar 21;3(4):460-4. doi: 10.1016/j.molmet.2014.03.003. eCollection 2014.

Butler AA, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat Neurosci*. 2001 Jun;4(6):605-11.

Cabanac M. Physiological role of pleasure. *Science*. 1971 Sep 17;173(4002):1103-7.

Cabral A, Suescun O, Zigman JM, Perello M. Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS One*. 2012;7(2):e31462. doi: 10.1371/journal.pone.0031462. Epub 2012 Feb 20.

Cansell C, Castel J, Denis RG, Rouch C, Delbes AS, Martinez S, Mestivier D, Finan B, Maldonado-Aviles JG, Rijnsburger M, Tschöp MH, Dileone RJ, Eckel RH, la Fleur SE, Magnan C, Hnasko TS, Luquet S. Dietary triglycerides act on mesolimbic structures to regulate the rewarding and motivational aspects of feeding. *Mol Psychiatry*. 2014 Apr 15. doi: 10.1038/mp.2014.31. [Epub ahead of print]

Cardinal P, Bellocchio L, Clark S, Cannich A, Klugmann M, Lutz B, Marsicano G, Cota D. Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology*. 2012 Sep;153(9):4136-43. doi: 10.1210/en.2012-1405. Epub 2012 Jul 9.

Casper RC, Schoeller DA, Kushner R, Hnilicka J, Gold ST. Total daily energy expenditure and activity level in anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr*. 1991 May;53(5):1143-50.

Casper RC. Behavioral activation and lack of concern, core symptoms of anorexia nervosa? *Int J Eat Disord*. 1998 Dec;24(4):381-93.

Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*. 1985 Mar-Apr;100(2):126-31.

Casteilla L, Pénicaud L, Cousin B, Calise D. Choosing an adipose tissue depot for sampling: factors in selection and depot specificity. *Methods Mol Biol*. 2008;456:23-38. doi: 10.1007/978-1-59745-245-8_2.

Cerri M, Morrison SF. Corticotropin releasing factor increases in brown adipose tissue thermogenesis and heart rate through dorsomedial hypothalamus and medullary raphe pallidus. *Neuroscience*. 2006 Jun 30;140(2):711-21. Epub 2006 Mar 31.

Challet E, Mendoza J, Dardente H, Pévet P. Neurogenetics of food anticipation. *Eur J Neurosci*. 2009 Nov;30(9):1676-87. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06962.x. Epub 2009 Oct 26.

Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest*. 2003 May;111(9):1409-21.

Chao H, Digruccio M, Chen P, Li C. Type 2 corticotropin-releasing factor receptor in the ventromedial nucleus of hypothalamus is critical in regulating feeding and lipid metabolism in white adipose tissue. *Endocrinology*. 2012 Jan;153(1):166-76. doi: 10.1210/en.2011-1312. Epub 2011 Nov 8.

Chao PT, Yang L, Aja S, Moran TH, Bi S. Knockdown of NPY expression in the dorsomedial

hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. *Cell Metab.* 2011 May 4;13(5):573-83. doi: 10.1016/j.cmet.2011.02.019.

Chapman I, Parker B, Doran S, Feinle-Bisset C, Wishart J, Lush CW, Chen K, Lacerte C, Burns C, McKay R, Weyer C, Horowitz M. Low-dose pramlintide reduced food intake and meal duration in healthy, normal-weight subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 May;15(5):1179-86.

Chartrel N, Alvear-Perez R, Leprince J, Iturrioz X, Reaux-Le Goazigo A, Audinot V, Chomarat P, Coge F, Nosjean O, Rodriguez M, Galizzi JP, Boutin JA, Vaudry H, Llorens-Cortes C. Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". *Science*. 2007 Feb 9;315(5813):766; author reply 766.

Chaves VE, Tilelli CQ, Brito NA, Brito MN. Role of oxytocin in energy metabolism. *Peptides*. 2013 Jul;45:9-14. doi: 10.1016/j.peptides.2013.04.010. Epub 2013 Apr 26.

Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet*. 2000 Sep;26(1):97-102.

Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC, Ueno N, Fujimiya M. Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):8-25.

Choi DL, Davis JF, Fitzgerald ME, Benoit SC. The role of orexin-A in food motivation, reward-based feeding behavior and food-induced neuronal activation in rats. *Neuroscience*. 2010 Apr 28;167(1):11-20. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.02.002. Epub 2010 Feb 8.

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006;1(2):581-5.

Chow KB, Sun J, Chu KM, Tai Cheung W, Cheng CH, Wise H. The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jan 2;348(1):247-54. doi: 10.1016/j.mce.2011.08.034. Epub 2011 Aug 31.

Chowdhury GM, Jiang L, Rothman DL, Behar KL. The contribution of ketone bodies to basal and activity-dependent neuronal oxidation in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014 Jul;34(7):1233-42. doi: 10.1038/jcbfm.2014.77. Epub 2014 Apr 30.

Christopoulos G, Paxinos G, Huang XF, Beaumont K, Toga AW, Sexton PM. Comparative distribution of receptors for amylin and the related peptides calcitonin gene related peptide and calcitonin in rat and monkey brain. *Can J Physiol Pharmacol*. 1995 Jul;73(7):1037-41.

Cloninger, CR, Przybeck, TR, Svrakic, DM, Wetzel, RD. in *The temperament and character inventory (TCI): a guide to its development and use*. (Center for Psychobiology of Personality, Washington University, St Louis, Missouri, USA, 1994).

Compan V, Zhou M, Grailhe R, Gazzara RA, Martin R, Gingrich J, Dumuis A, Brunner D, Bockaert J, Hen R. Attenuated response to stress and novelty and hypersensitivity to seizures in 5-HT₄ receptor knock-out mice. *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):412-9.

Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 Dec;25 Suppl 5:S63-7.

Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*. 2005 May;8(5):571-8.

Cook DL, and Taborsky GJ Jr. B-cell function and insulin secretion. In: *Diabetes Mellitus, Theory and Practice*, 4th Edition, D. Porte, Jr. and H. Rifkin (eds.), Elsevier Science Publ, New York, pp. 89-103, 1990; 5th Edition, 1995

Cools R, Roberts AC, Robbins TW. Serotonergic regulation of emotional and behavioural control

processes. *Trends Cogn Sci*. 2008 Jan;12(1):31-40. Epub 2007 Dec 19.

Coope A, Milanski M, Araújo EP, Tambascia M, Saad MJ, Geloneze B, Velloso LA. AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *FEBS Lett*. 2008 Apr 30;582(10):1471-6. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.037. Epub 2008 Apr 3.

Cornish J, Callon KE, Cooper GJ, Reid IR. Amylin stimulates osteoblast proliferation and increases mineralized bone volume in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Feb 6;207(1):133-9.

Corp ES, Woods SC, Porte D Jr, Dorsa DM, Figlewicz DP, Baskin DG. Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett*. 1986 Sep 25;70(1):17-22.

Corwin RL, Avena NM, Boggiano MM. Feeding and reward: perspectives from three rat models of binge eating. *Physiol Behav*. 2011 Jul 25;104(1):87-97. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.041. Epub 2011 May 1.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):480-4.

Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003 Feb 20;37(4):649-61.

Cox HM. Neuropeptide Y receptors; antisecretory control of intestinal epithelial function. *Auton Neurosci*. 2007 Apr 30;133(1):76-85. Epub 2006 Nov 30.

Crawley JN, Beinfeld MC. Rapid development of tolerance to the behavioural actions of cholecystokinin. *Nature*. 1983 Apr 21;302(5910):703-6.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1714-9.

Cuntz U, Enck P, Frühauf E, Lehnert P, Riepl RL, Fichter MM, Otto B. Cholecystokinin revisited: CCK and the hunger trap in anorexia nervosa. *PLoS One*. 2013;8(1):e54457. doi: 10.1371/journal.pone.0054457. Epub 2013 Jan 17.

Dahlstroem A, fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1964:SUPPL 232:1-55.

Dalle Grave R, Calugi S, Marchesini G. Is amenorrhea a clinically useful criterion for the diagnosis of anorexia nervosa? *Behav Res Ther*. 2008 Dec;46(12):1290-4. doi: 10.1016/j.brat.2008.08.007. Epub 2008 Sep 9.

Dalle Grave R. Features and management of compulsive exercising in eating disorders. *Phys Sportsmed*. 2009 Oct;37(3):20-8. doi: 10.3810/psm.2009.10.1725.

Dardennes RM, Zizzari P, Tolle V, Foulon C, Kipman A, Romo L, Iancu-Gontard D, Boni C, Sinet PM, Thérèse Bluet M, Estour B, Mouren MC, Guelfi JD, Rouillon F, Gorwood P, Epelbaum J. Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Feb;32(2):106-13. Epub 2007 Jan 2.

Daugé V, Léna I. CCK in anxiety and cognitive processes. *Neurosci Biobehav Rev*. 1998 Oct;22(6):815-25.

Davis C, Cluridge G. The eating disorders as addiction: a psychobiological perspective. *Addict Behav*. 1998 Jul-Aug;23(4):463-75.

Davis C. Eating disorders and hyperactivity: a psychobiological perspective. *Can J Psychiatry*. 1997

Mar;42(2):168-75.

Davis JD, Wirtshafter D, Asin KE, Brief D. Sustained intracerebroventricular infusion of brain fuels reduces body weight and food intake in rats. *Science*. 1981 Apr 3;212(4490):81-3.

De Deurwaerdère P, Navailles S, Berg KA, Clarke WP, Spampinato U. Constitutive activity of the serotonin_{2C} receptor inhibits in vivo dopamine release in the rat striatum and nucleus accumbens. *J Neurosci*. 2004 Mar 31;24(13):3235-41.

de Kloet AD, Pacheco-López G, Langhans W, Brown LM. The effect of TNF α on food intake and central insulin sensitivity in rats. *Physiol Behav*. 2011 Apr 18;103(1):17-20. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.11.037. Epub 2010 Dec 14.

de Kock CP, Wierda KD, Bosman LW, Min R, Koksma JJ, Mansvelder HD, Verhage M, Brussaard AB. Somatodendritic secretion in oxytocin neurons is upregulated during the female reproductive cycle. *J Neurosci*. 2003 Apr 1;23(7):2726-34.

de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6;95(1):322-7.

de Rijke CE, Hillebrand JJ, Verhagen LA, Roeling TA, Adan RA. Hypothalamic neuropeptide expression following chronic food restriction in sedentary and wheel-running rats. *J Mol Endocrinol*. 2005 Oct;35(2):381-90.

De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005 Oct;146(10):4192-9. Epub 2005 Jul 7.

Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology*. 2008 Feb;149(2):470-5. Epub 2007 Nov 15.

Delhanty PJ, Neggers SJ, van der Lely AJ. Mechanisms in endocrinology: Ghrelin: the differences between acyl- and des-acyl ghrelin. *Eur J Endocrinol*. 2012 Nov;167(5):601-8. doi: 10.1530/EJE-12-0456. Epub 2012 Aug 16.

Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua S Jr, Elmquist JK, Lowell BB. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*. 2006 Jan 19;49(2):191-203.

Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res*. 2002 Dec 2;137(1-2):75-114.

Di Marzo V, Ligresti A, Cristino L. The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. *Int J Obes (Lond)*. 2009 Jun;33 Suppl 2:S18-24. doi: 10.1038/ijo.2009.67.

Dickson SL, Luckman SM. Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology*. 1997 Feb;138(2):771-7.

Dickson SL, Shirazi RH, Hansson C, Bergquist F, Nissbrandt H, Skibicka KP. The glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogue, exendin-4, decreases the rewarding value of food: a new role for mesolimbic GLP-1 receptors. *J Neurosci*. 2012 Apr 4;32(14):4812-20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6326-11.2012.

Dixon DP, Ackert AM, Eckel LA. Development of, and recovery from, activity-based anorexia in female rats. *Physiol Behav*. 2003 Nov;80(2-3):273-9.

Domingos AI, Vaynshteyn J, Voss HU, Ren X, Gradinaru V, Zang F, Deisseroth K, de Araujo IE, Friedman J. Leptin regulates the reward value of nutrient. *Nat Neurosci*. 2011 Nov 13;14(12):1562-8.

doi: 10.1038/nn.2977.

Donahoo WT1, Levine JA, Melanson EL. Variability in energy expenditure and its components. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004 Nov;7(6):599-605.

Dostalova I, Bartak V, Papezova H, Nedvidkova J. The effect of short-term exercise on plasma leptin levels in patients with anorexia nervosa. *Metabolism*. 2007 Apr;56(4):497-503.

Dostálová I, Smitka K, Papezová H, Kvasnicková H, Nedvídková J. Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines. *Physiol Res*. 2007;56(5):587-94. Epub 2006 Dec 19.

Douglas BR, Jansen JB, de Jong AJ, Lamers CB. Effect of various triglycerides on plasma cholecystokinin levels in rats. *J Nutr*. 1990 Jul;120(7):686-90.

Dridi S, Taouis M. Adiponectin and energy homeostasis: consensus and controversy. *J Nutr Biochem*. 2009 Nov;20(11):831-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.06.003. Epub 2009 Aug 27.

Du F, Higginbotham DA, White BD. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr*. 2000 Mar;130(3):514-21.

Dubreucq S, Durand A, Matias I, Bénard G, Richard E, Soria-Gomez E, Glangetas C, Groc L, Wadleigh A, Massa F, Bartsch D, Marsicano G, Georges F, Chaoulouff F. Ventral tegmental area cannabinoid type-1 receptors control voluntary exercise performance. *Biol Psychiatry*. 2013 May 1;73(9):895-903. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.10.025. Epub 2012 Dec 11.

Duclos M, Gatti C, Bessière B, Mormède P. Tonic and phasic effects of corticosterone on food restriction-induced hyperactivity in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Apr;34(3):436-45. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.10.008. Epub 2008 Nov 22.

Duclos M, Ouerdani A, Mormède P, Konsman JP. Food restriction-induced hyperactivity: addiction or adaptation to famine? *Psychoneuroendocrinology*. 2013 Jun;38(6):884-97. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.09.012. Epub 2012 Oct 8.

Duxon MS, Stretton J, Starr K, Jones DN, Holland V, Riley G, Jerman J, Brough S, Smart D, Johns A, Chan W, Porter RA, Upton N. Evidence that orexin-A-evoked grooming in the rat is mediated by orexin-1 (OX1) receptors, with downstream 5-HT2C receptor involvement. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001 Jan 1;153(2):203-9.

Dyrna F, Hanske S, Krueger M, Bechmann I. The blood-brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013 Sep;8(4):763-73. doi: 10.1007/s11481-013-9473-5. Epub 2013 Jun 6.

Eddy KT, Dorer DJ, Franko DL, Tahlani K, Thompson-Brenner H, Herzog DB. Diagnostic crossover in anorexia nervosa and bulimia nervosa: implications for DSM-V. *Am J Psychiatry*. 2008 Feb;165(2):245-50. doi: 10.1176/appi.ajp.2007.07060951. Epub 2008 Jan 15.

Edelsbrunner ME, Painsipp E, Herzog H, Holzer P. Evidence from knockout mice for distinct implications of neuropeptide-Y Y2 and Y4 receptors in the circadian control of locomotion, exploration, water and food intake. *Neuropeptides*. 2009 Dec;43(6):491-7. doi: 10.1016/j.npep.2009.08.007. Epub 2009 Sep 24.

Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*. 1998 Dec 28;402(4):442-59.

Elmquist JK, Bjørbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1998 Jun 15;395(4):535-47.

Epling FW, Pierce DW, Stefan L. A theory of activity-based anorexia. Article first published online: 13 Feb 2006 DOI: 10.1002/1098-108X(198323)3:1<27::AID-EAT2260030104>3.0.CO;2-T

Erdur L, Kallenbach-Dermutz B, Lehmann V, Zimmermann-Viehoff F, Köpp W, Weber C, Deter HC. Somatic comorbidity in anorexia nervosa: First results of a 21-year follow-up study on female inpatients. *Biopsychosoc Med*. 2012 Feb 2;6(1):4. doi: 10.1186/1751-0759-6-4.

Estour B, Germain N, Diconne E, Frere D, Cottet-Emard JM, Carrot G, Lang F, Galusca B. Hormonal profile heterogeneity and short-term physical risk in restrictive anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 May;95(5):2203-10. doi: 10.1210/jc.2009-2608. Epub 2010 Mar 19.

Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci.* 2005 Nov;8(11):1481-9.

Exner C, Hebebrand J, Remschmidt H, Wewetzer C, Ziegler A, Herpertz S, Schweiger U, Blum WF, Preibisch G, Heldmaier G, Klingenspor M. Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 2000 Sep;5(5):476-81.

Fadel J, Deutch AY. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience.* 2002;111(2):379-87.

Fazeli PK, Lawson EA, Prabhakaran R, Miller KK, Donoho DA, Clemmons DR, Herzog DB, Misra M, Klibanski A. Effects of recombinant human growth hormone in anorexia nervosa: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Nov;95(11):4889-97. doi: 10.1210/jc.2010-0493. Epub 2010 Jul 28.

Fernandes-Santos C, Zhang Z, Morgan DA, Guo DF, Russo AF, Rahmouni K. Amylin acts in the central nervous system to increase sympathetic nerve activity. *Endocrinology.* 2013 Jul;154(7):2481-8. doi: 10.1210/en.2012-2172. Epub 2013 May 3.

Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, Pinilla L. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology.* 2005;82(5-6):245-55. Epub 2006 Apr 20.

Fernstrom JD, Wurtman RJ. Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science.* 1972 Oct 27;178(4059):414-6.

Ferreira JG, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ. Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience.* 2008 Apr 22;153(1):196-213. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.003. Epub 2008 Feb 15.

Ferrini F, Salio C, Lossi L, Merighi A. Ghrelin in central neurons. *Curr Neuroparmacol.* 2009 Mar;7(1):37-49. doi: 10.2174/157015909787602779.

Fetissov SO, Hamze Sinno M, Coëffier M, Bole-Feysot C, Ducrotté P, Hökfelt T, Déchelotte P. Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides: putative modulation by gut microflora. *Nutrition.* 2008 Apr;24(4):348-59. doi: 10.1016/j.nut.2007.12.006. Epub 2008 Feb 8.

Fetissov SO, Kuteeva E, Hökfelt T. Directional cues for arcuate NPY projections are present in the adult brain. *Exp Neurol.* 2003 Sep;183(1):116-23.

Figlewicz DP, Benoit SC. Insulin, leptin, and food reward: update 2008. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Jan;296(1):R9-R19. doi: 10.1152/ajpregu.90725.2008. Epub 2008 Oct 22.

Fisher M. The course and outcome of eating disorders in adults and in adolescents: a review. *Adolesc Med.* 2003 Feb;14(1):149-58.

Fodor M, Csaba Z, Kordon C, Epelbaum J. Growth hormone-releasing hormone, somatostatin, galanin and beta-endorphin afferents to the hypothalamic periventricular nucleus. *J Chem Neuroanat.* 1994 Nov;8(1):61-73.

Fomon SJ, Blumberg RW, Coursin DB, Forbes GB, Fraser D, Kaye R, Lowe CU, Sweeney MJ. Factors affecting food intake: committee on nutrition, american academy of pediatrics. *Pediatrics.* 1964 Jan;33:135-43.

Frank GK, Bailer UF, Henry SE, Drevets W, Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Wagner A, Hoge J, Ziolkowski S, Barbarich-Marsteller N, Weissfeld L, Kaye WH. Increased dopamine D2/D3 receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and [¹¹C]raclopride. *Biol Psychiatry.* 2005 Dec 1;58(11):908-12. Epub 2005 Jun 29.

Frank GK, Kaye WH. Positron emission tomography studies in eating disorders: multireceptor

brain imaging, correlates with behavior and implications for pharmacotherapy. *Nucl Med Biol*. 2005 Oct;32(7):755-61.

Freeman PH, Wellman PJ. Brown adipose tissue thermogenesis induced by low level electrical stimulation of hypothalamus in rats. *Brain Res Bull*. 1987 Jan;18(1):7-11.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005 Jan 21;307(5708):426-30. Epub 2004 Dec 16.

Fulton S, Pissios P, Manchon RP, Stiles L, Frank L, Pothos EN, Maratos-Flier E, Flier JS. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron*. 2006 Sep 21;51(6):811-22.

Galusca B, Costes N, Zito NG, Peyron R, Bossu C, Lang F, Le Bars D, Estour B. Organic background of restrictive-type anorexia nervosa suggested by increased serotonin 1A receptor binding in right frontotemporal cortex of both lean and recovered patients: [18F]MPPF PET scan study. *Biol Psychiatry*. 2008 Dec 1;64(11):1009-13. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.06.006. Epub 2008 Jul 18.

Gao Q, Horvath TL. Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30:367-98.

Garcia FD, Grigioni S, Allais E, Houy-Durand E, Thibaut F, Déchelotte P. Detection of eating disorders in patients: validity and reliability of the French version of the SCOFF questionnaire. *Clin Nutr*. 2011 Apr;30(2):178-81. doi: 10.1016/j.clnu.2010.09.007. Epub 2010 Oct 25.

Garcia FD, Houy-Durand E, Thibaut F, Dechelotte P. Obsessive compulsive disorder as a cause of atypical eating disorder: a case report. *Eur Eat Disord Rev*. 2009 Nov;17(6):444-7. doi: 10.1002/erv.961.

Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJ, Ghigo E, van der Lely AJ. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):1055-60. Epub 2004 Nov 9.

Geary N, Le Sauter J, Noh U. Glucagon acts in the liver to control spontaneous meal size in rats. *Am J Physiol*. 1993 Jan;264(1 Pt 2):R116-22.

Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:239-74.

Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS. Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci*. 2007 May 23;27(21):5730-43.

Gelegen C, van den Heuvel J, Collier DA, Campbell IC, Oppelaar H, Hessel E, Kas MJ. Dopaminergic and brain-derived neurotrophic factor signalling in inbred mice exposed to a restricted feeding schedule. *Genes Brain Behav*. 2008 Jul;7(5):552-9. doi: 10.1111/j.1601-183X.2008.00394.x.

Germain N, Galusca B, Caron-Dorval D, Martin JF, Pujos-Guillot E, Boirie Y, Khalfallah Y, Ling Y, Minnion JS, Bloom SR, Epelbaum J, Estour B. Specific appetite, energetic and metabolomics responses to fat overfeeding in resistant-to-bodyweight-gain constitutional thinness. *Nutr Diabetes*. 2014 Jul 14;4:e126. doi: 10.1038/nutd.2014.17.

Germain N, Galusca B, Grouselle D, Frere D, Billard S, Epelbaum J, Estour B. Ghrelin and obestatin circadian levels differentiate bingeing-purging from restrictive anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun;95(6):3057-62. doi: 10.1210/jc.2009-2196. Epub 2010 Mar 25.

Germain N, Galusca B, Grouselle D, Frere D, Tolle V, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B. Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: constitutional thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Apr;34(3):413-9. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.10.001. Epub 2008 Nov 7.

Germain N, Galusca B, Le Roux CW, Bossu C, Ghatte MA, Lang F, Bloom SR, Estour B. Constitutional thinness and lean anorexia nervosa display opposite concentrations of peptide YY, glucagon-like peptide 1, ghrelin, and leptin. *Am J Clin Nutr*. 2007 Apr;85(4):967-71.

Gershon MD. V. Genes, lineages, and tissue interactions in the development of the enteric nervous system. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5 Pt 1):G869-73.

Ghamari-Langroudi M, Vella KR, Srisai D, Sugrue ML, Hollenberg AN, Cone RD. Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol Endocrinol.* 2010 Dec;24(12):2366-81. doi: 10.1210/me.2010-0203. Epub 2010 Oct 13.

Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1973 Sep;84(3):488-95.

Gibson EL. Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiol Behav.* 2006 Aug 30;89(1):53-61. Epub 2006 Mar 20.

Gillberg C. Low dopamine and serotonin levels in anorexia nervosa. *Am J Psychiatry.* 1983 Jul;140(7):948-9.

Gleeson M, Brown JF, Waring JJ, Stock MJ. The effects of physical exercise on metabolic rate and dietary-induced thermogenesis. *Br J Nutr.* 1982 Mar;47(2):173-81.

Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2988.

Göke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP. Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci.* 1995 Nov 1;7(11):2294-300.

Goodman A. Addiction: definition and implications. *Br J Addict.* 1990 Nov;85(11):1403-8.

Gordon CJ. Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *Journal of Thermal Biology.* 12/2012; 37(8):654–685. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2012.08.004

Gotoh K, Fukagawa K, Fukagawa T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Hypothalamic neuronal histamine mediates the thyrotropin-releasing hormone-induced suppression of food intake. *J Neurochem.* 2007 Nov;103(3):1102-10. Epub 2007 Aug 30.

Gouba N, Raoult D, Drancourt M. Gut microeukaryotes during anorexia nervosa: a case report. *BMC Res Notes.* 2014 Jan 13;7:33. doi: 10.1186/1756-0500-7-33.

Gould BR, Zingg HH. Mapping oxytocin receptor gene expression in the mouse brain and mammary gland using an oxytocin receptor-LacZ reporter mouse. *Neuroscience.* 2003;122(1):155-67.

Grandt D, Schimiczek M, Beglinger C, Layer P, Goebell H, Eysselein VE, Reeve JR Jr. Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1-36 and PYY 3-36. *Regul Pept.* 1994 May 5;51(2):151-9.

Grandt D, Schimiczek M, Beglinger C, Layer P, Goebell H, Eysselein VE, Reeve JR Jr. Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1-36 and PYY 3-36. *Regul Pept.* 1994 May 5;51(2):151-9.

Grau GE, Fajardo LF, Piguet PF, Allet B, Lambert PH, Vassalli P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science.* 1987 Sep 4;237(4819):1210-2.

Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y, Chua SC Jr, Leibel RL, Weissenbach J, Friedman JM. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res.* 1995 Aug;5(1):5-12.

Griffioen-Roose S, Hogenkamp PS, Mars M, Finlayson G, de Graaf C. Taste of a 24-h diet and its effect on subsequent food preferences and satiety. *Appetite.* 2012 Aug;59(1):1-8. doi: 10.1016/j.appet.2012.03.013. Epub 2012 Mar 20.

Griffiths AJ, Humphreys SM, Clark ML, Fielding BA, Frayn KN. Immediate metabolic availability of dietary fat in combination with carbohydrate. *Am J Clin Nutr.* 1994 Jan;59(1):53-9.

Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Brüning JC. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci*. 2005 Oct;8(10):1289-91. Epub 2005 Sep 11.

Grove KL, Cowley MA. Is ghrelin a signal for the development of metabolic systems? *J Clin Invest*. 2005 Dec;115(12):3393-7.

Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997 Aug;48(1):23-9.

Guan XM, Yu H, Trumbauer M, Frazier E, Van der Ploeg LH, Chen H. Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuroreport*. 1998 Oct 26;9(15):3415-9.

Gueguen J, Godart N, Chambry J, Brun-Eberentz A, Foulon C, Divac Phd SM, Guelfi JD, Rouillon F, Falissard B, Huas C. Severe anorexia nervosa in men: comparison with severe AN in women and analysis of mortality. *Int J Eat Disord*. 2012 May;45(4):537-45. doi: 10.1002/eat.20987. Epub 2012 Jan 24.

Guillod-Maximin E, Roy AF, Vacher CM, Aubourg A, Bailleux V, Lorsignol A, Pénicaud L, Parquet M, Taouis M. Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J Endocrinol*. 2009 Jan;200(1):93-105. doi: 10.1677/JOE-08-0348. Epub 2008 Oct 29.

Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 29;105(17):6320-5. doi: 10.1073/pnas.0800708105. Epub 2008 Apr 28.

Guyon A, Conductier G, Rovere C, Enfissi A, Nahon JL. Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. *Peptides*. 2009 Nov;30(11):2031-9. doi: 10.1016/j.peptides.2009.05.028. Epub 2009 Jun 11.

Haberny SL, Berman Y, Meller E, Carr KD. Chronic food restriction increases D-1 dopamine receptor agonist-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and cyclic AMP response element-binding protein in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience*. 2004;125(1):289-98.

Haberny SL, Carr KD. Food restriction increases NMDA receptor-mediated calcium-calmodulin kinase II and NMDA receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated cyclic amp response element-binding protein phosphorylation in nucleus accumbens upon D-1 dopamine receptor stimulation in rats. *Neuroscience*. 2005;132(4):1035-43.

Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10911-6.

Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ. Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Jul;279(1):R47-52.

Hagan MM. Peptide YY: a key mediator of orexigenic behavior. *Peptides*. 2002 Feb;23(2):377-82.

Halatchev IG, Cone RD. Peripheral administration of PYY(3-36) produces conditioned taste aversion in mice. *Cell Metab*. 2005 Mar;1(3):159-68.

Hall JF, hanford PV. Activity as a function of a restricted feeding schedule. *J Comp Physiol Psychol*. 1954 Oct;47(5):362-3.

Hao S, Avraham Y, Bonne O, Berry EM. Separation-induced body weight loss, impairment in alternation behavior, and autonomic tone: effects of tyrosine. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001 Feb;68(2):273-81.

Harada T, Nakahara T, Yasuhara D, Kojima S, Sagiya K, Amitani H, Laviano A, Naruo T, Inui A. Obestatin, acyl ghrelin, and des-acyl ghrelin responses to an oral glucose tolerance test in the restricting type of anorexia nervosa. *Biol Psychiatry*. 2008 Jan 15;63(2):245-7. Epub 2007 Aug 16.

Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*. 2005 Sep 22;437(7058):556-9. Epub 2005 Aug 14.

Harris JA1, Benedict FG. A Biometric Study of Human Basal Metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1918 Dec;4(12):370-3.

Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JC. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 2012 Jul;63(1):3-17. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.01.007. Epub 2012 Jan 30.

Harwood HJ Jr. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology*. 2012 Jul;63(1):57-75. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.12.010. Epub 2011 Dec 17.

Haskell-Luevano C, Chen P, Li C, Chang K, Smith MS, Cameron JL, Cone RD. Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology*. 1999 Mar;140(3):1408-15.

Hasselbalch SG, Knudsen GM, Jakobsen J, Hageman LP, Holm S, Paulson OB. Brain metabolism during short-term starvation in humans. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994 Jan;14(1):125-31.

Hassouna R, Zizzari P, Tolle V. The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake. *J Neuroendocrinol*. 2010 Jul;22(7):793-804. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02019.x. Epub 2010 May 6.

Hassouna R, Zizzari P, Tomasetto C, Veldhuis JD, Fiquet O, Labarthe A, Cognet J, Steyn F, Chen C, Epelbaum J, Tolle V. An Early Reduction in GH Peak Amplitude in Preproghrelin-Deficient Male Mice Has a Minor Impact on Linear Growth. *Endocrinology*. 2014 Sep;155(9):3561-71. doi: 10.1210/en.2014-1126. Epub 2014 Jun 20.

Hassouna R, Zizzari P, Viltart O, Yang SK, Gardette R, Videau C, Badoer E, Epelbaum J, Tolle V. J Neuroendocrinol. 2010 Jul;22(7):793-804. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02019.x. Epub 2010 May 6. A natural variant of obestatin, Q90L, inhibits ghrelin's action on food intake and GH secretion and targets NPY and GHRH neurons in mice. *PLoS One*. 2012;7(12):e51135. doi: 10.1371/journal.pone.0051135. Epub 2012 Dec 10.

Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 1978 Apr 27;272(5656):827-9.

Hebebrand J, Albayrak Ö. Leptin treatment of patients with anorexia nervosa? The urgent need for initiation of clinical studies. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2012 Feb;21(2):63-6. doi: 10.1007/s00787-012-0243-3.

Heinrichs SC, Richard D. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides*. 1999 Oct;33(5):350-9.

Higuchi H. Molecular analysis of central feeding regulation by neuropeptide Y (NPY) neurons with NPY receptor small interfering RNAs (siRNAs). *Neurochem Int*. 2012 Nov;61(6):936-41. doi: 10.1016/j.neuint.2012.02.029. Epub 2012 Mar 5.

Hill J, Duckworth M, Murdock P, Rennie G, Sabido-David C, Ames RS, Szekeres P, Wilson S, Bergsma DJ, Gloger IS, Levy DS, Chambers JK, Muir AI. Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *J Biol Chem*. 2001 Jun 8;276(23):20125-9. Epub 2001 Mar 27.

Hill JW. PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012 Dec;16(Suppl 3):S627-36. doi: 10.4103/2230-8210.105581

Hillebrand JJ, de Rijke CE, Brakkee JH, Kas MJ, Adan RA. Voluntary access to a warm plate reduces hyperactivity in activity-based anorexia. *Physiol Behav*. 2005a Jun 2;85(2):151-7.

Hillebrand JJ, Kas MJ, Adan RA. alpha-MSH enhances activity-based anorexia. *Peptides*. 2005d

Oct;26(10):1690-6.

Hillebrand JJ, Koeners MP, de Rijke CE, Kas MJ, Adan RA. Leptin treatment in activity-based anorexia. *Biol Psychiatry*. 2005b Jul 15;58(2):165-71.

Hillebrand JJ, van Elburg AA, Kas MJ, van Engeland H, Adan RA. Olanzapine reduces physical activity in rats exposed to activity-based anorexia: possible implications for treatment of anorexia nervosa? *Biol Psychiatry*. 2005c Oct 15;58(8):651-7. Epub 2005 Jul 14.

Hilton JM, Chai SY, Sexton PM. In vitro autoradiographic localization of the calcitonin receptor isoforms, C1a and C1b, in rat brain. *Neuroscience*. 1995 Dec;69(4):1223-37.

Hoek HW, van Hoeken D. Review of the prevalence and incidence of eating disorders. *Int J Eat Disord*. 2003 Dec;34(4):383-96.

Hoek HW. Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and other eating disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 2006 Jul;19(4):389-94.

Holliday ND, Pollock EL, Tough IR, Cox HM. PYY preference is a common characteristic of neuropeptide Y receptors expressed in human, rat, and mouse gastrointestinal epithelia. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000 Feb;78(2):126-33.

Holst B, Schwartz TW. Ghrelin receptor mutations--too little height and too much hunger. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):637-41.

Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, Thurmon JJ, Marinelli M, DiLeone RJ. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*. 2006 Sep 21;51(6):801-10.

Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K. Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study. *Endocr J*. 2009;56(9):1119-28. Epub 2009 Sep 16.

Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paresse PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996 Aug 16;273(5277):974-7.

Howe TE, Shea B, Dawson LJ, Downie F, Murray A, Ross C, Harbour RT, Caldwell LM, Creed G. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Jul 6;(7):CD000333. doi: 10.1002/14651858.CD000333.pub2.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002 Jun;54(2):161-202.

Huang CC, Lee CC, Hsu KS. The role of insulin receptor signaling in synaptic plasticity and cognitive function. *Chang Gung Med J*. 2010 Mar-Apr;33(2):115-25.

Huang L, Tan HY, Fogarty MJ, Andrews ZB, Veldhuis JD, Herzog H, Steyn FJ, Chen C. Actions of NPY, and Its Y1 and Y2 Receptors on Pulsatile Growth Hormone Secretion during the Fed and Fasted State. *J Neurosci*. 2014 Dec 3;34(49):16309-19. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4622-13.2014.

Husain MM, Black KJ, Doraiswamy PM, Shah SA, Rockwell WJ, Ellinwood EH Jr, Krishnan KR. Subcortical brain anatomy in anorexia and bulimia. *Biol Psychiatry*. 1992 Apr 1;31(7):735-8.

Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*. 2000 Jan;148(1):1-15.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 1997 Jan 10;88(1):131-41.

Ida T, Nakahara K, Katayama T, Murakami N, Nakazato M. Effect of lateral cerebroventricular

injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res.* 1999 Mar 13;821(2):526-9.

Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 1995 Feb;11(2):69-74.

Ikemoto S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010 Nov;35(2):129-50. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.02.001. Epub 2010 Feb 10.

Ikemoto S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev.* 2007 Nov;56(1):27-78. Epub 2007 May 17.

Inagaki T, Lin VY, Goetz R, Mohammadi M, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metab.* 2008 Jul;8(1):77-83. doi: 10.1016/j.cmet.2008.05.006.

Inui A. Eating behavior in anorexia nervosa--an excess of both orexigenic and anorexigenic signalling? *Mol Psychiatry.* 2001 Nov;6(6):620-4.

Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F, Harewood L, Walters RG, Kutalik Z, Martinet D, Shen Y, ... Froguel P. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature.* 2011 Aug 31;478(7367):97-102. doi: 10.1038/nature10406.

Jappe LM, Cao L, Crosby RD, Crow SJ, Peterson CB, Le Grange D, Engel SG, Wonderlich SA. Stress and eating disorder behavior in anorexia nervosa as a function of menstrual cycle status. *Int J Eat Disord.* 2014 Mar;47(2):181-8. doi: 10.1002/eat.22211. Epub 2013 Nov 12.

Jáuregui-Garrido B, Bolaños-Ríos P, Santiago-Fernández MJ, Jáuregui-Lobera I. Lipid profile and cardiovascular risk in anorexia nervosa; the effect of nutritional treatment. *Nutr Hosp.* 2012 May-Jun;27(3):908-13. doi: 10.3305/nh.2012.27.3.5752.

Jean A, Laurent L, Bockaert J, Charnay Y, Dusticier N, Nieoullon A, Barrot M, Neve R, Compan V. The nucleus accumbens 5-HT₄-CART pathway ties anorexia to hyperactivity. *Transl Psychiatry.* 2012 Dec 11;2:e203. doi: 10.1038/tp.2012.131.

Jégou S, Boutelet I, Vaudry H. Melanocortin-3 receptor mRNA expression in pro-opiomelanocortin neurones of the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol.* 2000 Jun;12(6):501-5.

Jerlhag E, Egencioglu E, Dickson SL, Andersson M, Svensson L, Engel JA. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addict Biol.* 2006 Mar;11(1):45-54.

Johansen JE, Teixeira VL, Johansson C, Serrão P, Berggren PO, Soares-Da-Silva P, Schalling M, Bertorello AM. Altered dopaminergic transmission in the anorexic anx/anx mouse striatum. *Neuroreport.* 2001 Aug 28;12(12):2737-41.

Jørgensen JO, Møller L, Krag M, Billestrup N, Christiansen JS. Effects of growth hormone on glucose and fat metabolism in human subjects. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007 Mar;36(1):75-87.

Journel M, Chaumontet C, Darcel N, Fromentin G, Tomé D. Brain responses to high-protein diets. *Adv Nutr.* 2012 May 1;3(3):322-9. doi: 10.3945/an.112.002071.

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. 2005. *Endocrine Reviews*, 26(3), 439–451 (Review)

Kalivas PW, Duffy P, Latimer LG. Neurochemical and behavioral effects of corticotropin-releasing factor in the ventral tegmental area of the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 Sep;242(3):757-63.

Kanarek RB, D'Anci KE, Jurdak N, Mathes WF. Running and addiction: precipitated withdrawal in a rat model of activity-based anorexia. *Behav Neurosci.* 2009 Aug;123(4):905-12. doi: 10.1037/a0015896.

Karczewska-Kupczewska M, Adamska A, Nikolajuk A, Otziomek E, Górska M, Kowalska I,

Strączkowski M. Circulating interleukin 6 and soluble forms of its receptors in relation to resting energy expenditure in women with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013 Dec;79(6):812-6. doi: 10.1111/cen.12118. Epub 2013 May 6.

Kawahara Y, Kaneko F, Yamada M, Kishikawa Y, Kawahara H, Nishi A. Food reward-sensitive interaction of ghrelin and opioid receptor pathways in mesolimbic dopamine system. *Neuropharmacology*. 2013 Apr;67:395-402. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.11.022. Epub 2012 Dec 7.

Kawahara Y, Kawahara H, Kaneko F, Yamada M, Nishi Y, Tanaka E, Nishi A. Peripherally administered ghrelin induces bimodal effects on the mesolimbic dopamine system depending on food-consumptive states. *Neuroscience*. 2009 Jul 7;161(3):855-64. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.03.086. Epub 2009 Apr 8.

Kawano M, Kawasaki A, Sakata-Haga H, Fukui Y, Kawano H, Nogami H, Hisano S. Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2006 Oct 10;498(5):581-92.

Kaye WH, Ebert MH, Raleigh M, Lake R. Abnormalities in CNS monoamine metabolism in anorexia nervosa. *Arch Gen Psychiatry*. 1984 Apr;41(4):350-5.

Kaye WH, Fudge JL, Paulus M. New insights into symptoms and neurocircuit function of anorexia nervosa. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Aug;10(8):573-84. doi: 10.1038/nrn2682. Epub 2009 Jul 15.

Keeley RJ, Zelinski EL, Fehr L, McDonald RJ. The effect of exercise on carbohydrate preference in female rats. *Brain Res Bull*. 2014 Feb;101:45-50. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.12.008. Epub 2014 Jan 7.

Keire DA, Mannon P, Kobayashi M, Walsh JH, Solomon TE, Reeve JR Jr. Primary structures of PYY, [Pro(34)]PYY, and PYY-(3-36) confer different conformations and receptor selectivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Jul;279(1):G126-31.

Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav*. 2005 Dec 15;86(5):773-95. Epub 2005 Nov 14.

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 May;11(5):630-7.

Khan AM, Kaminski KL, Sanchez-Watts G, Ponzio TA, Kuzmiski JB, Bains JS, Watts AG. MAP kinases couple hindbrain-derived catecholamine signals to hypothalamic adrenocortical control mechanisms during glycemia-related challenges. *J Neurosci*. 2011 Dec 14;31(50):18479-91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4785-11.2011.

Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev*. 1999 Dec;20(6):876-913.

Kim SF. Animal models of eating disorders. *Neuroscience*. 2012 Jun 1;211:2-12. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.03.024. Epub 2012 Mar 21.

King BM. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*. 2006 Feb 28;87(2):221-44. Epub 2006 Jan 18.

Kingston K, Szmukler G, Andrewes D, Tress B, Desmond P. Neuropsychological and structural brain changes in anorexia nervosa before and after refeeding. *Psychol Med*. 1996 Jan;26(1):15-28.

Kinzig KP, Coughlin JW, Redgrave GW, Moran TH, Guarda AS. Insulin, glucose, and pancreatic polypeptide responses to a test meal in restricting type anorexia nervosa before and after weight restoration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 May;292(5):E1441-6. Epub 2007 Jan 30.

Kirov SA, Talan MI, Kosheleva NA, Engel BT. Nonshivering thermogenesis during acute cold exposure in adult and aged C57BL/6J mice. *Exp Gerontol*. 1996 May-Jun;31(3):409-19.

Kleinz MJ, Maguire JJ, Skepper JN, Davenport AP. Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. *Cardiovasc Res*. 2006 Jan;69(1):227-35. Epub 2005 Oct 12. Camiña JP. Cell biology of the ghrelin receptor. *J*

Neuroendocrinol. 2006 Jan;18(1):65-76.

Klenotich SJ, Dulawa SC. The activity-based anorexia mouse model. *Methods Mol Biol*. 2012;829:377-93. doi: 10.1007/978-1-61779-458-2_25.

Koda S, Date Y, Murakami N, Shimbara T, Hanada T, Toshinai K, Nijima A, Furuya M, Inomata N, Osuye K, Nakazato M. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology*. 2005 May;146(5):2369-75. Epub 2005 Feb 17.

Kohl M, Foulon C, Guelfi JD. Hyperactivity and anorexia nervosa: behavioural and biological perspective. *Encephale*. 2004 Sep-Oct;30(5):492-9.

Koizumi A, Tsukada M, Wada Y, Masuda H, Weindruch R. Mitotic activity in mice is suppressed by energy restriction-induced torpor. *J Nutr*. 1992 Jul;122(7):1446-53.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):656-60.

Koob GF, Riley SJ, Smith SC, Robbins TW. Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens septi and olfactory tubercle on feeding, locomotor activity, and amphetamine anorexia in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1978 Oct;92(5):917-27.

Korotkova TM, Brown RE, Sergeeva OA, Ponomarenko AA, Haas HL. Effects of arousal- and feeding-related neuropeptides on dopaminergic and GABAergic neurons in the ventral tegmental area of the rat. *Eur J Neurosci*. 2006 May;23(10):2677-85.

Kosmiski L, Schmiede SJ, Mascolo M, Gaudiani J, Mehler PS. Chronic starvation secondary to anorexia nervosa is associated with an adaptive suppression of resting energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Mar;99(3):908-14. doi: 10.1210/jc.2013-1694. Epub 2013 Dec 3.

Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, Maratos-Flier E, Roth BL, Lowell BB. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest*. 2011 Apr;121(4):1424-8. doi: 10.1172/JCI46229.

Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988 Apr 8;53(1):45-53.

Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab*. 2007 Jul;6(1):55-68.

Kumai M, Tamai H, Fujii S, Nakagawa T, Aoki TT. Glucagon secretion in anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr*. 1988 Feb;47(2):239-42.

Kyrou I, Chrousos GP, Tsigos C. Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Nov;1083:77-110.

Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall RA, Kuhar MJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett*. 2005 Aug 12-19;384(1-2):198-202.

Lam YY, Mitchell AJ, Holmes AJ, Denyer GS, Gummesson A, Caterson ID, Hunt NH, Storlien LH. Role of the gut in visceral fat inflammation and metabolic disorders. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Nov;19(11):2113-20. doi: 10.1038/oby.2011.68. Epub 2011 Sep 1.

Lamers KJ, Doesburg WH, Gabreëls FJ, Romsom AC, Lemmens WA, Wevers RA, Renier WO. CSF concentration and CSF/blood ratio of fuel related components in children after prolonged fasting. *Clin Chim Acta*. 1987 Aug 14;167(2):135-45.

Lamont EW, Patterson Z, Rodrigues T, Vallejos O, Blum ID, Abizaid A. Ghrelin-deficient mice have fewer orexin cells and reduced cFOS expression in the mesolimbic dopamine pathway under a restricted

feeding paradigm. *Neuroscience*. 2012 Aug 30;218:12-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.046. Epub 2012 May 26.

Landt M, Lawson GM, Helgeson JM, Davila-Roman VG, Ladenson JH, Jaffe AS, Hickner RC. Prolonged exercise decreases serum leptin concentrations. *Metabolism*. 1997 Oct;46(10):1109-12.

Langhans W, Zeiger U, Scharrer E, Geary N. Stimulation of feeding in rats by intraperitoneal injection of antibodies to glucagon. *Science*. 1982 Nov 26;218(4575):894-6.

Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab*. 2013 Apr 2;17(4):607-17. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.004.

Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C. Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*. 1997 Mar;77(1):257-70.

Lawson EA, Holsen LM, Desanti R, Santin M, Meenaghan E, Herzog DB, Goldstein JM, Klibanski A. Increased hypothalamic-pituitary-adrenal drive is associated with decreased appetite and hypoactivation of food-motivation neurocircuitry in anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*. 2013 Oct 1;169(5):639-47. doi: 10.1530/EJE-13-0433. Print 2013 Nov.

Lawson EA, Klibanski A. Endocrine abnormalities in anorexia nervosa. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Jul;4(7):407-14. doi: 10.1038/ncpendmet0872. Epub 2008 Jun 10.

Lawson EA, Klibanski A. Endocrine abnormalities in anorexia nervosa. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Jul;4(7):407-14. doi: 10.1038/ncpendmet0872. Epub 2008 Jun 10.

Le Foll C, Dunn-Meynell A, Musatov S, Magnan C, Levin BE. FAT/CD36: a major regulator of neuronal fatty acid sensing and energy homeostasis in rats and mice. *Diabetes*. 2013 Aug;62(8):2709-16. doi: 10.2337/db12-1689. Epub 2013 Apr 4.

Le Sauter J, Noh U, Geary N. Hepatic portal infusion of glucagon antibodies increases spontaneous meal size in rats. *Am J Physiol*. 1991 Jul;261(1 Pt 2):R162-5.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996 Feb 15;379(6566):632-5.

Lee SJ, Kirigiti M, Lindsley SR, Loche A, Madden CJ, Morrison SF, Smith MS, Grove KL. Efferent projections of neuropeptide Y-expressing neurons of the dorsomedial hypothalamus in chronic hyperphagic models. *J Comp Neurol*. 2013 Jun 1;521(8):1891-914. doi: 10.1002/cne.23265.

Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1997 Jun;138(6):2569-76.

Legroux-Gérot I, Vignau J, Biver E, Pigny P, Collier F, Marchandise X, Duquesnoy B, Cortet B. Anorexia nervosa, osteoporosis and circulating leptin: the missing link. *Osteoporos Int*. 2010 Oct;21(10):1715-22. doi: 10.1007/s00198-009-1120-x. Epub 2010 Jan 6.

Legroux-Gérot I, Vignau J, Collier F, Cortet B. Bone loss associated with anorexia nervosa. *Joint Bone Spine*. 2005 Dec;72(6):489-95.

Legroux-Gérot I, Vignau J, Collier F, Cortet B. Factors influencing changes in bone mineral density in patients with anorexia nervosa-related osteoporosis: the effect of hormone replacement therapy. *Calcif Tissue Int*. 2008 Nov;83(5):315-23. doi: 10.1007/s00223-008-9173-y. Epub 2008 Oct 4.

Legroux-Gérot I, Vignau J, D'Herbomez M, Collier F, Marchandise X, Duquesnoy B, Cortet B. Evaluation of bone loss and its mechanisms in anorexia nervosa. *Calcif Tissue Int*. 2007 Sep;81(3):174-82. Epub 2007 Aug 1.

Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*. 2004 Mar;25(3):473-504.

Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA. Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes*. 2004 Oct;53(10):2521-8.

Lewis DY, Brett RR. Activity-based anorexia in C57/BL6 mice: effects of the phytocannabinoid, Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and the anandamide analogue, OMDM-2. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010 Sep;20(9):622-31. doi: 10.1016/j.euroneuro.2010.04.002. Epub 2010 May 14.

Lewis LD, Williams JA. Regulation of cholecystokinin secretion by food, hormones, and neural pathways in the rat. *Am J Physiol* 1990 Apr;258(4 Pt 1):G512-8.

Lin L, Nuotio-Antar AM2, Ma X3, Liu F4, Fiorotto ML2, Sun Y5. Ghrelin Receptor Regulates Appetite and Satiety during Aging in Mice by Regulating Meal Frequency and Portion Size but Not Total Food Intake. *J Nutr*. 2014 Sep;144(9):1349-55. doi: 10.3945/jn.114.191171. Epub 2014 Jul 2.

Lin S, Lin EJ, Boey D, Lee NJ, Slack K, During MJ, Sainsbury A, Herzog H. Fasting inhibits the growth and reproductive axes via distinct Y2 and Y4 receptor-mediated pathways. *Endocrinology*. 2007 May;148(5):2056-65. Epub 2007 Feb 1.

Lindfors C, Nilsson IA, Garcia-Roves PM, Zuberi AR, Karimi M, Donahue LR, Roopenian DC, Mulder J, Uhlén M, Ekström TJ, Davisson MT, Hökfelt TG, Schalling M, Johansen JE. Hypothalamic mitochondrial dysfunction associated with anorexia in the anx/anx mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 1;108(44):18108-13. doi: 10.1073/pnas.1114863108. Epub 2011 Oct 24.

Livingston EH, Kohlstadt I. Simplified resting metabolic rate-predicting formulas for normal-sized and obese individuals. *Obes Res*. 2005 Jul;13(7):1255-62.

Lodeiro M, Alén BO, Mosteiro CS, Beiroa D, Nogueiras R, Theodoropoulou M, Pardo M, Gallego R, Pazos Y, Casanueva FF, Camiña JP. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates Akt signaling in the ghrelin/GHSR1a system. *Mol Biol Cell*. 2011 Nov;22(21):4182-91. doi: 10.1091/mbc.E11-04-0373. Epub 2011 Sep 7.

Lodge DJ, Grace AA. The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 28;103(13):5167-72. Epub 2006 Mar 20.

López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodríguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castañeda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschöp MH, Diéguez C, Vidal-Puig A. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab*. 2008 May;7(5):389-99. doi: 10.1016/j.cmet.2008.03.006.

Lovegrove BG. The influence of climate on the basal metabolic rate of small mammals: a slow-fast metabolic continuum. *J Comp Physiol B*. 2003 Mar;173(2):87-112. Epub 2003 Feb 7.

Lovick TA. CCK as a modulator of cardiovascular function. *J Chem Neuroanat*. 2009 Nov;38(3):176-84. doi: 10.1016/j.jchemneu.2009.06.007. Epub 2009 Jun 27.

Lucas S1, Taront S, Magnan C, Fauconnier L, Delacre M, Macia L, Delanoye A, Verwaerde C, Spriet C, Saule P, Goormachtigh G, Héliot L, Ktorza A, Movassat J, Polakowska R, Auriault C, Poulain-Godefroy O, Di Santo J, Froguel P, Wolowczuk I. Interleukin-7 regulates adipose tissue mass and insulin sensitivity in high-fat diet-fed mice through lymphocyte-dependent and independent mechanisms. *PLoS One*. 2012;7(6):e40351. doi: 10.1371/journal.pone.0040351. Epub 2012 Jun 29.

Luque RM, Park S, Kineman RD. Severity of the catabolic condition differentially modulates hypothalamic expression of growth hormone-releasing hormone in the fasted mouse: potential role of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 2007 Jan;148(1):300-9. Epub 2006 Oct 12.

Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science*. 2005 Oct 28;310(5748):683-5.

Lusk G. Metabolism in fever. 1928. *Nutrition*. 1993 May-Jun;9(3):282-96.

Lutz TA. The role of amylin in the control of energy homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp*

Physiol. 2010 Jun;298(6):R1475-84. doi: 10.1152/ajpregu.00703.2009. Epub 2010 Mar 31.

Lynn SE, Breuner CW, Wingfield JC. Short-term fasting affects locomotor activity, corticosterone, and corticosterone binding globulin in a migratory songbird. *Horm Behav.* 2003 Jan;43(1):150-7.

Macia L, Viltart O, Delacre M, Sachot C, Hélot L, Di Santo JP, Wolowczuk I. Interleukin-7, a new cytokine targeting the mouse hypothalamic arcuate nucleus: role in body weight and food intake regulation. *PLoS One.* 2010 Apr 1;5(4):e9953. doi: 10.1371/journal.pone.0009953.

Macneil DJ. The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013 Apr 22;4:49. doi: 10.3389/fendo.2013.00049. eCollection 2013.

Magnan C, Collins S, Berthault MF, Kassis N, Vincent M, Gilbert M, Pénicaud L, Ktorza A, Assimacopoulos-Jeannet F. Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose. *J Clin Invest.* 1999 Feb;103(3):413-9.

Malaisse-Lagae F, Carpentier JL, Patel YC, Malaisse WJ, Orci L. Pancreatic polypeptide: a possible role in the regulation of food intake in the mouse. *Hypothesis. Experientia.* 1977 Jul 15;33(7):915-7.

Malik S, McGlone F, Bedrossian D, Dagher A. Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behavior. *Cell Metab.* 2008 May;7(5):400-9. doi: 10.1016/j.cmet.2008.03.007.

Maltais LJ, Lane PW, Beamer WG. Anorexia, a recessive mutation causing starvation in preweanling mice. *J Hered.* 1984 Nov-Dec;75(6):468-72.

Mano-Otagiri A, Ohata H, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, Shibasaki T. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *J Endocrinol.* 2009 Jun;201(3):341-9. doi: 10.1677/JOE-08-0374. Epub 2009 Apr 7.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 Nov;26(11):1407-33.

Margules DL, olds J. Identical "feeding" and "rewarding" systems in the lateral hypothalamus of rats. *Science.* 1962 Feb 2;135(3501):374-5.

Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1):119-22.

Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE, Palmiter RD. Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med.* 1998 Jun;4(6):718-21.

Martini AC, Fernández-Fernández R, Tovar S, Navarro VM, Vigo E, Vazquez MJ, Davies JS, Thompson NM, Aguilar E, Pinilla L, Wells T, Dieguez C, Tena-Sempere M. Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology.* 2006 May;147(5):2374-82. Epub 2006 Feb 2.

Matsuzaki I, Sakurai T, Kunii K, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K. Involvement of the serotonergic system in orexin-induced behavioral alterations in rats. *Regul Pept.* 2002 Mar 15;104(1-3):119-23.

Mayer J. Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1955 Jul 15;63(1):15-43.

McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav.* 2003 Jan;43(1):2-15.

McEwen BS. Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry.* 2003 Aug 1;54(3):200-7.

McFarlane MR, Brown MS, Goldstein JL, Zhao TJ. Induced ablation of ghrelin cells in adult mice does not decrease food intake, body weight, or response to high-fat diet. *Cell Metab.* 2014 Jul 1;20(1):54-60. doi: 10.1016/j.cmet.2014.04.007. Epub 2014 May 15.

McGowan MK, Andrews KM, Fenner D, Grossman SP. Chronic intrahypothalamic insulin infusion in the rat: behavioral specificity. *Physiol Behav.* 1993 Nov;54(5):1031-4.

McLean JA, Tobin G. *Animal and Human Calorimetry* Cambridge: Cambridge. University Press. 1987.

McMahon LR, Wellman PJ. Decreased intake of a liquid diet in nonfood-deprived rats following intra-PVN injections of GLP-1 (7-36) amide. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997 Nov;58(3):673-7.

McMahon LR, Wellman PJ. PVN infusion of GLP-1-(7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *Am J Physiol.* 1998 Jan;274(1 Pt 2):R23-9.

Mebel DM, Wong JC, Dong YJ, Borgland SL. Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increased reuptake. *Eur J Neurosci.* 2012 Aug;36(3):2336-46. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08168.x. Epub 2012 Jun 20.

Méquinion M, Langlet F, Zgheib S, Dickson S, Dehouck B, Chauveau C, Viltart O. Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013 Feb 26;4:15. doi: 10.3389/fendo.2013.00015. eCollection 2013.

Mercader JM, González JR, Lozano JJ, Bak M, Kauppinen S, Sumoy L, Dierssen M, Fernández-Aranda F, Visa J, Gratacòs M, Estivill X. Aberrant brain microRNA target and miRISC gene expression in the anx/anx anorexia mouse model. *Gene.* 2012 Apr 15;497(2):181-90. doi: 10.1016/j.gene.2012.01.057. Epub 2012 Jan 30.

Merkestein M, van Gestel MA, van der Zwaal EM, Brans MA, Luijendijk MC, van Rozen AJ, Hendriks J, Garner KM, Boender AJ, Pandit R, Adan R. GHS-R1a signaling in the DMH and VMH contributes to food anticipatory activity. *Int J Obes (Lond).* 2014 Apr;38(4):610-8. doi: 10.1038/ijo.2013.131. Epub 2013 Jul 25.

Mieda M, Williams SC, Sinton CM, Richardson JA, Sakurai T, Yanagisawa M. Orexin neurons function in an efferent pathway of a food-entrainable circadian oscillator in eliciting food-anticipatory activity and wakefulness. *J Neurosci.* 2004 Nov 17;24(46):10493-501.

Mietlicki-Baase EG, Reiner DJ, Cone JJ, Olivos DR, McGrath LE, Zimmer DJ, Roitman MF, Hayes MR. Amylin Modulates the Mesolimbic Dopamine System to Control Energy Balance. *Neuropsychopharmacology.* 2014 Jul 18. doi: 10.1038/npp.2014.180. [Epub ahead of print]

Mikkelsen PB, Toubro S, Astrup A. Effect of fat-reduced diets on 24-h energy expenditure: comparisons between animal protein, vegetable protein, and carbohydrate. *Am J Clin Nutr.* 2000 Nov;72(5):1135-41.

Miljic D, Pekic S, Djurovic M, Doknic M, Milic N, Casanueva FF, Ghatei M, Popovic V. Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol release in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Apr;91(4):1491-5. Epub 2006 Jan 31.

Millar HR, Wardell F, Vyvyan JP, Naji SA, Prescott GJ, Eagles JM. Anorexia nervosa mortality in Northeast Scotland, 1965-1999. *Am J Psychiatry.* 2005 Apr;162(4):753-7.

Miller KK. Endocrine effects of anorexia nervosa. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013 Sep;42(3):515-28. doi: 10.1016/j.ecl.2013.05.007.

Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, Vialettes B, Raoult D. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes (Lond).* 2013 Nov;37(11):1460-6. doi: 10.1038/ijo.2013.20. Epub 2013 Mar 5.

Misra M, Klibanski A. Endocrine consequences of anorexia nervosa. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 Jul;2(7):581-92. doi: 10.1016/S2213-8587(13)70180-3. Epub 2014 Apr 2.

Misra M, Klibanski A. The neuroendocrine basis of anorexia nervosa and its impact on bone metabolism. *Neuroendocrinology.* 2011;93(2):65-73. doi: 10.1159/000323771. Epub 2011 Jan 13.

Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Aggarwal A, Herzog DB, Neubauer G, Breu J, Klibanski A. Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3486-95.

- Misra M, Miller KK, Cord J, Prabhakaran R, Herzog DB, Goldstein M, Katzman DK, Klibanski A. Relationships between serum adipokines, insulin levels, and bone density in girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;92(6):2046-52. Epub 2007 Mar 13.
- Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, Herzog DB, Klibanski A. Secretory dynamics of leptin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005a Sep;289(3):E373-81. Epub 2005 Apr 5.
- Misra M, Miller KK, Tsai P, Gallagher K, Lin A, Lee N, Herzog DB, Klibanski A. Elevated peptide YY levels in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar;91(3):1027-33. Epub 2005b Nov 8.
- Misra M, Tsai P, Anderson EJ, Hubbard JL, Gallagher K, Soyka LA, Miller KK, Herzog DB, Klibanski A. Nutrient intake in community-dwelling adolescent girls with anorexia nervosa and in healthy adolescents. *Am J Clin Nutr*. 2006 Oct;84(4):698-706.
- Mistlberger RE. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 1994 Summer;18(2):171-95.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec;82(12):4196-200.
- Mokrosiński J, Holst B. Modulation of the constitutive activity of the ghrelin receptor by use of pharmacological tools and mutagenesis. *Methods Enzymol*. 2010;484:53-73. doi: 10.1016/B978-0-12-381298-8.00003-4.
- Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2000 Aug;11(6):212-7.
- Møller N, Copeland KC, Nair KS. Growth hormone effects on protein metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2007 Mar;36(1):89-100.
- Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*. 1998 Sep;47(9):1384-91.
- Moran TH, Kinzig KP. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Feb;286(2):G183-8.
- Morley JE, Levine AS, Grace M, Kneip J. Peptide YY (PYY), a potent orexigenic agent. *Brain Res*. 1985 Aug 19;341(1):200-3.
- Morton GJ, Blevins JE, Kim F, Matsen M, Figlewicz DP. The action of leptin in the ventral tegmental area to decrease food intake is dependent on Jak-2 signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jul;297(1):E202-10. doi: 10.1152/ajpendo.90865.2008. Epub 2009 May 12.
- Morton GJ, Kaiyala KJ, Fisher JD, Ogimoto K, Schwartz MW, Wisse BE. Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 Feb;300(2):E392-401. doi: 10.1152/ajpendo.00546.2010. Epub 2010 Nov 9.
- Moullé VS, Picard A, Le Foll C, Levin BE, Magnan C. Lipid sensing in the brain and regulation of energy balance. *Diabetes Metab*. 2014 Feb;40(1):29-33. doi: 10.1016/j.diabet.2013.10.001. Epub 2013 Nov 7.
- Mozid AM, Tringali G, Forsling ML, Hendricks MS, Ajodha S, Edwards R, Navarra P, Grossman AB, Korbonits M. Ghrelin is released from rat hypothalamic explants and stimulates corticotrophin-releasing hormone and arginine-vasopressin. *Horm Metab Res*. 2003 Aug;35(8):455-9.
- Muccioli G, Lorenzi T, Lorenzi M, Ghè C, Arnoletti E, Raso GM, Castellucci M, Gualillo O, Meli R. Beyond the metabolic role of ghrelin: a new player in the regulation of reproductive function. *Peptides*. 2011 Dec;32(12):2514-21. doi: 10.1016/j.peptides.2011.10.020. Epub 2011 Oct 29.
- Mueckler M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*. 1994 Feb 1;219(3):713-25.

- Müller TD, Tschöp MH, Jarick I, Ehrlich S, Scherag S, Herpertz-Dahlmann B, Zipfel S, Herzog W, de Zwaan M, Burghardt R, Fleischhaker C, Klampfl K, Wewetzer C, Herpertz S, Zeeck A, Tagay S, Burgmer M, Pfluger PT, Scherag A, Hebebrand J, Hinney A. Genetic variation of the ghrelin activator gene ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is associated with anorexia nervosa. *J Psychiatr Res.* 2011 May;45(5):706-11. doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.10.001. Epub 2010 Oct 29.
- Murphy KG, Dhillon WS, Bloom SR. Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Endocr Rev.* 2006 Dec;27(7):719-27. Epub 2006 Oct 31.
- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res.* 2000 Aug 4;873(1):181-7.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 2001 Jan 11;409(6817):194-8.
- Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T. Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci.* 2006 Jan 11;26(2):398-405.
- Nelson JF, Gosden RG, Felicio LS. Effect of dietary restriction on estrous cyclicity and follicular reserves in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod.* 1985 Apr;32(3):515-22.
- Nestler EJ. Under siege: The brain on opiates. *Neuron.* 1996 May;16(5):897-900.
- Nilsson IA, Lindfors C, Schalling M, Hökfelt T, Johansen JE. Anorexia and hypothalamic degeneration. *Vitam Horm.* 2013;92:27-60. doi: 10.1016/B978-0-12-410473-0.00002-7.
- No authors listed (Atwater, Benedict) Nutrition classics. A respiration calorimeter with appliances for the direct determination of oxygen. Carnegie Institution of Washington, 1905. *Nutr Rev.* 1983 Nov;41(11):353-6.
- Noda M, Sakuta H. Central regulation of body-fluid homeostasis. *Trends Neurosci.* 2013 Nov;36(11):661-73. doi: 10.1016/j.tins.2013.08.004. Epub 2013 Sep 7.
- Nova E, Marcos A. Immunocompetence to assess nutritional status in eating disorders. *Expert Rev Clin Immunol.* 2006 May;2(3):433-44. doi: 10.1586/1744666X.2.3.433.
- Novak CM1, Jiang X, Wang C, Teske JA, Kotz CM, Levine JA. Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett.* 2005 Jul 22-29;383(1-2):99-104. Epub 2005 Apr 20.
- Oades RD, Halliday GM. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res.* 1987 May;434(2):117-65.
- Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes.* 2002 Feb;51(2):271-5.
- Ogawa A, Harris V, McCorkle SK, Unger RH, Luskey KL. Amylin secretion from the rat pancreas and its selective loss after streptozotocin treatment. *J Clin Invest.* 1990 Mar;85(3):973-6.
- Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, Inui A. Ghrelin and anorexia nervosa: a psychosomatic perspective. *Nutrition.* 2011 Oct;27(10):988-93. doi: 10.1016/j.nut.2011.05.005. Epub 2011 Aug 25.
- Ohlsson C, Mohan S, Sjögren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, Jansson JO, Svensson J. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev.* 2009 Aug;30(5):494-535. doi: 10.1210/er.2009-0010. Epub 2009 Jul 9.
- Olds J. Satiation effects in self-stimulation of the brain. *J Comp Physiol Psychol.* 1958 Dec;51(6):675-8.
- Oliveira CR, Meneguz-Moreno RA, Aguiar-Oliveira MH, Barreto-Filho JA. Emerging role of the GH/IGF-I on cardiometabolic control. *Arq Bras Cardiol.* 2011 Nov;97(5):434-9.
- Olson VG, Nestler EJ. Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral

tegmental area of the rat. *Synapse*. 2007 Feb;61(2):87-95.

Onaka T, Takayanagi Y, Yoshida M. Roles of oxytocin neurones in the control of stress, energy metabolism, and social behaviour. *J Neuroendocrinol*. 2012 Apr;24(4):587-98. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02300.x.

Opherk C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmüller D, Schulze A, Schmid W, Schütz G. Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol*. 2004 Jun;18(6):1346-53. Epub 2004 Mar 18.

Oshima K, Nampei A, Matsuda M, Iwaki M, Fukuhara A, Hashimoto J, Yoshikawa H, Shimomura I. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jun 3;331(2):520-6.

Osterstock G, Escobar P, Mitutsova V, Gouty-Colomer LA, Fontanaud P, Molino F, Fehrentz JA, Carmignac D, Martinez J, Guerineau NC, Robinson IC, Mollard P, Méry PF. Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. *PLoS One*. 2010 Feb 11;5(2):e9159. doi: 10.1371/journal.pone.0009159.

Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S, Pedersen BK. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol*. 1998 May 1;508 (Pt 3):949-53.

Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschöp M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*. 2001 Nov;145(5):669-73.

Overton JM, Williams TD. Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. *Physiol Behav*. 2004 Jul;81(5):749-54.

Painsipp E, Wultsch T, Edelsbrunner ME, Tasan RO, Singewald N, Herzog H, Holzer P. Reduced anxiety-like and depression-related behavior in neuropeptide Y Y4 receptor knockout mice. *Genes Brain Behav*. 2008 Jul;7(5):532-42. doi: 10.1111/j.1601-183X.2008.00389.x.

Palmiter RD. Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1129:35-46. doi: 10.1196/annals.1417.003.

Pandit R, Luijendijk MC, Vanderschuren LJ, la Fleur SE, Adan RA. Limbic substrates of the effects of neuropeptide Y on intake of and motivation for palatable food. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 May;22(5):1216-9. doi: 10.1002/oby.20718. Epub 2014 Feb 19.

Panksepp J, Rossi J 3rd. D-glucose infusions into the basal ventromedial hypothalamus and feeding. *Behav Brain Res*. 1981 Nov;3(3):381-92.

Papadopoulos FC, Ekblom A, Brandt L, Ekselius L. Excess mortality, causes of death and prognostic factors in anorexia nervosa. *Br J Psychiatry*. 2009 Jan;194(1):10-7. doi: 10.1192/bjp.bp.108.054742.

Pardo M, Roca-Rivada A, Al-Massadi O, Seoane LM, Camiña JP, Casanueva FF. Peripheral leptin and ghrelin receptors are regulated in a tissue-specific manner in activity-based anorexia. *Peptides*. 2010 Oct;31(10):1912-9. doi: 10.1016/j.peptides.2010.06.022. Epub 2010 Jun 30.

Parker RM, Herzog H. Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *Eur J Neurosci*. 1999 Apr;11(4):1431-48.

Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphée CH, Smith SA. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan 10;300(2):472-6.

Pederson KJ, Roerig JL, Mitchell JE. Towards the pharmacotherapy of eating disorders. *Expert Opin Pharmacother*. 2003 Oct;4(10):1659-78.

Pedrazzini T, Seydoux J, Künstner P, Aubert JF, Grouzmann E, Beermann F, Brunner HR. Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor.

Nat Med. 1998 Jun;4(6):722-6.

Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol*. 2000 Dec;143(6):R11-4.

Pemberton CJ, Richards AM. Biochemistry of ghrelin precursor peptides. *Vitam Horm*. 2008;77:13-30.

Penicaud L, Le Magnen J. Recovery of body weight following starvation or food restriction in rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 1980;4 Suppl 1:47-52.

Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Woloszyn J, Yanagisawa M, Lutter M, Zigman JM. Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatry*. 2010 May 1;67(9):880-6. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.10.030. Epub 2009 Dec 24.

Perret J, De Vriese C, Delporte C. Polymorphisms for ghrelin with consequences on satiety and metabolic alterations. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014 Jul;17(4):306-11. doi: 10.1097/MCO.0000000000000072.

Pimentel GD, Ganeshan K, Carvalheira JB. Hypothalamic inflammation and the central nervous system control of energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jun 18. pii: S0303-7207(14)00179-8. doi: 10.1016/j.mce.2014.06.005. [Epub ahead of print]

Pinkston M, Martz D, Domer F, Curtin L, Bazzini D, Smith L, Henson D. Psychological, nutritional, and energy expenditure differences in college females with anorexia nervosa vs. comparable-mass controls. *Eat Behav*. 2001 Summer;2(2):169-81.

Piquard F, Schaefer A, Haberey P. Influence of fasting and protein deprivation on food self-selection in the rat. *Physiol Behav*. 1978 Jun;20(6):771-8.

Pirke KM, Pahl J, Schweiger U, Warnhoff M. Metabolic and endocrine indices of starvation in bulimia: a comparison with anorexia nervosa. *Psychiatry Res*. 1985 May;15(1):33-9.

Pjetri E, de Haas R, de Jong S, Gelegen C, Oppelaar H, Verhagen LA, Eijkemans MJ, Adan RA, Olivier B, Kas MJ. Identifying predictors of activity based anorexia susceptibility in diverse genetic rodent populations. *PLoS One*. 2012;7(11):e50453. doi: 10.1371/journal.pone.0050453. Epub 2012 Nov 30.

Polak JM, Bloom SR, Rayford PL, Pearse AG, Buchan AM, Thompson JC. Identification of cholecystokinin-secreting cells. *Lancet*. 1975 Nov 22;2(7943):1016-8.

Porte DJr., Halter, JB. The endocrine pancreas and diabetes mellitus. In R. H. Williams (Ed), *Textbook of endocrinology* (pp. 716-843). 1981. Philadelphia: Saunders

Pothoff MJ, Inagaki T, Satapati S, Ding X, He T, Goetz R, Mohammadi M, Finck BN, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, Burgess SC. FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 30;106(26):10853-8. doi: 10.1073/pnas.0904187106. Epub 2009 Jun 16.

Pulman KJ, Fry WM, Cottrell GT, Ferguson AV. The subfornical organ: a central target for circulating feeding signals. *J Neurosci*. 2006 Feb 15;26(7):2022-30.

Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*. 2004 May;10(5):524-9. Epub 2004 Apr 11.

Qian J, Hu Q2, Wan Y2, Li T2, Wu M2, Ren Z1, Yu D1. Prevalence of eating disorders in the general population: a systematic review. *Shanghai Arch Psychiatry*. 2013 Aug;25(4):212-23. doi: 10.3969/j.issn.1002-0829.2013.04.003.

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. 1996 Mar 21;380(6571):243-7.

Rada PV, Mark GP, Yeomans JJ, Hoebel BG. Acetylcholine release in ventral tegmental area by

hypothalamic self-stimulation, eating, and drinking. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000 Mar;65(3):375-9.

Rangwala SM, Rich AS, Rhoades B, Shapiro JS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes.* 2004 Aug;53(8):1937-41. Epub 2004 Jun 9.

Raposo PD, Pierroz DD, Broqua P, White RB, Pedrazzini T, Aubert ML. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Dec 20;185(1-2):195-204.

Rask-Andersen M, Olszewski PK, Levine AS, Schiöth HB. Molecular mechanisms underlying anorexia nervosa: focus on human gene association studies and systems controlling food intake. *Brain Res Rev.* 2010 Mar;62(2):147-64. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.10.007. Epub 2009 Nov 18.

Rautou PE, Cazals-Hatem D, Moreau R, Francoz C, Feldmann G, Lebre C, Ogier-Denis E, Bedossa P, Valla D, Durand F. Acute liver cell damage in patients with anorexia nervosa: a possible role of starvation-induced hepatocyte autophagy. *Gastroenterology.* 2008 Sep;135(3):840-8, 848.e1-3. doi: 10.1053/j.gastro.2008.05.055. Epub 2008 May 28.

Reed GW, Hill JO. Measuring the thermic effect of food. *Am J Clin Nutr.* 1996 Feb;63(2):164-9.

Refinetti R. Metabolic heat production, heat loss and the circadian rhythm of body temperature in the rat. *Exp Physiol.* 2003 May;88(3):423-9.

Refinetti R. Relationship between the daily rhythms of locomotor activity and body temperature in eight mammalian species. *Am J Physiol.* 1999 Nov;277(5 Pt 2):R1493-500.

Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol.* 2004 Oct;5(10):617-25.

Reichenbach A, Steyn FJ, Sleeman MW, Andrews ZB. Ghrelin receptor expression and colocalization with anterior pituitary hormones using a GHSR-GFP mouse line. *Endocrinology.* 2012 Nov;153(11):5452-66. doi: 10.1210/en.2012-1622. Epub 2012 Sep 7.

Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 2002 Jul;23(1-2):351-60.

Richard D, Lin Q, Timofeeva E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *Eur J Pharmacol.* 2002 Apr 12;440(2-3):189-97.

Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev.* 2013 Jul;93(3):993-1017. doi: 10.1152/physrev.00038.2012.

Riediger T, Bothe C, Becskei C, Lutz TA. Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology.* 2004;79(6):317-26. Epub 2004 Jul 15.

Rinderknecht E, Humbel RE. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Jul;73(7):2365-9.

Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature.* 1982 Nov 18;300(5889):276-8.

Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Gil MJ, Becerril S, Sáinz N, Silva C, Salvador J, Colina I, Frühbeck G. Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes (Lond).* 2009 May;33(5):541-52. doi: 10.1038/ijo.2009.40. Epub 2009 Feb 24.

Roerig JL, Mitchell JE, Steffen KJ. New targets in the treatment of anorexia nervosa. *Expert Opin Ther Targets.* 2005 Feb;9(1):135-51.

Rosenfeld, Growth hormone deficiency in children, in *Endocrinology*, ed. by L.J. Degroot, J.L. Jameson

Roth JS, Buccino G, Klein NW. Inhibition of growth of chick embryo by inhibition of deoxycytidylate deaminase. *Science*. 1963 Dec 13;142(3598):1473-4.

Routtenberg A, Kuznesof AW. Self-starvation of rats living in activity wheels on a restricted feeding schedule. *J Comp Physiol Psychol*. 1967 Dec;64(3):414-21.

Roux H, Blanchet C, Stheneur C, Chapelon E, Godart N. Somatic outcome among patients hospitalised for anorexia nervosa in adolescence: disorders reported and links with global outcome. *Eat Weight Disord*. 2013 Jun;18(2):175-82. doi: 10.1007/s40519-013-0030-2. Epub 2013 May 9.

Sailer AW, Sano H, Zeng Z, McDonald TP, Pan J, Pong SS, Feighner SD, Tan CP, Fukami T, Iwaasa H, Hreniuk DL, Morin NR, Sadowski SJ, Ito M, Ito M, Bansal A, Ky B, Figueroa DJ, Jiang Q, Austin CP, MacNeil DJ, Ishihara A, Ihara M, Kanatani A, Van der Plöeg LH, Howard AD, Liu Q. Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7564-9. Epub 2001 Jun 12.

Sainsbury A, Zhang L. Role of the hypothalamus in the neuroendocrine regulation of body weight and composition during energy deficit. *Obes Rev*. 2012 Mar;13(3):234-57. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00948.x. Epub 2011 Nov 10.

Saito Y, Nagasaki H. The melanin-concentrating hormone system and its physiological functions. *Results Probl Cell Differ*. 2008;46:159-79. doi: 10.1007/400_2007_052.

Sakada M, Tanaka A, Ohta D, Takayanagi M, Kodama T, Suzuki K, Inoue K, Fujita Y, Maruyama M. Severe steatosis resulted from anorexia nervosa leading to fatal hepatic failure. *J Gastroenterol*. 2006 Jul;41(7):714-5.

Sakamaki R, Uemoto M, Inui A, Asakawa A, Ueno N, Ishibashi C, Hirono S, Yukioka H, Kato A, Shinfuku N, Kasuga M, Katsuura G. Melanin-concentrating hormone enhances sucrose intake. *Int J Mol Med*. 2005 Jun;15(6):1033-9.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozłowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998 Mar 6;92(5):1 page following 696.

Salamone JD, Arizzi MN, Sandoval MD, Cervone KM, Aberman JE. Dopamine antagonists alter response allocation but do not suppress appetite for food in rats: contrast between the effects of SKF 83566, raclopride, and fenfluramine on a concurrent choice task. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Apr;160(4):371-80. Epub 2002 Feb 14.

Salamone JD, Cousins MS, Bucher S. Anhedonia or anergia? Effects of haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion on instrumental response selection in a T-maze cost/benefit procedure. *Behav Brain Res*. 1994 Dec 15;65(2):221-9.

Salter AM. Metabolic Effects of Glucagon in the Wistar Rat. *Am J Clin Nutr* 1960 8: 535-539

Sánchez-Lasheras C, Könnér AC, Brüning JC. Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front Neuroendocrinol*. 2010 Jan;31(1):4-15. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.08.002. Epub 2009 Sep 1.

Saper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res*. 1976 Nov 26;117(2):305-12.

Sasaki H, Ohtsu T, Ikeda Y, Tsubosaka M, Shibata S. Combination of meal and exercise timing with a high-fat diet influences energy expenditure and obesity in mice. *Chronobiol Int*. 2014 Jul 9:1-17. [Epub ahead of print]

Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdié P, Bourrier E, Dehouck B, Banères JL, Martinez J, Méry PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prévot V, Mollard P. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 22;110(4):1512-7. doi: 10.1073/pnas.1212137110. Epub 2013 Jan 7.

Scheurink AJ, Ammar AA, Benthem B, van Dijk G, Södersten PA. Exercise and the regulation of energy intake. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Apr;23 Suppl 3:S1-6.

Schmidt PT, Näslund E, Grybäck P, Jacobsson H, Hartmann B, Holst JJ, Hellström PM. Peripheral administration of GLP-2 to humans has no effect on gastric emptying or satiety. *Regul Pept*. 2003 Nov 15;116(1-3):21-5.

Schmidt PT, Näslund E, Grybäck P, Jacobsson H, Hartmann B, Holst JJ, Hellström PM. Peripheral administration of GLP-2 to humans has no effect on gastric emptying or satiety. *Regul Pept*. 2003 Nov 15;116(1-3):21-5.

Schultes B, Schmid SM, Wilms B, Jauch-Chara K, Oltmanns KM, Hallschmid M. Lactate infusion during euglycemia but not hypoglycemia reduces subsequent food intake in healthy men. *Appetite*. 2012 Jun;58(3):818-21. doi: 10.1016/j.appet.2012.01.022. Epub 2012 Jan 28.

Schwartz GJ, Salorio CF, Skoglund C, Moran TH. Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 2):R1623-9.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 1996 Sep 1;98(5):1101-6.

Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*. 1997 Dec;46(12):2119-23.

Scuderi P, Sterling KE, Lam KS, Finley PR, Ryan KJ, Ray CG, Petersen E, Slymen DJ, Salmon SE. Raised serum levels of tumour necrosis factor in parasitic infections. *Lancet*. 1986 Dec 13;2(8520):1364-5.

Sears RM, Liu RJ, Narayanan NS, Sharf R, Yeckel MF, Laubach M, Aghajanian GK, DiLeone RJ. Regulation of nucleus accumbens activity by the hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone. *J Neurosci*. 2010 Jun 16;30(24):8263-73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5858-09.2010.

Sedlackova D, Kopeckova J, Papezova H, Hainer V, Kvasnickova H, Hill M, Nedvidkova J. Comparison of a high-carbohydrate and high-protein breakfast effect on plasma ghrelin, obestatin, NPY and PYY levels in women with anorexia and bulimia nervosa. *Nutr Metab (Lond)*. 2012 Jun 8;9(1):52. doi: 10.1186/1743-7075-9-52.

Sekino A, Ohata H, Mano-Otagiri A, Arai K, Shibasaki T. Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004 Oct;176(1):30-8. Epub 2004 Apr 8.

Sellings LH, Clarke PB. Segregation of amphetamine reward and locomotor stimulation between nucleus accumbens medial shell and core. *J Neurosci*. 2003 Jul 16;23(15):6295-303.

Sellings LH, McQuade LE, Clarke PB. Evidence for multiple sites within rat ventral striatum mediating cocaine-conditioned place preference and locomotor activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Jun;317(3):1178-87. Epub 2006 Feb 28.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):13740-6. Epub 2003 Jan 30.

Seoane LM, López M, Tovar S, Casanueva FF, Señarís R, Diéguez C. Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. 2003 Feb;144(2):544-51.

Severinsen T, Munch IC. Body core temperature during food restriction in rats. *Acta Physiol Scand*. 1999 Mar;165(3):299-305.

Sexton PM, Paxinos G, Kenney MA, Wookey PJ, Beaumont K. In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. *Neuroscience*. 1994 Sep;62(2):553-67.

Shetty PS. Adaptation to low energy intakes: the responses and limits to low intakes in infants,

children and adults. *Eur J Clin Nutr*. 1999 Apr;53 Suppl 1:S14-33.

Shi YC, Lau J, Lin Z, Zhang H, Zhai L, Sperk G, Heilbronn R, Mietzsch M, Weger S, Huang XF, Enriquez RF, Baldock PA, Zhang L, Sainsbury A, Herzog H, Lin S. Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab*. 2013 Feb 5;17(2):236-48. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.006.

Shi YC, Lin Z, Lau J, Zhang H, Yagi M, Kanzler I, Sainsbury A, Herzog H, Lin S. PYY3-36 and pancreatic polypeptide reduce food intake in an additive manner via distinct hypothalamic dependent pathways in mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Dec;21(12):E669-78. doi: 10.1002/oby.20534. Epub 2013 Sep 5.

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*. 1998 Dec 17;396(6712):670-4.

Shimizu N, Oomura Y, Kai Y. Stress-induced anorexia in rats mediated by serotonergic mechanisms in the hypothalamus. *Physiol Behav*. 1989 Nov;46(5):835-41.

Shiraishi T, Oomura Y, Sasaki K, Wayner MJ. Effects of leptin and orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons. *Physiol Behav*. 2000 Nov 1-15;71(3-4):251-61.

Shklyayev S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, Scarpace PJ, Zolotukhin S. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14217-22. Epub 2003 Nov 14.

Siegfried Z, Berry EM, Hao S, Avraham Y. Animal models in the investigation of anorexia. *Physiol Behav*. 2003 Jun;79(1):39-45.

Silva JE. The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003 Aug 5;139(3):205-13.

Simpson IA, Appel NM, Hokari M, Oki J, Holman GD, Maher F, Koehler-Stec EM, Vannucci SJ, Smith QR. Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J Neurochem*. 1999 Jan;72(1):238-47.

Singhal V, Misra M, Klibanski A. Endocrinology of anorexia nervosa in young people: recent insights. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014 Feb;21(1):64-70. doi: 10.1097/MED.000000000000026.

Skibicka KP, Grill HJ. Hindbrain leptin stimulation induces anorexia and hyperthermia mediated by hindbrain melanocortin receptors. *Endocrinology*. 2009 Apr;150(4):1705-11. doi: 10.1210/en.2008-1316. Epub 2008 Dec 4.

Skibicka KP, Hansson C, Egecioglu E, Dickson SL. Role of ghrelin in food reward: impact of ghrelin on sucrose self-administration and mesolimbic dopamine and acetylcholine receptor gene expression. *Addict Biol*. 2012 Jan;17(1):95-107. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00294.x. Epub 2011 Feb 11.

Skibicka KP, Shirazi RH, Rabasa-Papio C, Alvarez-Crespo M, Neuber C, Vogel H, Dickson SL. Divergent circuitry underlying food reward and intake effects of ghrelin: dopaminergic VTA-accumbens projection mediates ghrelin's effect on food reward but not food intake. *Neuropharmacology*. 2013 Oct;73:274-83. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.06.004. Epub 2013 Jun 14.

Smith PM, Ferguson AV. Neurophysiology of hunger and satiety. *Dev Disabil Res Rev*. 2008;14(2):96-104. doi: 10.1002/ddrr.13.

Sørensen LB, Flint A, Raben A, Hartmann B, Holst JJ, Astrup A. No effect of physiological concentrations of glucagon-like peptide-2 on appetite and energy intake in normal weight subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Apr;27(4):450-6.

Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med*. 2011 Jun;32(3):159-221. doi: 10.1016/j.mam.2011.07.001. Epub 2011 Aug 10.

Speakman JR, Selman C. Physical activity and resting metabolic rate. *Proc Nutr Soc*. 2003

Aug;62(3):621-34.

Speranza M, Revah-Levy A, Giquel L, Loas G, Venisse JL, Jeammet P, Corcos M. An investigation of Goodman's addictive disorder criteria in eating disorders. *Eur Eat Disord Rev.* 2012 May;20(3):182-9. doi: 10.1002/erv.1140. Epub 2011 Aug 10.

Stamm O, Latscha U, Janecek P, Campana A. Development of a special electrode for continuous subcutaneous pH measurement in the infant scalp. *Am J Obstet Gynecol.* 1976 Jan 15;124(2):193-5.

Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev.* 2005 Oct;85(4):1131-58.

Stanley SA, Small CJ, Murphy KG, Rayes E, Abbott CR, Seal LJ, Morgan DG, Sunter D, Dakin CL, Kim MS, Hunter R, Kuhar M, Ghatei MA, Bloom SR. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain Res.* 2001 Mar 2;893(1-2):186-94.

Staten MA. The effect of exercise on food intake in men and women. *Am J Clin Nutr.* 1991 Jan;53(1):27-31.

Ste Marie L, Luquet S, Cole TB, Palmiter RD. Modulation of neuropeptide Y expression in adult mice does not affect feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 20;102(51):18632-7. Epub 2005 Dec 8.

Steffens AB, Van der Gugten J, Godeke J, Luiten PG, Strubbe JH. Meal-induced increases in parasympathetic and sympathetic activity elicit simultaneous rises in plasma insulin and free fatty acids. *Physiol Behav.* 1986;37(1):119-22.

Stellar E. The physiology of motivation. *Psychol Rev.* 1954 Jan;61(1):5-22.

Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y. Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight. *Peptides.* 2010 Feb;31(2):357-69. doi: 10.1016/j.peptides.2009.11.019. Epub 2009 Nov 26.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001 Jan 18;409(6818):307-12.

Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM. Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci.* 2005 Oct;8(10):1356-63. Epub 2005 Sep 18.

Steyn FJ, Boehme F, Vargas E, Wang K, Parkington HC, Rao JR, Chen C. Adiponectin regulate growth hormone secretion via adiponectin receptor mediated Ca(2+) signalling in rat somatotrophs in vitro. *J Neuroendocrinol.* 2009 Aug;21(8):698-704. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01887.x. Epub 2009 Jun 4.

Steyn FJ, Huang L, Ngo ST, Leong JW, Tan HY, Xie TY, Parlow AF, Veldhuis JD, Waters MJ, Chen C. Development of a method for the determination of pulsatile growth hormone secretion in mice. *Endocrinology.* 2011 Aug;152(8):3165-71. doi: 10.1210/en.2011-0253. Epub 2011 May 17.

Stice E, Spoor S, Ng J, Zald DH. Relation of obesity to consummatory and anticipatory food reward. *Physiol Behav.* 2009 Jul 14;97(5):551-60. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.03.020. Epub 2009 Mar 27.

Stratford TR, Kelley AE. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci.* 1997 Jun 1;17(11):4434-40.

Suchan B, Busch M, Schulte D, Grönemeyer D, Herpertz S, Vocks S. Reduction of gray matter density in the extrastriate body area in women with anorexia nervosa. *Behav Brain Res.* 2010 Jan 5;206(1):63-7. doi: 10.1016/j.bbr.2009.08.035. Epub 2009 Sep 1.

Sun M, Martin RJ, Edwards GL. ICV beta-hydroxybutyrate: effects on food intake, body composition, and body weight in rats. *Physiol Behav.* 1997 Mar;61(3):433-6.

Sun Y, Butte NF, Garcia JM, Smith RG. Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. *Endocrinology.* 2008 Feb;149(2):843-50. Epub 2007 Nov 15.

Swanson LW. Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 1977 Jun 10;128(2):346-53.

Swayze VW 2nd, Andersen A, Arndt S, Rajarethinam R, Fleming F, Sato Y, Andreasen NC. Reversibility of brain tissue loss in anorexia nervosa assessed with a computerized Talairach 3-D proportional grid. *Psychol Med.* 1996 Mar;26(2):381-90.

Swayze VW 2nd, Andersen AE, Andreasen NC, Arndt S, Sato Y, Ziebell S. Brain tissue volume segmentation in patients with anorexia nervosa before and after weight normalization. *Int J Eat Disord.* 2003 Jan;33(1):33-44.

Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron.* 2001 Jun;30(3):819-28.

Szczypka MS, Rainey MA, Kim DS, Alaynick WA, Marck BT, Matsumoto AM, Palmiter RD. Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 12;96(21):12138-43.

Szentirmai E, Kapás L, Sun Y, Smith RG, Krueger JM. The preproghrelin gene is required for the normal integration of thermoregulation and sleep in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 18;106(33):14069-74. doi: 10.1073/pnas.0903090106. Epub 2009 Aug 4.

Tai S, Yokota Y, Tsurumi Y, Hasegawa H, Masuhara M, Okamura K. Effects of short-term refeeding after rapid or slow body mass reduction on body composition in adult rats. *Obes Res Clin Pract.* 2010 Jul-Sep;4(3):e163-246. doi: 10.1016/j.orcp.2010.02.001.

Takano S, Kim J, Ikari Y, Ogaya M, Nakajima K, Oomura Y, Wayner MJ, Sasaki K. Electrophysiological effects of ghrelin on laterodorsal tegmental neurons in rats: an in vitro study. *Peptides.* 2009 Oct;30(10):1901-8. doi: 10.1016/j.peptides.2009.07.014. Epub 2009 Jul 29.

Takeda S, Eleftheriou 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 Nov 1;111(3):305-17.

Tan K, Knight ZA, Friedman JM. Ablation of AgRP neurons impairs adaption to restricted feeding. *Molecular Metabolism* Available online 10 July 2014 In Press, Corrected Proof

Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tatebe Y, Nagai N, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S. Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology.* 2003 Oct;28(7):829-35.

Tang-Christensen M, Vrang N, Larsen PJ. Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001 Dec;25 Suppl 5:S42-7.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995 Dec 29;83(7):1263-71.

Tasan RO, Lin S, Hetzenauer A, Singewald N, Herzog H, Sperk G. Increased novelty-induced motor activity and reduced depression-like behavior in neuropeptide Y (NPY)-Y4 receptor knockout mice. *Neuroscience.* 2009 Feb 18;158(4):1717-30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.11.048. Epub 2008 Dec 9.

Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschöp MH, Schwartz MW. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012 Jan 3;122(1):153-62. doi: 10.1172/JCI59660. Epub 2011 Dec 27.

Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology.* 2004 Jan;145(1):234-42. Epub 2003 Oct 9.

Tolle V, Kadem M, Bluett-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan;88(1):109-16.

Tomasik PJ, Sztefko K, Starzyk J, Rogatko I, Szafran Z. Entero-insular axis in children with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*. 2005 May;30(4):364-72. Epub 2005 Jan 18.

Tomasik PJ, Sztefko K, Starzyk J. Cholecystokinin, glucose dependent insulinotropic peptide and glucagon-like peptide 1 secretion in children with anorexia nervosa and simple obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2004 Dec;17(12):1623-31.

Tong Q, Ye C, McCrimmon RJ, Dhillon H, Choi B, Kramer MD, Yu J, Yang Z, Christiansen LM, Lee CE, Choi CS, Zigman JM, Shulman GI, Sherwin RS, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab*. 2007 May;5(5):383-93.

Tortorolo P, Sampogna S, Chase MH. MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain Res*. 2009 May 1;1268:76-87. doi: 10.1016/j.brainres.2009.02.055. Epub 2009 Mar 6.

Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*. 1998 Oct 30;438(1-2):71-5.

Tschöp M, Castañeda TR, Joost HG, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Klaus S, Hagan MM, Chandler PC, Oswald KD, Benoit SC, Seeley RJ, Kinzig KP, Moran TH, Beck-sickinger AG, Koglin N, Rodgers RJ, Blundell JE, Ishii Y, Beattie AH, Holch P, Allison DB, Raun K, Madsen K, Wulff BS, Stidsen CE, Birringer M, Kreuzer OJ, Schindler M, Arndt K, Rudolf K, Mark M, Deng XY, Whitcomb DC, Halem H, Taylor J, Dong J, Datta R, Culler M, Craney S, Flora D, Smiley D, Heiman ML. Physiology: does gut hormone PYY3-36 decrease food intake in rodents? *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):1 p following 165; discussion 2 p following 165.

Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000 Oct 19;407(6806):908-13.

Tsubota Y, Owada-Makabe K, Yukawa K, Maeda M. Hypotensive effect of des-acyl ghrelin at nucleus tractus solitarii of rat. *Neuroreport*. 2005 Feb 8;16(2):163-6.

Tsujino N, Sakurai T. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev*. 2009 Jun;61(2):162-76. doi: 10.1124/pr.109.001321.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.

Turner RT, Kalra SP, Wong CP, Philbrick KA, Lindenmaier LB, Boghossian S, Iwaniec UT. Peripheral leptin regulates bone formation. *J Bone Miner Res*. 2013 Jan;28(1):22-34. doi: 10.1002/jbmr.1734.

Ueno N, Inui A, Iwamoto M, Kaga T, Asakawa A, Okita M, Fujimiya M, Nakajima Y, Ohmoto Y, Ohnaka M, Nakaya Y, Miyazaki JI, Kasuga M. Decreased food intake and body weight in pancreatic polypeptide-overexpressing mice. *Gastroenterology*. 1999 Dec;117(6):1427-32.

Utz AL, Lawson EA, Misra M, Mickley D, Gleysteen S, Herzog DB, Klibanski A, Miller KK. Peptide YY (PYY) levels and bone mineral density (BMD) in women with anorexia nervosa. *Bone*. 2008 Jul;43(1):135-9. doi: 10.1016/j.bone.2008.03.007. Epub 2008 Mar 25.

Utz JC, Nelson S, O'Toole BJ, van Breukelen F. Bone strength is maintained after 8 months of inactivity in hibernating golden-mantled ground squirrels, *Spermophilus lateralis*. *J Exp Biol*. 2009 Sep 1;212(17):2746-52. doi: 10.1242/jeb.032854.

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet*. 1996 Sep;14(1):95-7.

van den Pol AN, Acuna-Goycolea C, Clark KR, Ghosh PK. Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron*. 2004 May 27;42(4):635-52.

van Leeuwen SD, Bonne OB, Avraham Y, Berry EM. Separation as a new animal model for self-induced weight loss. *Physiol Behav*. 1997 Jul;62(1):77-81.

Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko

PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol*. 2000 Dec 11;428(2):191-212.

Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Sep 15;275(1-2):43-61. Epub 2007 Jun 2.

Velásquez DA, Martínez G, Romero A, Vázquez MJ, Boit KD, Dopeso-Reyes IG, López M, Vidal A, Nogueiras R, Diéguez C. The central Sirtuin 1/p53 pathway is essential for the orexigenic action of ghrelin. *Diabetes*. 2011 Apr;60(4):1177-85. doi: 10.2337/db10-0802. Epub 2011 Mar 8.

Veldhuis JD, Bowers CY. Integrating GHS into the Ghrelin System. *Int J Pept*. 2010;2010. pii: 879503. doi: 10.1155/2010/879503. Epub 2010 Mar 18.

Vella KR, Ramadoss P, Lam FS, Harris JC, Ye FD, Same PD, O'Neill NF, Maratos-Flier E, Hollenberg AN. NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways. *Cell Metab*. 2011 Dec 7;14(6):780-90. doi: 10.1016/j.cmet.2011.10.009. Epub 2011 Nov 17.

Verbaeys I, Tolle V, Swennen Q, Zizzari P, Buyse J, Epelbaum J, Cokelaere M. Scheduled feeding results in adipogenesis and increased acylated ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 Jun;300(6):E1103-11. doi: 10.1152/ajpendo.00551.2010. Epub 2011 Mar 22.

Verhagen LA, Luijendijk MC, de Groot JW, van Dommelen LP, Klimstra AG, Adan RA, Roeling TA. Anticipation of meals during restricted feeding increases activity in the hypothalamus in rats. *Eur J Neurosci*. 2011 Nov;34(9):1485-91. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07880.x.

Verhagen LA, Luijendijk MC, Hillebrand JJ, Adan RA. Dopamine antagonism inhibits anorectic behavior in an animal model for anorexia nervosa. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009 Mar;19(3):153-60. doi: 10.1016/j.euroneuro.2008.09.005. Epub 2008 Nov 1.

Veyrat-Durebex C, Alliot J. Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol Behav*. 1997 Dec;62(6):1273-8.

Veyrat-Durebex C, Montet X, Vinciguerra M, Gjinovci A, Meda P, Foti M, Rohner-Jeanrenaud F. The Lou/C rat: a model of spontaneous food restriction associated with improved insulin sensitivity and decreased lipid storage in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 May;296(5):E1120-32. doi: 10.1152/ajpendo.90592.2008. Epub 2009 Feb 10.

Veyrat-Durebex C, Poher AL, Caillon A, Somme E, Vallet P, Charnay Y, Rohner-Jeanrenaud F. Improved leptin sensitivity as a potential candidate responsible for the spontaneous food restriction of the Lou/C rat. *PLoS One*. 2013 Sep 6;8(9):e73452. doi: 10.1371/journal.pone.0073452. eCollection 2013.

Vidal P, Pérez-Padilla Á, Pellón R. Rapid development of semistarvation-induced hyperactivity in Dark Agouti rats. Excessive wheel running and effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Appetite*. 2013 Feb;61(1):30-5. doi: 10.1016/j.appet.2012.10.026. Epub 2012 Nov 8.

Viltart O, Sartor DM, Verberne AJ. Chemical stimulation of visceral afferents activates medullary neurones projecting to the central amygdala and periaqueductal grey. *Brain Res Bull*. 2006 Dec 11;71(1-3):51-9. Epub 2006 Aug 10.

Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S Jr, Lowell BB. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron*. 2011 Jul 14;71(1):142-54. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.028.

Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):40352-63. Epub 2003 Jul 23.

Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*. 2002 Jan;8(1):75-9.

Wang C, Bomberg E, Billington C, Levine A, Kotz CM. Brain-derived neurotrophic factor in the

hypothalamic paraventricular nucleus increases energy expenditure by elevating metabolic rate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Sep;293(3):R992-1002. Epub 2007 Jun 13.

Wang Q, Liu C, Uchida A, Chuang JC, Walker A, Liu T, Osborne-Lawrence S1, Mason BL1, Mosher C1, Berglund ED1, Elmquist JK1, Zigman JM2. Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Mol Metab*. 2013 Oct 17;3(1):64-72. doi: 10.1016/j.molmet.2013.10.001. eCollection 2014.

Wank SA, Pisegna JR, de Weerth A. Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep 15;89(18):8691-5.

Watanabe K, Hara C, Ogawa N. Feeding conditions and estrous cycle of female rats under the activity-stress procedure from aspects of anorexia nervosa. *Physiol Behav*. 1992 Apr;51(4):827-32.

Weigle DS, Breen PA, Matthys CC, Callahan HS, Meeuws KE, Burden VR, Purnell JQ. A high-protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations. *Am J Clin Nutr*. 2005 Jul;82(1):41-8.

West DB, Fey D, Woods SC. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am J Physiol*. 1984 May;246(5 Pt 2):R776-87.

Westerterp KR. Impacts of vigorous and non-vigorous activity on daily energy expenditure. *Proc Nutr Soc*. 2003 Aug;62(3):645-50.

Whiddon BB, Palmiter RD. Ablation of neurons expressing melanin-concentrating hormone (MCH) in adult mice improves glucose tolerance independent of MCH signaling. *J Neurosci*. 2013 Jan 30;33(5):2009-16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3921-12.2013.

Whirledge S, Cidlowski JA. Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinol*. 2010 Jun;35(2):109-25.

Wielinga PY, Löwenstein C, Muff S, Munz M, Woods SC, Lutz TA. Central amylin acts as an adiposity signal to control body weight and energy expenditure. *Physiol Behav*. 2010 Aug 4;101(1):45-52. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.04.012. Epub 2010 Apr 21.

Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Apr;143(3):315-7.

Williams TD, Chambers JB, Henderson RP, Rashotte ME, Overton JM. Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 May;282(5):R1459-67.

Wilson JF, Cantor MB. Noise-induced eating in rats facilitated by prior tail pinch experience. *Physiol Behav*. 1986;37(4):523-6.

Wise RA. Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006 Jul 29;361(1471):1149-58.

Wojcik MH, Meenaghan E, Lawson EA, Misra M, Klibanski A, Miller KK. Reduced amylin levels are associated with low bone mineral density in women with anorexia nervosa. *Bone*. 2010 Mar;46(3):796-800. doi: 10.1016/j.bone.2009.11.014. Epub 2009 Nov 18.

Woods SC, Decke E, Vasselli JR. Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev*. 1974 Jan;81(1):26-43.

Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*. 1979 Nov 29;282(5738):503-5.

Woods SC. The eating paradox: how we tolerate food. *Psychol Rev*. 1991 Oct;98(4):488-505.

Wu Y, Tu Q, Valverde P, Zhang J, Murray D, Dong LQ, Cheng J, Jiang H, Rios M, Morgan E, Tang Z, Chen J. Central adiponectin administration reveals new regulatory mechanisms of bone metabolism in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Jun 15;306(12):E1418-30. doi: 10.1152/ajpendo.00048.2014. Epub 2014 Apr 29.

Wueest S, Item F, Boyle CN, Jirkof P, Cesarovic N, Ellingsgaard H, Böni-Schnetzler M, Timper K, Arras M, Donath MY, Lutz TA, Schoenle EJ, Konrad D. Interleukin-6 contributes to early fasting-induced free fatty acid mobilization in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Jun 1;306(11):R861-7. doi: 10.1152/ajpregu.00533.2013. Epub 2014 Apr 2.

Yamaguchi T, Sheen W, Morales M. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci*. 2007 Jan;25(1):106-18.

Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jan;28(1):15-23. doi: 10.1016/j.beem.2013.09.003. Epub 2013 Sep 15.

Yang H, Youm YH, Nakata C, Dixit VD. Chronic caloric restriction induces forestomach hypertrophy with enhanced ghrelin levels during aging. *Peptides*. 2007 Oct;28(10):1931-6. Epub 2007 Aug 19.

Yang L, Scott KA, Hyun J, Tamashiro KL, Tray N, Moran TH, Bi S. Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *J Neurosci*. 2009 Jan 7;29(1):179-90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4379-08.2009.

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med*. 1999 Sep;5(9):1066-70.

Yeomans JS, Mathur A, Tampakeras M. Rewarding brain stimulation: role of tegmental cholinergic neurons that activate dopamine neurons. *Behav Neurosci*. 1993 Dec;107(6):1077-87.

Yoshioka M, Doucet E, St-Pierre S, Alm  ras N, Richard D, Labrie A, Despr  s JP, Bouchard C, Tremblay A. Impact of high-intensity exercise on energy expenditure, lipid oxidation and body fatness. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 Mar;25(3):332-9.

You YN, Short KR, Jourdan M, Klaus KA, Walrand S, Nair KS. The effect of high glucocorticoid administration and food restriction on rodent skeletal muscle mitochondrial function and protein metabolism. *PLoS One*. 2009;4(4):e5283. doi: 10.1371/journal.pone.0005283. Epub 2009 Apr 20.

Yulyaningsih E, Loh K, Lin S, Lau J, Zhang L, Shi Y, Berning BA, Enriquez R, Driessler F, Macia L, Khor EC, Qi Y, Baldock P, Sainsbury A, Herzog H. Pancreatic polypeptide controls energy homeostasis via Npy6r signaling in the suprachiasmatic nucleus in mice. *Cell Metab*. 2014 Jan 7;19(1):58-72. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.019.

Zagorodnyuk VP, Brookes SJ. Transduction sites of vagal mechanoreceptors in the guinea pig esophagus. *J Neurosci*. 2000 Aug 15;20(16):6249-55.

Zagorodnyuk VP, Chen BN, Brookes SJ. Intraganglionic laminar endings are mechano-transduction sites of vagal tension receptors in the guinea-pig stomach. *J Physiol*. 2001 Jul 1;534(Pt 1):255-68.

Zamiri MJ. Effects of reduced food intake on reproduction in mice. *Aust J Biol Sci*. 1978 Dec;31(6):629-39.

Zgheib S, Méquinion M, Lucas S, Leterme D, Ghali O, Tolle V, Zizzari P, Bellefontaine N, Legroux-G  rot I, Hardouin P, Broux O, Viltart O, Chauveau C. Long-term physiological alterations and recovery in a mouse model of separation associated with time-restricted feeding: a tool to study anorexia nervosa related consequences. *PLoS One*. 2014 Aug 4;9(8):e103775. doi: 10.1371/journal.pone.0103775. eCollection 2014.

Zhang W, Zhao L, Lin TR, Chai B, Fan Y, Gantz I, Mulholland MW. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell*. 2004 May;15(5):2484-91. Epub 2004 Mar 19.

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 Dec 1;372(6505):425-32.

Zhao TJ, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Goldstein JL, Brown MS. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7467-72. doi: 10.1073/pnas.1002271107. Epub 2010 Mar 15.

Zheng H, Berthoud HR. Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism. *Physiology* (Bethesda). 2008 Apr;23:75-83. doi: 10.1152/physiol.00047.2007.

Zhu X, Cao Y, Voogd K, Steiner DF. On the processing of proghrelin to ghrelin. *J Biol Chem*. 2006 Dec 15;281(50):38867-70. Epub 2006 Oct 18.

Zipfel S, Mack I, Baur LA, Hebebrand J, Touyz S, Herzog W, Abraham S, Davies PS, Russell J. Impact of exercise on energy metabolism in anorexia nervosa. *J Eat Disord*. 2013 Sep 4;1(1):37. doi: 10.1186/2050-2974-1-37.

Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science*. 2011 Nov 4;334(6056):678-83. doi: 10.1126/science.1207056.

ANNEXES

ARTICLES & REVUES EN LIEN AVEC LA THÈSE

Viltart, **Méquinion** et al. (2013) Anorexia nervosa and chronic food restriction: from clinical bench to animal models, *DN2M Nov*, N°2, p5.

Méquinion et al. (2013) Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa. *Frontiers Endocrinology*, (4).

Zgheib S.*, **Mequinion M.*** et al., (2014) Long-Term Physiological Alterations and Recovery in a Mouse Model of Separation Associated with Time-Restricted Feeding: A Tool to Study Anorexia Nervosa Related Consequences, *PlosONE*, 9 (8), e103775. * same co-authorship

Viltart & **Méquinion**, (2014) Ghréline et anorexie mentale: de la prise alimentaire à la motivation. *GROS (Groupe de Réflexion sur l'Obésité et le Surpoids)*, Fev 2014, N°12.

Méquinion, laFleur & Viltart. Appetite Disorders : from binge eating to anorexia nervosa. Chap 4 ; *INF Masterclass in Neuroendocrinology Series Neuroendocrinology of Appetite*. Eds : Suzanne L Dickson & Julian G Mercer. **Soumis**.

Modulation of cellular plasticity in the hippocampus: a cornerstone at the crossroad of depression, stroke and cognitive decline

Dominique Deplanque, Régis Bordet Medical pharmacology department – EA1046, Faculty of Medicine, Lille.

There is increasing evidence that hippocampus structure and function are under the influence of both neurogenesis and synaptogenesis processes with possible impact in different pathological conditions such as

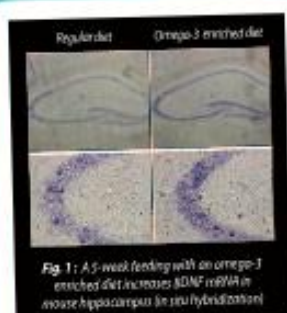


Fig. 1: A 5-week feeding with an omega-3 enriched diet increases BDNF mRNA in mouse hippocampus (in situ hybridization).

cognitive decline and depressive disorders. Recent studies indicate that the cellular plasticity of the hippocampus is under the guidance of both genetic and epigenetic factors that influence the level of neurotrophic factors such as brain derived neurotrophic factor (BDNF). Neurotrophic factors are important for growth and survival during neuronal development but continue to play a critical role in the survival and function of neurons in the adult brain. Besides genetic aspects, recent works provide evidences that some conditions associated to a decrease in the BDNF levels such as obesity, diabetes mellitus, arterial hypertension and hypoxic brain injuries may lead to an impairment of hippocampus plasticity and then may have a deleterious impact in terms of depressive symptoms and memory decline. Because all these risk factors also lead to ischemic stroke and because stroke is associated to an in-

crease risk of depressive disorders or cognitive decline, we developed a scientific approach aiming to evaluate whether the modulation of cellular plasticity in the hippocampus may have medical applications in stroke, depressive disorders and cognitive decline. The works of our team contribute to demonstrate that the increase in neurogenesis not only in hippocampus but also in sub-ventricular zone may have favorable behavioral impacts in terms of depressive disorders and memory function as well as may contribute to a decrease in stroke severity. Besides the development of new pharmacological approaches, our works contribute to underline the possible favorable effects of physical exercise and diet enriched with omega-3, some approaches that may be simple and safe ways to reduce depressive disorders and cognitive decline as well as to reduce the deleterious impact of ischemic stroke.

Anorexia nervosa and chronic food restriction: from clinical bench to animal models

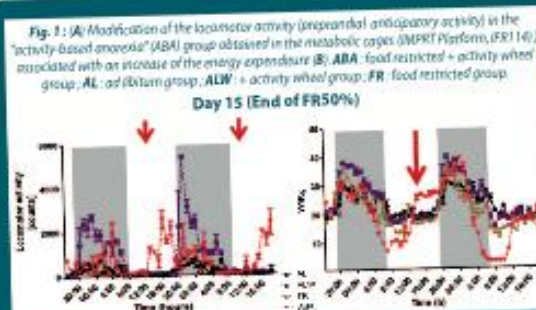
Odile Viltart¹, Mathieu Mequinion¹, Emilie Caron¹, Vincent Prévot¹, Christophe Chauveau² ¹INSERM U 837, Development and Plasticity of the Postnatal Brain, JPARC, University Lille Nord de France (Lille 1 & Lille 2) and ²EA 4490 PMOI, University Lille Nord de France (University of Littoral Côte d'Opale & Lille 2)

Feeding and eating disorders are gaining large emphasis in our societies due to their dramatic physiological and psychological consequences on health. Besides obesity, chronic food restriction is a feeding behavior classically observed in athletes, but also in restrictive anorexia nervosa (AN). This disease, mostly observed in women aged of 25 years old or younger whose BMI reaches values inferior to 18.5 kg/m², is the third cause of chronic illness in teenagers. The prevalence has drastically increased within these past decades. It leads to central and/or peripheral reprogramming that permits the organism to endure the reduced energy supplies. These conditions induce severe weight loss, metabolic disturbances, infertility, osteopenia and osteoporosis. Increasing number of arguments consider AN as an addictive behavior to food deprivation or weight loss or physical activity, likely due to a potential alteration of the central dopaminergic reward system. AN is also usually associated with mood disorders like anxiety or depression.

AN patients exhibit changes in the release of hormones involved in energy metabolism and regulation of feeding behavior. More specially, plasma levels of ghrelin, an orexigenic hormone mostly released from the stomach, are increased.

To better understand the role of ghrelin in this complex disease, the use of animal models becomes a necessity. The Activity-Based Anorexia model (ABA, Fig 1), that consists to associate food restriction and hyperactivity,

has been adapted in mice to determine central and/or peripheral mechanisms that support the physiological adaptations observed in AN patients before exhaustion and death. After 15 days' protocol, the ABA mice exhibit most of the symptoms detailed in AN. The chronic food restriction induces both in AN patients and ABA mice a profound alteration in the "ghrelin" signal integration that might lead to the development of inappropriate behaviors like hyperactivity or addiction to food starvation conducting to a greater depletion in energy reserves. The mechanisms of this metabolic reprogramming remain currently unknown and are under investigation in our laboratory. This project is a part of a larger program supported by the GIRAM (Groupe Interdisciplinaire de Recherche sur l'Anorexie Mentale) and funded by a regional ARCIR.



This hormone acts centrally to modulate food intake, but is also required to maintain blood glucose during severe calorie restriction. Such increase in plasma ghrelin levels seems paradoxical in light of the restrained eating adopted by these patients, but adaptive by a feedback mechanism due to the lack of nutrients.



Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa

Mathieu Méquinion¹, Fanny Langlet¹, Sara Zgheib², Suzanne Dickson^{3,4}, Bénédicte Dehouck^{1,5}, Christophe Chauveau^{2†} and Odile Viltart^{1,6*}

¹ UMR INSERM 837, Development and Plasticity of Postnatal Brain, Lille, France

² Pathophysiology of inflammatory of bone diseases, Université Lille Nord de France-ULCO – Lille 2, Boulogne sur Mer, France

³ Department of Physiology Institute of Neuroscience and Physiology, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

⁴ Department of Endocrinology, Institute of Neuroscience and Physiology, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

⁵ Université Lille Nord de France – Université d'Artois, Liévin, France

⁶ Université Lille Nord de France-ULST (Lille 1), Villeneuve d'Ascq, France

Edited by:

Hubert Vaudry, University of Rouen, France

Reviewed by:

Masamitsu Nakazato, University of Miyazaki, Japan

Piero Magni, Università degli Studi di Milano, Italy

*Correspondence:

Odile Viltart, Development and Plasticity of the Postnatal Brain, Team 2, Jean-Pierre Aubert Research Center, UMR INSERM 837 Bat Biserte, 1 place de Verdun, 59045 Lille cedex, France.
e-mail: odile.viltart@univ-lille.fr

[†] Christophe Chauveau and Odile Viltart have contributed equally to this work.

Increasing clinical and therapeutic interest in the neurobiology of eating disorders reflects their dramatic impact on health. Chronic food restriction resulting in severe weight loss is a major symptom described in restrictive anorexia nervosa (AN) patients, and they also suffer from metabolic disturbances, infertility, osteopenia, and osteoporosis. Restrictive AN, mostly observed in young women, is the third largest cause of chronic illness in teenagers of industrialized countries. From a neurobiological perspective, AN-linked behaviors can be considered an adaptation that permits the endurance of reduced energy supply, involving central and/or peripheral reprogramming. The severe weight loss observed in AN patients is accompanied by significant changes in hormones involved in energy balance, feeding behavior, and bone formation, all of which can be replicated in animals models. Increasing evidence suggests that AN could be an addictive behavior disorder, potentially linking defects in the reward mechanism with suppressed food intake, heightened physical activity, and mood disorder. Surprisingly, the plasma levels of ghrelin, an orexigenic hormone that drives food-motivated behavior, are increased. This increase in plasma ghrelin levels seems paradoxical in light of the restrained eating adopted by AN patients, and may rather result from an adaptation to the disease. The aim of this review is to describe the role played by ghrelin in AN focusing on its central vs. peripheral actions. In AN patients and in rodent AN models, chronic food restriction induces profound alterations in the « ghrelin » signaling that leads to the development of inappropriate behaviors like hyperactivity or addiction to food starvation and therefore a greater depletion in energy reserves. The question of a transient insensitivity to ghrelin and/or a potential metabolic reprogramming is discussed in regard of new clinical treatments currently investigated.

Keywords: ghrelin, anorexia, food intake, energy balance, central alterations, peripheral alterations, reward, animal models

INTRODUCTION

Feeding is a behavior that ensures an adequate and varied supply of nutritional substrates essential to maintain energy levels for basal metabolism, physical activity, growth, and reproduction and hence, for survival of every living organism on Earth. In the case of mammals, that must maintain a stable body temperature, the maintenance of a high metabolic rate requires constant availability of a sufficient amount of energy stores. The tight balance between energy demand and expenditure is fine-tuned by an adapted dialog between homeostatic and hedonic brain systems that are regulated by peripheral signals involved in feeding behavior and energy homeostasis. Mechanisms for feeding control remain a current and crucial scientific subject for understanding the etiology and potential therapeutic approaches for the treatment of food intake disorders that include obesity, on one hand, and severe forms of anorexia nervosa (AN) on the other.

Voluntary anorexia is a disease not unique to man and has even been described in many vertebrate species that favor migration activity (Wang et al., 2006). In this case, surviving food deprivation involves an adaptation of metabolism, such that internal energy stores available at the onset of fasting are used to maintain basal metabolism and physical activity. The biochemical and physiological adaptations that result from a lack of food help to preserve physiological function in order to maintain behaviors like food seeking or predator avoidance and also, to resume all metabolic processes necessary when food becomes available. However, absolute or long term food deprivation observed in nature or in restrictive AN proceeds in stages in which the individual/organism tries to adapt its metabolism to energy costs but that culminates in death, due to exhaustion of energy stores. As clearly described by Wang et al. (2006), the different stages progress from fasting to starvation, but “The demarcation between these two states



Long-Term Physiological Alterations and Recovery in a Mouse Model of Separation Associated with Time-Restricted Feeding: A Tool to Study Anorexia Nervosa Related Consequences

Sara Zgheib^{1,2*}, Mathieu Méquinion^{1,2,3*}, Stéphanie Lucas^{1,2}, Damien Leterme^{1,2}, Olfa Ghali^{1,2}, Virginie Tolle⁴, Philippe Zizzari⁴, Nicole Bellefontaine^{1,3}, Isabelle Legroux-Gérot^{1,2,5}, Pierre Hardouin^{1,2}, Odile Broux^{1,2}, Odile Viltart^{1,3,6}, Christophe Chauveau^{1,2*}

1 Université Lille Nord de France, Boulogne sur Mer, France, **2** Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, Boulogne sur Mer, France, **3** UMR INSERM 837, Développement et Plasticité du Cerveau Post-natal, Lille, France, **4** UMR-S 894 INSERM, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **5** Service de Rhumatologie, Hôpital Roger Salengro, CHU Lille, France, **6** Université de Lille1, Villeneuve d'Ascq, France

Abstract

Background: Anorexia nervosa is a primary psychiatric disorder, with non-negligible rates of mortality and morbidity. Some of the related alterations could participate in a vicious cycle limiting the recovery. Animal models mimicking various physiological alterations related to anorexia nervosa are necessary to provide better strategies of treatment.

Aim: To explore physiological alterations and recovery in a long-term mouse model mimicking numerous consequences of severe anorexia nervosa.

Methods: C57Bl/6 female mice were submitted to a separation-based anorexia protocol combining separation and time-restricted feeding for 10 weeks. Thereafter, mice were housed in standard conditions for 10 weeks. Body weight, food intake, body composition, plasma levels of leptin, adiponectin, IGF-1, blood levels of GH, reproductive function and glucose tolerance were followed. Gene expression of several markers of lipid and energy metabolism was assayed in adipose tissues.

Results: Mimicking what is observed in anorexia nervosa patients, and despite a food intake close to that of control mice, separation-based anorexia mice displayed marked alterations in body weight, fat mass, lean mass, bone mass acquisition, reproductive function, GH/IGF-1 axis, and leptinemia. mRNA levels of markers of lipogenesis, lipolysis, and the brown-like adipocyte lineage in subcutaneous adipose tissue were also changed. All these alterations were corrected during the recovery phase, except for the hypoleptinemia that persisted despite the full recovery of fat mass.

Conclusion: This study strongly supports the separation-based anorexia protocol as a valuable model of long-term negative energy balance state that closely mimics various symptoms observed in anorexia nervosa, including metabolic adaptations. Interestingly, during a recovery phase, mice showed a high capacity to normalize these parameters with the exception of plasma leptin levels. It will be interesting therefore to explore further the central and peripheral effects of the uncorrected hypoleptinemia during recovery from separation-based anorexia.

Citation: Zgheib S, Méquinion M, Lucas S, Leterme D, Ghali O, et al. (2014) Long-Term Physiological Alterations and Recovery in a Mouse Model of Separation Associated with Time-Restricted Feeding: A Tool to Study Anorexia Nervosa Related Consequences. PLoS ONE 9(8): e103775. doi:10.1371/journal.pone.0103775

Editor: Julie A. Chowen, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, QBEROBN, Spain

Received: April 3, 2014; **Accepted:** July 2, 2014; **Published:** August 4, 2014

Copyright: © 2014 Zgheib et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The study was founded by Région Nord - Pas de Calais and Université du Littoral Côte d'Opale. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: chauveau@univ-littoral.fr

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Chronic food restriction and the pathologic fear of weight gain are major symptoms described in restrictive-type anorexia nervosa (AN) patients. This disease mainly affects young girls with an average prevalence of 0.3% [1] and carries a high rate of

morbidity, with osteoporosis being one of its major complications, occurring in 20–30% of cases depending on the studies [2,3], and high fracture risk [4]. Nonetheless, biological analyses of patients do not reveal alterations of calcemia, phosphatemia and vitamin D level [5]. However, this psychiatric disease results in severe weight loss as shown by a mean body weight of 71% of that of healthy

Ghréline et Anorexie mentale : de la prise alimentaire à la motivation

Odile Viltart^{1,2} & Mathieu Méquinion¹,

¹UMR INSERM 837, Laboratoire "Développement et Plasticité du Cerveau Postnatal", Centre JPARC, Place de Verdun, 59045 Lille, France



La prise alimentaire et les troubles du comportement alimentaire constituent un domaine d'investigation non négligeable dans nos sociétés d'abondance alimentaire, du fait des conséquences dramatiques qu'ils peuvent occasionner sur la santé tant sur le plan physiologique que psychologique.

La restriction alimentaire chronique est un des symptômes majeurs décrits dans l'anorexie mentale de type restrictif (AM - R). Cette maladie touche essentiellement de jeunes femmes et est l'une des 3 causes de maladie mentale chronique chez les adolescents. Elle pourrait conduire à une reprogrammation centrale et/ou périphérique permettant à l'organisme de résister, dans un premier temps, à une réduction des apports énergétiques avant de tomber dans une phase d'épuisement physiologique. Ces conditions drastiques conduisent entre autres à une perte de poids importante, des perturbations métaboliques, des troubles de la fertilité, la survenue d'ostéopénie/ostéoporose. De plus en plus d'évidences suggèrent que l'AM-R pourrait être considérée comme une « addiction » à la privation alimentaire et/ou l'activité physique, couramment associée à ce type de trouble. Ainsi, une altération des circuits neuronaux impliqués dans les mécanismes de motivation/récompense est suggérée. Des changements significatifs dans les concentrations d'hormones impliquées dans le métabolisme énergétique, la régulation du comportement alimentaire et la formation de l'os sont décrits chez les patients AM-R, mais aussi dans des modèles animaux de restriction alimentaire chronique (Hasan and Hasan, 2011). De manière surprenante, les concentrations plasmatiques de ghréline, une hormone orexigène, sont augmentées. De telles modifications semblent paradoxales au vu de la restriction alimentaire adoptée par les patients AM-R, mais adaptatives. Il est actuellement supposé que la restriction chronique induit une altération profonde de l'intégration du signal « ghréline » qui conduirait au développement de comportements inappropriés comme l'hyperactivité ou l'addiction à la privation alimentaire et entraînerait à plus long terme une déplétion des réserves énergétiques. La question d'une insensibilité transitoire à la ghréline et d'une reprogrammation métabolique potentielle peut être discutée au regard de potentiels traitements cliniques.

I. La ghréline : une hormone orexigène aux fonctions multiples ?

La ghréline¹ est une hormone acylée identifiée par pharmacologie inverse comme un peptide de 28 acides aminés fortement synthétisé dans l'estomac du rat (Kojima et al., 1999). Le récepteur à la ghréline (GHS-R) découvert avant son ligand se caractérise par sa capacité à fixer des composés synthétiques, comme l'hexarelline ou le GHRP-6, connus pour leur action sécrétagogue sur l'hormone de croissance (Bowers et al., 1984; Howard et al., 1996). Ainsi la ghréline a été identifiée comme le ligand endogène de ce récepteur orphelin (Kojima et al., 1999). Chez l'humain, le gène de la préproghréline est localisé sur le chromosome 3 (3p25-26) tout comme le gène de son récepteur (3q26.2). Le clivage de la préproghréline (Figure 1) aboutit à l'obestatine et la ghréline. L'obestatine a initialement identifié comme un peptide anorexigène, bien que son effet sur la prise alimentaire et son action sur le récepteur GPR39 restent encore controversés (Hassouna et al., 2010). La forme native de la ghréline est soumise à une acylation (addition d'un groupement octanoyl) sur le résidu sérine 3 par une enzyme la ghréline-O-acyl-transférase. Il existe ainsi une forme de ghréline acylée (AG) et dé-acylée (DAG) dont les proportions dans le sang sont respectivement d'environ 10-15% pour 85-90%. La forme acylée est la seule capable de se fixer spécifiquement sur le récepteur GHSR-1a. A ce jour, l'AG est considérée comme la forme active de la ghréline, alors que les fonctions du DAG ne sont pas encore clairement élucidées (Delhanty et al., 2012 ; Méquinion et al., 2013), mais apparaissent souvent opposées à celles de l'AG.

Les travaux menés lors de ces 15 dernières années ont souligné la complexité du système « ghréline » (pour revue voir Cardona Cano et al., 2012, Méquinion et al., 2013 ; Gahete et al., 2014). La ghréline est également synthétisée dans d'autres tissus tels que le pancréas, les poumons, le colon, le cœur, les reins, l'os, les cellules immunitaires ou encore l'hypothalamus et son récepteur est largement exprimé tant au niveau central (hypothalamus, système limbique..) que périphérique (Méquinion et al., 2013) exerçant ainsi une action endocrine, paracrine et autocrine. Les effets biologiques de la ghréline sont donc multiples. Elle est tout d'abord impliquée dans la régulation de fonctions qui permettent le maintien de l'homéostasie. Ainsi, au niveau central, par son action sur le système somatotrope² (hormone de croissance et son effecteur l'IGF-1), elle participe à la régulation de la croissance squelettique et musculaire et du métabolisme énergé-

INF Masterclass in Neuroendocrinology Series

Neuroendocrinology of Appetite

Edited by : Suzanne L Dickson and Julian G Mercer

CHAPTER 4

Appetite Disorders : from binge eating to anorexia nervosa

Mathieu Méquinion¹, Susanne la Fleur², and Odile Viltart^{1,3}

¹UMR Inserm 837, Development and Plasticity of the Postnatal Brain, Team 2, JPARC, Bat Biserte, place de Verdun, 59045 Lille cedex ; ²Department of Endocrinology and Metabolism, Laboratory of Endocrinology, Meibergdreef 9, F2-154, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands ; ³University of Lille Nord de France (USTL)