



HAL
open science

Rôle de la Transcortine (CBG) dans la variabilité des réponses de stress

Amandine Minni A.M.

► **To cite this version:**

Amandine Minni A.M.. Rôle de la Transcortine (CBG) dans la variabilité des réponses de stress. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2), 2011. Français. NNT : . tel-02811162

HAL Id: tel-02811162

<https://hal.inrae.fr/tel-02811162v1>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

THESE

pour le

DOCTORAT de l'UNIVERSITE de BORDEAUX 2

Mention : **Sciences, Technologies, Santé**

Option : **Neurosciences**

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 décembre 2011

par **Amandine, Marie MINNI**

Née le 25 Septembre 1983 à Nancy (54)

Rôle de la Transcortine (CBG) dans la variabilité des réponses de stress

Membres du Jury

Dr. Sakina Mhaouty-Kodja	Directeur de Recherche CNRS, Paris	Rapporteur
Pr. Robert Dantzer	Professeur de l'Université de l'Illinois, USA	Rapporteur
Pr. Martine Duclos	Professeur Universitaire et Praticien Hospitalier de Clermont Ferrand	Examinateur
Dr. Francis Chaouloff	Directeur de Recherche INSERM, Bordeaux	Examinateur
Pr. Muriel Darnaudery	Professeur de l'Université de Bordeaux	Président
Dr. Marie-Pierre Moisan	Directeur de recherche INRA, Bordeaux	Directeur de thèse

RESUME

Une grande diversité dans la réponse adaptative au stress est observée entre les individus favorisant une sensibilité variable face aux stressors et pouvant conduire à une vulnérabilité à développer divers troubles et pathologies. Cette diversité est sous-tendue par les caractéristiques propres de chaque individu, déterminées par le patrimoine génétique en interaction avec les facteurs environnementaux. Des études génétiques menées au laboratoire ont permis de placer le gène de la *Cbg* comme un candidat important influençant les réponses de stress. L'équipe a alors développé un modèle de souris déficiente pour le gène *Cbg* (k.o. total). La CBG est une glycoprotéine plasmatique responsable de la biodisponibilité et du transport jusqu'à leur cible des glucocorticoïdes, produits finaux de l'axe corticotrope.

A l'aide de ce modèle original, l'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier les conséquences fonctionnelles de la déficience en CBG sur les réponses de stress. Nous avons ainsi analysé l'activité et la réactivité de l'axe corticotrope ainsi que les comportements émotionnels des mâles et des femelles k.o. *Cbg* dans des conditions de repos, de stress aigu et dans un contexte mimant l'effet d'un style de vie occidentale (modélisé par une alimentation enrichie en gras, associée à un stress chronique). Nous présentons ainsi un modèle murin unique d'hypo-réponse des glucocorticoïdes au stress associé à une réponse comportementale adaptative ralentie au niveau émotionnel et cognitif. L'ensemble de ces travaux contribue à placer la CBG et son gène comme acteur majeur de la variabilité individuelle des réponses de stress.

Mots clés : transcortine, CBG, axe corticotrope, glucocorticoïdes, stress, comportement émotionnel

ABSTRACT

A great diversity in the adaptive response to stress is observed between individuals favoring a variable sensitivity to face stressors and leading to a vulnerability to develop various disorders and diseases. This diversity is due to the characteristics of each individual, as determined by the genetic background in interaction with environmental factors. Genetic studies conducted in the laboratory demonstrated that the *Cbg* gene is an important candidate influencing stress responses. The team then developed a mouse model deficient for the gene *Cbg* (total k.o.). CBG is a plasma glycoprotein responsible for the bioavailability and the transport of glucocorticoids, the final products of the HPA axis, to their target.

Using this original model, the objective of my thesis was to study the functional consequences of CBG deficiency on responses to stress exposure. We have analyzed the activity and reactivity of the HPA axis and the emotional behaviors of males and females k.o. *Cbg* in resting conditions, acute stress and in a context that mimics the effect of a Western life style (modeled by a high fat diet, associated with chronic stress). We present an unique mouse model of glucocorticoid hyposignaling in response to stress associated with behavioral responses slowed down at the emotional and cognitive levels. Overall, this work contributes to place CBG and its gene as major actor of individual variability to stress.

Key words : transcortin, CBG, HPA axis, glucocorticoids, stress, emotional behavior

REMERCIEMENTS

J'avais entendu dire que la thèse était une période difficile. Pour moi, cette période fût très agréable et épanouissante grâce aux nombreuses personnes qui m'ont accompagnée, aidée et soutenue et que je tiens aujourd'hui à remercier.

*Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail : **Sakina Mhaouty-Kodja, Robert Dantzer, Martine Duclos, Francis Chaouloff et Muriel Darnaudery.***

*Je pense ensuite à **Françoise Moos** qui m'a accueillie dans son laboratoire PsyNuGen, puis à **Sophie Layé** qui en prenant la relève avec la direction du laboratoire NutriNeuro, a su gouverner sa barque d'une main de fer dans des gants de velours. Vous m'avez permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions de travail.*

*Je pense également à **Pierre Mormède** qui m'a accueillie dans son équipe puis à **Véronique Pallet** qui a pris le relai.*

*Un remerciement très particulier à **Marie-Pierre Moisan**, ma directrice de thèse qui m'a activement encadrée durant ces trois années et avec qui j'ai adoré travailler grâce à cette bonne entente qui s'est instaurée entre nous. Je ne te remercierais jamais assez pour ta confiance, ton soutien et ton écoute au quotidien. Si ma thèse s'est aussi bien passée c'est grâce à toi, à tout ce que j'ai pu apprendre à tes côtés, à ta bonne humeur et à nos nombreuses discussions (scientifiques et personnelles). De plus, tu m'as offert la chance d'aller à de nombreux congrès où j'ai pu rencontrer de nombreuses personnes. Chadi Touma et Stafford Lightman resteront parmi les plus grandes rencontres. Merci pour tout.*

*Après Marie-Pierre vient naturellement le tour de **Jean-Christophe Helbling** alias JC 72 ! J'aurais eu beaucoup de mal à aller au bout de mes travaux de thèse sans ton aide inestimable. Je pense aux matinées de tests comportementaux que tu affectionnes tant, à tes précieux conseils sur l'art de la biologie moléculaire que j'affectionne tant, aux sessions dissections et surtout chirurgie au cours desquelles on s'est vraiment beaucoup amusés et pour toutes les plaques de qPCR que tu as faites pour moi à la fin de ma thèse. Merci aussi pour ta sympathie, ton soutien, ta patience et pour toutes les conversations que l'on a eu et qui nous ont chacun aidés à avancer dans nos travaux. Merci aussi d'organiser toi et **Isabelle** la soirée qui clôturera ces trois années géniales !*

Tous les 3, MPM, JCH et AM, nous avons formé une super équipe !

*Le travail de recherche nécessite un travail d'équipe. Je tiens donc à remercier tous les membres de l'équipe et particulièrement **Aline Foury** pour sa bonne humeur et nos échanges autour des fioles à scintillation, **Nathalie Arvy** pour son aide précieuse dans l'art de l'ovariectomie, **Pascal Barat**, **Jean-Benoît Corcuff** (mon maître !) et **Claudine Tridon** pour son aide à l'animalerie surtout au début de ma thèse et à toute l'équipe des animaliers.*

*Merci aussi à **Marie-Pierre Manain** pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta réactivité et à toute l'équipe du secrétariat.*

*Je remercie également tous les membres du laboratoire passés et actuels avec qui j'ai toujours eu de bons rapports et qui m'ont beaucoup apportée à travers leurs nombreux conseils. Je remercie particulièrement **Muriel Darnaudery** pour tes conseils en statistique et en comportement. Je te remercie également de m'avoir offert l'opportunité de me frotter à l'expérience de l'enseignement. Comme tu le dit souvent : c'était super ! Je remercie aussi **Guillaume Ferreira** pour ton enthousiasme et tes conseils autour de la mémoire et de l'implantation de canules mais aussi pour la biblio que tu m'as régulièrement envoyée. Merci à **Véronique De-Smedt Peyrusse** pour m'avoir appris l'art du western blot et pour ta sympathie. Merci à **Corine Joffre** et **Nathalie Castanon** de m'avoir soutenue face aux soucis liés l'animalerie. Enfin, merci à **Agnès Nadjar** (qui m'a notamment aidée à passer le cap des ces satanées barres d'oreilles), **Anne-Laure Diné** (merci pour ton aide précieuse et solide lors de la mise en page !), **Lucile Capuron**, **Julie Sauvant**, **Agnès Aubert**, **Fabrice Casenave**, **Jan Peter Konsman**, **Thierry Amédée**, **Anaïs Duffaud**, **Caroline André**, **Virginie Labrousse**, **Jennifer Dudit**, **Julie Rémus-Borel**, **Elena Terenina**, **JB Barreau** et **Veena Bettadapura-Narayana**.*

*Cette super ambiance de travail à pu être possible aussi grâce à la « team des thésards » que je suis émue de quitter. Tous, nous avons beaucoup ris lors de nos soirées mais aussi beaucoup échangé sur le plan scientifique. Je remercie particulièrement « la petite **Julie** » **Lasselin**, **Thomas Larrieu** et **Muna**, **Chloé Boitard**, **Julie Brossaud**. Un remerciement particulier à **Charlotte Madore** pour ton soutien, ta bonne humeur et ton précieux travail dans la recherche des abréviations. C'est avec une grande émotion que je te dédis la partie « Liste des abréviations ». Enfin, un spécial big up au désormais célèbre « roi de la loose » : **Jean-Christophe Delpech** avec qui j'ai énormément interagis depuis le début de ma thèse. Merci pour toutes ces discussions qu'on a pu avoir tous les deux au sujet de nos résultats de manip qui nous ont rendu des rêves, ou pas... et merci pour ces excellentes soirées. Je pense particulièrement à ma mi-thèse que tu as fêtée dignement ! Je sais que tu iras super loin alors ne lâche rien !*

A tous, merci pour votre soutien et bon courage pour la suite de vos aventures. Je vous passe le relai !

Une mention spéciale à Julie Lasselin et Charlotte Madore qui ont su résoudre, en partie, l'énigme secrète NutriNeurO. Bravo les filles !

Merci également aux personnes avec qui j'ai collaboré et qui m'ont apportée une aide précieuse dans l'aboutissement de mes travaux: **Aline Desmedt, Martine Cadore, Anne Duittoz, Philippe de Deurwardière, Stéphane Grégoire, Laurent Brétilon, Christophe Piérard et Daniel Béracochéa**. Merci aussi à **Thomas Boraud** pour ton soutien. Peut être qu'un beau jour je viendrais te voir afin de mesurer le cortisol dans le poil de tes singes !

Je ne pouvais pas oublier de remercier **Nadia Kaouane** que j'ai beaucoup sollicité à la fin de ma thèse afin qu'elle me fasse part de tous ces « trucs et astuces » sur l'art de l'implantation de canules chez la souris. Grâce à tes conseils, ton soutien et ton aide, cette période émotionnellement intense a donné naissance à une très jolie manip.

Je voudrais aussi rendre hommage à **Jean-Paul Delbecque** mon maître de Master qui a été le premier à me donner ce goût pour la recherche.

Je pense également à mes amis de longue date qui pour certains, la majorité même ! se sont toujours demandé ce que je faisais mais qui, malgré cette incompréhension m'ont toujours soutenue. Je n'oublie évidemment pas mes amies bordelaises qui m'ont permis de m'évader et de plonger dans cette fameuse faille spatio-temporelle dont nous seules possédons le secret. Je pense bien évidemment à **Emilie Rouxel** et à **Aude Retailleau**, d'ailleurs passée par le même chemin et avec qui j'ai partagé de super et nécessaires pauses café/thé. Bravo, on s'en est tirée ! Félicitation Dr. ! Les filles, il va falloir fêter ça à la calle sèche !

Je garde le meilleur pour la fin. Tout d'abord je tiens à te remercier toi, **Fabien**. Merci de m'avoir soutenue, rebooster, écoutée et supportée (vraiment il fallait le faire !) tout au long de cette période. Tu n'as pas toujours compris mes coups de pression, surtout quand il s'agissait de mes souris, mais tu as fait comme si et je t'en remercie. Je tiens à te rendre hommage car toi aussi dans l'ombre, tu t'es beaucoup investi dans ce travail. Maintenant ça y est, c'est fini !

Enfin je remercie **mes parents** et **ma sœur Pauline**. Merci de m'avoir soutenue et amenée jusqu'au bout de cette longue route qu'a été mes études ! Cette thèse marque ainsi la fin de ce chemin et je suis très fière de vous l'offrir à tous les trois. Cette thèse est mon cadeau en retour ! Elle décorera joliment votre bibliothèque !

SOMMAIRE

SOMMAIRE

RESUME	1
REMERCIEMENTS	2
AVANT-PROPOS	11
Liste des publications :	11
Liste des communications orales :.....	12
Liste des communications affichées :.....	12
LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	14
LISTE DES FIGURES	16
INTRODUCTION GENERALE	20
I. Le concept du stress	20
A. Un concept biologique pur	20
B. Une évolution vers un concept psychobiologique.....	21
C. De l'adaptation à la désadaptation face aux stressseurs	23
1) La réponse adaptative au stress, un système complexe finement orchestré.....	23
2) De la désadaptation au stress aux maladies liées au stress.....	27
3) Quand le système s'emballe	28
4) Quand le système est trop faible	31
D. Diversités individuelles des réponses de stress et vulnérabilité.....	32
II. L'axe corticotrope et les glucocorticoïdes	34
A. Fonctionnement de l'axe corticotrope.....	34
1) Stimulation et libération des hormones glucocorticoïdes.....	35
2) Circulation des glucocorticoïdes	36
3) Régulation des glucocorticoïdes par le rétrocontrôle négatif.....	36
4) Rythmes biologiques	37
5) Réactivité corticotrope face au stress	39
6) Réactivité corticotrope au stress dans le cerveau	41
B. Les glucocorticoïdes.....	44
1) Biosynthèse des glucocorticoïdes.....	44
2) Métabolisme des glucocorticoïdes	46
3) Les récepteurs aux glucocorticoïdes	47
a) Structure des récepteurs nucléaires MR et GR.....	48
b) Mécanismes moléculaires d'action de l'action des glucocorticoïdes.....	49
c) Récepteurs membranaires	51

4)	Action des glucocorticoïdes	51
a)	Actions sur la croissance et le développement.....	51
b)	Actions sur le métabolisme	52
	• Cas du stress chronique et ses conséquences sur le poids	53
c)	Actions sur le système immunitaire et inflammatoire.....	55
d)	Actions sur le système nerveux central	55
	• Cas de la mémoire	56
	• Cas de la dépression	57
C.	Modèles d'étude des émotions chez les rongeurs	59
D.	Facteurs de variabilité de l'axe HPA.....	61
1)	Le sexe et le genre	62
2)	Facteurs génétiques de la variabilité de l'axe corticotrope	63
	• Exemple du gène codant pour la CBG	64
III.	La transcortine ou CBG.....	67
A.	Structure et fonctions de la CBG.....	67
1)	La CBG, un membre de la super famille des SERPINS	67
2)	Lieu de biosynthèse de la CBG	69
3)	Structure de la CBG	71
4)	Glycosylation	73
5)	Clairance de la CBG.....	74
6)	Propriétés moléculaires	75
7)	Propriétés de liaison	76
8)	La dynamique de liaison aux glucocorticoïdes : un mécanisme thermosensible .	77
9)	Interaction de la CBG avec les membranes cellulaires	79
B.	Variabilité du taux de CBG	80
1)	Variabilité physiologique de la CBG	80
a)	Dimorphisme sexuel.....	81
b)	Cas de la gestation / grossesse.....	82
c)	Variation circadienne	83
d)	Variabilité de la CBG en réponse au stress	84
e)	Pathologies associées à des niveaux altérés de CBG	86
2)	Variations génétiques et polymorphismes influençant le fonctionnement de la CBG.....	87
a)	Etudes chez l'animal	88
b)	Etude chez l'Homme, polymorphisme de la CBG.....	88
c)	Etudes chez l'Homme, mutations familiales de la CBG.....	90
	• La mutation CBG Leuven.....	90

• La mutation CBG Lyon	92
• Mutation sur l'exon 3 du gène SerpinA6.....	93
• La mutation CBG Null	93
• La mutation CBG Santiago.....	95
d) Le premier modèle murin CBG null	95

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE..... 100

Chapitre 1 : Impact de la déficience en CBG en réponse au stress sur la réactivité de l'axe HPA et impact émotionnel, chez le mâle..... 105

I. Introduction	105
II. Résumé des principaux résultats.....	106
1) Construction de la lignée knock-out Cbg :	106
2) Impact de la déficience en CBG sur l'activité et la réactivité au stress de l'axe HPA :.....	107
3) Réactivité comportementale au stress	108
III. Conclusion	109
IV. Résultats supplémentaires	110
1) Méthode.....	111
2) Résultats	113
3) Conclusion.....	115
V. Publication n°1 :	117

Chapitre 2 : Rôle critique de la CBG dans l'accès des glucocorticoïdes au cerveau lors d'un stress aigu 139

I. Introduction	139
II. Résumé des principaux résultats.....	139
1) Evaluation de la mémoire de rappel en situation basale et après stress : test de l'alternance séquentielle spontanée	139
2) Mesure de la corticostérone intrahippocampique par microdialyse in vivo.....	141
3) Effet d'une infusion intrahippocampique de corticostérone chez les souris Cbg+/+ et Cbg-/-	142
III. Conclusion	142
IV. Publication n°2.....	144

Chapitre 3 : La CBG influence fortement le dimorphisme sexuel de la sensibilité au stress. Etude des femelles..... 166

I. Introduction	166
II. Résumé des principaux résultats.....	167
1) Evaluation du trait de type « dépressif » chez les mâles et les femelles Cbg+/+ et Cbg-/-	167

2) Le dimorphisme sexuel de la régulation de l'axe HPA est dépendant des niveaux de CBG.....	168
3) Les œstrogènes favorisent le dimorphisme sexuel seulement si la CBG est exprimée.....	169
III. Conclusion	170
IV. Publication n°3.....	173
Chapitre 4 : Effets d'un régime enrichi en gras associé à un stress chronique imprévisible sur la prise de poids et le développement de troubles émotionnels. Rôle de la CBG	201
I. Introduction.....	201
II. Résumé des résultats.....	202
1) Conséquences majeures du régime HF associé au stress chronique UCMS chez les souris Cbg-/-	202
2) De nouvelles informations apportées au modèle Cbg-/- en situation basale.....	203
3) Conséquences biologiques du régime HF associé au stress chronique UCMS chez les souris Cbg-/-	204
III. Discussion des résultats actuels et perspectives	205
IV. Publication n°4, en préparation	208
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	259
Rôle majeur de la CBG dans la composition d'une réserve plasmatique de glucocorticoïdes	259
Rôle majeur de la CBG dans la régulation fine de la réponses des glucocorticoïdes au stress.....	261
La souris Cbg-/- : un modèle original d'hypocortisolisme qui offre des perspectives intéressantes.....	266
Conclusion.....	268
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	272

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été effectué au sein du laboratoire Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeurO, INRA UMR 1286) de l'Université de Bordeaux 2. Il a été conduit sous la direction du Dr. Marie-Pierre Moisan et financé par une bourse de thèse de la région Aquitaine et du département Génétique Animale de l'INRA, pour la période d'octobre 2008 à novembre 2011.

Ce travail a fait l'objet de trois publications : une en co-auteur publiée dans *Endocrinology*, deux en premier auteur actuellement soumis. Une dernière partie de mes travaux de thèse nécessitant des résultats supplémentaires fera l'objet d'une quatrième publication en premier auteur. Deux communications orales et neuf communications affichées ont également été présentées lors de divers congrès scientifiques.

Liste des publications :

Richard E.M.; Helbling J.C.; Tridon C.; Desmedt A.; Minni A.M.; Cador M.; Pourtau L.; Konsman J.P.; Mormede P.; Moisan M.P. « Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice » **Endocrinology**. 2010 Feb; 151(2):649-59

Minni A.M., Helbling J.C., Duittoz A., Tridon C., Marissal-Arvy N., De Smedt-Peyrusse V., & Moisan M.P. « Sex differences in stress sensitivity are strikingly influenced by corticosteroid binding globulin in mice » **(Soumis)**

Minni A.M.*, Dorey R.*, Piérard C., Dominguez G., Helbling J.C., Foury, A., Béracochéa D. & Moisan M.P. « Critical role of plasma Corticosteroid-Binding-Globulin to deliver glucocorticoids to the brain during stress: impact on memory retrieval » **(Soumis)**

Minni A.M., Helbling J.C., De Deurwaerdère P., Tridon C., Grégoire S., Bretillon L., Layé S., Pallet V., Castanon N. & Moisan M.P. « Metabolic and behavioral consequences of transcortin deficiency on mice submitted to high fat diet combined to unpredictable chronic mild stress » **(en preparation)**

Liste des communications orales :

Minni A.M., Helbling J.C., Duittoz A., Tridon C., Marissal-Arvy N., De Smedt-Peyrusse V., & Moisan M.P. « Rôle de la transcortine (CBG) dans la vulnérabilité individuelle des réponses de stress », *Journée de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de Bordeaux, Arcachon, France, 7 avril 2011*

Minni A.M., Helbling J.C., Duittoz A., Tridon C., Marissal-Arvy N., De Smedt-Peyrusse V., & Moisan M.P. « Transcortin is crucial in HPA axis and despair-like behavior sex difference in mice », *37ème Colloque de la société de Neuroendocrinologie (SNE) et 4ème Colloque franco-québécois, Ville de Québec, Québec, Canada, 28-30 septembre 2011*

Liste des communications affichées :

Minni A.M. : « Variabilité génétique des réponses au stress : Rôle de la transcortine », *11ème séminaire des Thésards du département de Génétique Animale, Jouy en Josas, France, 23 et 24 mars 2009*

Minni A.M., Helbling J.C., Desmedt A., Tridon C. & Moisan M.P. « Stress and hypothalamic pituitary-adrenal axis in female mice deficient in transcortine », *9ème Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, France, 26-29 mai 2009*

Minni A.M., Helbling J.C., Desmedt A., Tridon C. & Moisan M.P. « Stress and HPA axis in female mice deficient in transcortine », *36ème Colloque de la société de Neuroendocrinologie, 1er Colloque franco-italien, Nice, France, 15-18 septembre 2009*

Minni A.M., Helbling J.C., Tridon C., Castanon N. & Moisan M.P. « Effet d'un régime de type occidental associé à une situation de stress chronique sur la vulnérabilité à développer des troubles de l'humeur dans un modèle animal d'altération de l'axe corticotrope », *Assises du département AlimH, ANSSD, France, 19-22 janvier 2010*

Minni A.M., Desmedt A., Helbling J.C., Tridon C., Beracochea D. & Moisan M.P. « Impairment of stress – adaptive response in male mice deficient in transcortine », *GDR Neuromem, colloque 2010 : LES MEMOIRES, Oléron, France, 17-19 Mai 2010*

Minni A.M., De Deurwaerdère P., Helbling J.C., Tridon C., Castanon N. & Moisan M.P. « Effects of high-fat diet combined with chronic stress on vulnerability to develop despair-like behaviour in an altered hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis animal model », *Journée de l'école doctorale Sciences de la vie et santé de Bordeaux, Arcachon, 28 avril 2010 & The 7th International Congress of Neuroendocrinology (ICN2010), Rouen, France, 11-15 juillet 2010*

Minni A.M., Helbling J.C., Marissal-Arvy N., Duittoz A., Tridon C., de Smedt V., Moisan M.P. « Sexual dimorphism of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and despair-like behavioural reactivities in transcortin-deficient mice », *The 7th International Congress of Neuroendocrinology (ICN2010), Rouen, France, 11-15 juillet 2010*

Minni A.M., Helbling J.C., Duittoz A., Tridon C., Marissal-Arvy N., De Smedt-Peyrusse V. & Moisan M.P. « Transcortin contributes to sex differences of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and despair-like behavior in mice », *10^e colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, France, 24-27 mai 2011.*

Minni A.M., Helbling J.C., Tridon C., Castanon N. & Moisan M.P. « Transcortin deficient mice are insensitive to chronic stress », *10^e colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, France, 24-27 mai 2011.*

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

- 11 β -HSD1 : 11 beta-hydroxystéroïde-déshydrogénase de type 1
- 11 β -HSD2 : 11 beta-hydroxystéroïde-déshydrogénase de type 2
- ACTH : AdrenoCorticoTropic Hormone
- ADN : acide desoxyribonucléique
- ADNc : acide desoxyribonucléique complémentaire
- AF-1 : activation function 1
- AF-2 : activation function 2
- AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- AVP: Arginine Vasopressine
- BDNF: brain derived neurotrophic factor
- BMI : body mass index
- CB1: Récepteur 1 aux endocannabinoïdes
- CBG: Corticosteroid Binding Globulin
- CMV : cytomegalovirus promoter human
- Cre: recombinase
- CRF : corticotropin releasing factor
- CRH : corticotrophin-releasing hormone
- CRH/CRHR1 : CRH récepteur 1
- DBD : DNA-binding domain
- E2 : 17 β oestradiol
- Egr1: Early growth response protein 1 également appelé Zif268 (zinc finger protein 225) ou NGFI-A (nerve growth factor-induced protein A)
- FISH : fluorescent in situ hybridation
- FST: forced swim test
- GH : growth hormone
- GRE : glucocorticoids responsive elements
- GTM : general transcription machinery
- HF: High fat diet
- HPA: axe hypothalamo-hypophyséo-surrénalien ou *hypothalamo-pituitary-adrenal axis*

HSL : lipase hormono-sensible
Hsp : heat shock protein
IFN γ : interféron gamma
IGF-1 : insulin-like growth factor 1
IL-6 : interleukine 6
IRMf : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
Kd : constante de dissociation
k.o. : knock-out
LBD : ligand binding domain
nGRE : negative glucocorticoids responsive elements
POMC : ProPioMelanCortine
PTSD : syndrome de stress post traumatique
QTL : quantitative traits locus
RCL : boucle réactive centrale
RE : réticulum endoplasmique
RIA : Radioimmuno assay
RT-qPCR : real-time quantitative polymerase chain reaction
SERPINs : SERine Protease Inhibitors and Substrates
TBG : thyroxine binding globulin
TST : tail suspension test
TSST : trier social stress test
TF : facteur de transcription
TNF- α : facteur de nécrose tumorale
TSST : trier social stress test
UCMS: unpredictable chronic mild stress
WKY : Wistar Kyoto

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Schéma général de la mise en place de la réponse adaptative face aux stimulations de l'environnement et au stress

Figure 2 : Schéma général des médiateurs du système de stress

Figure 3 : Schéma général de la vague temporelle finement orchestrée du système de stress

Figure 4 : Effets de la réponse homéostatique des systèmes de stress sur la réponse adaptative au stress

Figure 5 : Hypothèse de la cascade des glucocorticoïdes et leurs effets neurotoxiques sur le cerveau en réponse au stress chronique ou intense

Figure 6 : Organisation fonctionnelle de l'axe corticotrope

Figure 7 : Sécrétion circadienne et ultradienne des glucocorticoïdes et de l'ACTH

Figure 8 : Réponse de la corticostérone à différents types de stressseurs chez le rat Wistar (mâles)

Figure 9 : Réactivité au stress des glucocorticoïdes. Comparaison entre la fraction totale et libre de l'hormone dans le plasma et dans les tissus cibles

Figure 10 : Voie de biosynthèse des hormones glucocorticoïdes

Figure 11 : Structure primaire et relations structure-fonction des récepteurs nucléaires

Figure 12 : Mécanisme d'action des récepteurs aux glucocorticoïdes : exemple du GR

Figure 13 : Dispositifs des appareils expérimentaux classiquement utilisés pour évaluer les comportements émotionnels chez le rongeur

Figure 14 : Arbre phylogénétique de l'ADNc de la CBG dans 19 espèces.

Tableau 1 : Les 11 membres de la superfamille des SERPINs regroupés sur le cluster chromosomique humain 14q32.1

Figure 15 : Changement conformationnel de la CBG suite au clivage protéolytique

Figure 16 : Effet de la température sur la liaison CBG-cortisol dans le plasma humain.

Figure 17 : Variants génétique de la CBG chez l'Homme

CHAPITRE 1 :

Figure 18 : Protocole expérimental du stress chronique de type défaite sociale et des tests comportementaux réalisés

Figure 19 : Effets du stress chronique de défaite sociale sur les réponses comportementales mesurées dans le test d'interaction sociale (A) et de forced swim test (B) et concentration plasmatique de la corticostérone plasmatique totale, mesurée le matin, au repos (C).

CHAPITRE 2 :

Figure 20 : Protocole expérimental du test d'alternance spontanée utilisé dans cette étude

CHAPITRE 3 :

Figure 21 : Représentation schématique des modifications histologiques de la muqueuse vaginale au cours du cycle œstral chez la souris.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Figure 22 : Activité basale et après stress de l'axe corticotrope des souris Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-}.

Figure 23 : Etude de la variation de CBG chez les lignées HR, IR et LR de Chadi Touma en situation contrôle (Ctrl) et après 20 minutes de stress de contrainte (Restrained).

Figure 24 : La réponse adaptative au stress est dépendante de la réponse des glucocorticoïdes libres dont les concentrations plasmatiques sont intimement liées à la concentration de CBG ou à sa capacité de liaison

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

I. Le concept du stress

Nous sommes tous concernés par le stress. Dans notre quotidien, notre vie sociale, affective ou encore professionnelle, le stress nous entoure et le terme « stress » est passé dans notre langage commun. Il faut aussi distinguer « **stresseur** » : le facteur de stress et « **stress** » : le processus en réponse au stresseur. Etymologiquement le mot « stress », mot anglais, provient du latin « stringere » qui signifie mettre en tension. La physique des matériaux est à l'origine de cette notion et désigne la force exercée sur un corps qui le contraint ou le déforme et la réaction de ce corps qui résiste à cette force. Mais que signifie vraiment ce terme largement usité ?

Nous verrons que ce concept de stress, d'abord estimé comme un concept purement biologique a évolué en un concept psychobiologique prenant en compte la réponse physiologique au stimulus environnemental stressant mais aussi l'évaluation cognitive et la réactivité émotionnelle qui en sont faites. Il définit alors à la fois la cause et la conséquence : l'action de l'environnement sur l'organisme et les réponses de ce même organisme (physiologiques, cognitives et émotionnelles) pour s'adapter à son environnement.

A. Un concept biologique pur

Dans « Leçons sur les phénomènes de la Vie » (1878), Claude Bernard introduit le principe que la « fixité du milieu intérieur est la condition de la vie libre, indépendante ». Cette stabilité relative du milieu intérieur sera par la suite nommée « **homéostasie** » par Walter Cannon en 1929, désignant le processus physiologique permettant de maintenir certaines constantes du milieu intérieur de l'organisme (température, pression osmotique, pression artérielle, glycémie, etc.) nécessaires à son bon fonctionnement. C'est la **réaction d'alarme**, qui conduit l'organisme à mobiliser sa propre énergie afin de lutter ou de fuir face à la contrainte extérieure (*fight or flight*). Cannon fut le premier à décrire la spécificité des réponses

du système nerveux sympathique (conduisant à la libération d'adrénaline et de noradrénaline) dans le maintien de l'homéostasie en réponse aux effets du stress. C'est ainsi que le froid active préférentiellement le système noradrénergique, vasoconstricteur et responsable de la production de chaleur et que la baisse de la concentration de glucose sanguin induit une libération d'adrénaline hyperglycémisante permettant la mobilisation des réserves énergétiques, alors que la sécrétion d'insuline, hypoglycémisante, est réduite. Cependant, lorsque le stimulus de stress s'intensifie, la contrainte exercée sur les mécanismes homéostatiques devient excessive et il est alors observé une généralisation non spécifique de la réponse de l'organisme (Cannon, 1935).

Le terme de « stress » a ensuite été défini en 1936 par Hans Selye comme étant « la réponse non spécifique de l'organisme à toute demande qui lui est faite ». Ainsi, pour Selye la réponse au stress n'est donc pas caractéristique de la nature du stressor mais est au contraire identique, n'ayant pour seul but que de rétablir l'équilibre homéostatique. Il parle de « **syndrome général d'adaptation** », encore appelé **syndrome biologique du stress**, qui s'articule en trois phases : la **réaction d'alarme** durant laquelle l'organisme mobilise l'énergie qui lui est nécessaire pour lutter contre les agents stressants et qui correspond à la réaction décrite par Cannon ; la **phase de résistance** qui se met en place si le stimulus persiste et où l'organisme met en place une réaction adaptative ; et enfin une **phase d'épuisement** lorsque l'organisme ne peut plus faire face au stress. Hans Selye a montré lui aussi que ce syndrome non spécifique résulte de la mobilisation du système nerveux autonome mais aussi d'un système neuroendocrinien majeur : l'axe corticotrope mesuré par l'élévation des concentrations d'hormones glucocorticoïdes dans le plasma (Selye, 1937, 1973).

B. Une évolution vers un concept psychobiologique

A tort, le stress a longtemps été considéré comme étant un réflexe physiologique pur entraînant l'activation non spécifique des systèmes neuroendocriniens quelque soit le stressor, ignorant ainsi le côté psychologique. Ceci signifierait que nous devrions tous éprouver un stress identique et de la même intensité, face à une même situation. Pourtant, chacun est différent dans sa

perception et sa réaction face au stress (ex: parler en public, rendez-vous chez le dentiste).

Les travaux de John Mason ont été les premiers à démontrer l'importance de l'impact psychologique dans une expérience menée sur deux groupes de singes qui n'avaient pas été nourris pendant une courte période. Dans le premier groupe, les singes étaient seuls alors que dans le second, les singes pouvaient voir d'autres singes être nourris. Bien que les deux groupes subissent le même stress physique dû à la faim, ceux qui avaient vu les autres manger présentaient une élévation d'hormones glucocorticoïdes supérieure ainsi qu'une agitation comportementale plus importante que le groupe de singes isolés, où l'aspect psychologique était donc masqué (Mason et al., 1961). Dans une étude indépendante conduite chez le rat, Seymour Levine montra qu'un rat ayant appris à associer un goût avec un malaise gastrique montre une forte élévation de glucocorticoïdes lorsqu'il est forcé de boire une solution avec ce goût. Cette activation disparaît s'il peut choisir entre cette solution et une autre qui lui paraît sans danger (Levine, 2000).

Ainsi, l'étude du stress a quitté le domaine de la physiologie pure pour rejoindre le domaine de la **psychobiologie** puisqu'une réactivité émotionnelle et une évaluation cognitive s'avèrent cruciales dans l'ajustement de la réponse adaptative face aux stimulations de l'environnement (Dantzer, 2010). La conception moderne du stress intègre ainsi la diversité des processus d'ajustement d'aspects biologiques, avec principalement l'activation du système nerveux autonome et de l'axe corticotrope, coordonnée aux aspects psychiques, alliant la perception de l'environnement par l'individu et les possibilités comportementales dont il dispose pour le contrôler et y faire face. Les neuropsychologues regroupent ces processus d'ajustement sous le terme de « **coping** » (Lazarus, 1993). Les différents éléments de la réponse adaptative mise en place par un individu suite à un stimulus environnemental sont présentés dans la **figure 1**.

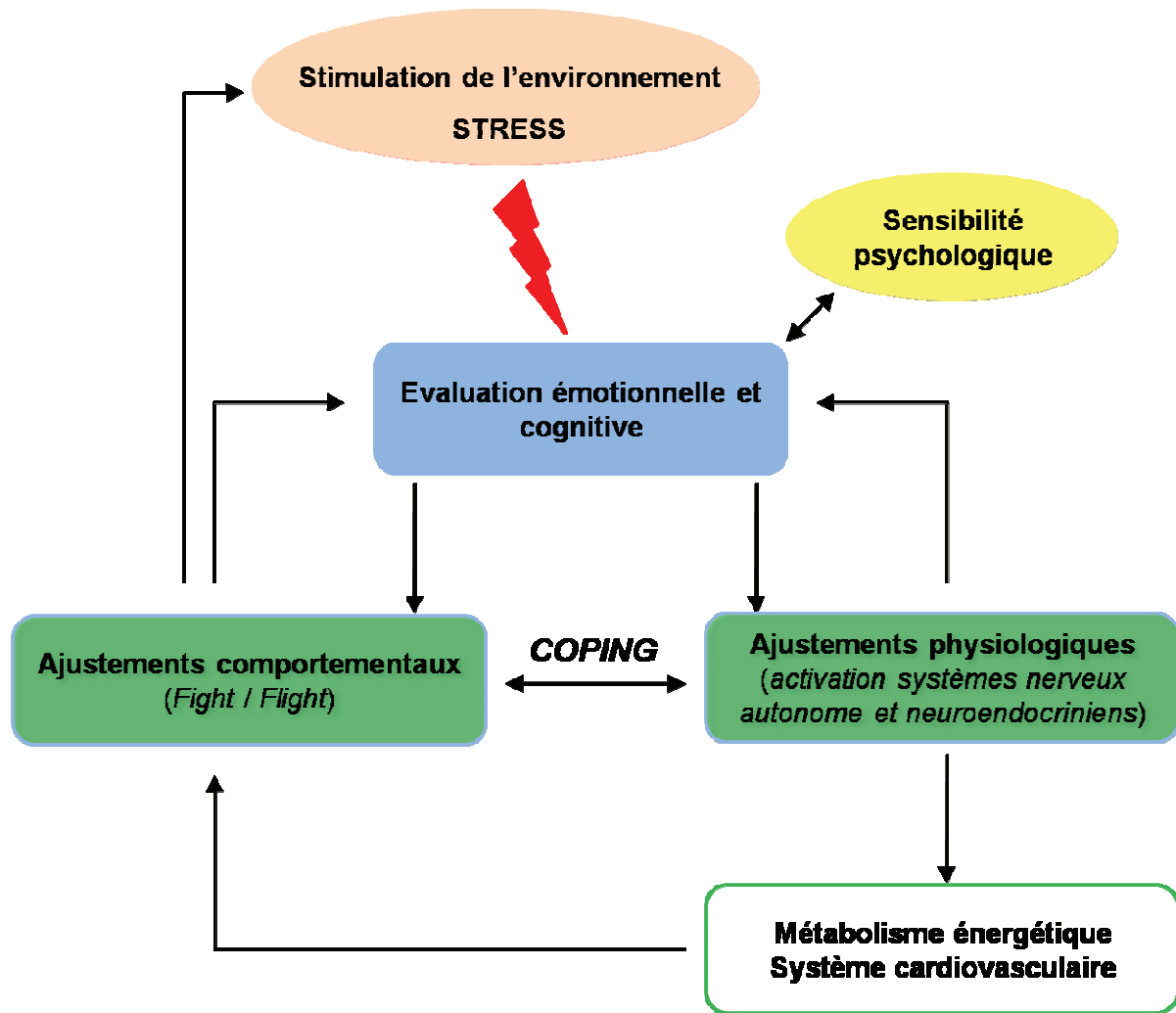


Figure 1 : Schéma général de la mise en place de la réponse adaptative face aux stimulations de l'environnement et au stress

Les ajustements comportementaux permettent à l'organisme d'agir directement sur l'environnement et l'activation neuroendocrinienne, qui met principalement en jeu l'axe corticotrope et le système nerveux autonome, adapte le milieu intérieur aux besoins de l'action comportementale. Ce schéma général est fortement modulé par les caractéristiques de réactivité individuelle qui définissent la sensibilité psychologique de l'individu conditionnée par les facteurs génétiques, les influences environnementales précoces et l'expérience préalable du sujet.

C. De l'adaptation à la désadaptation face aux stressseurs

1) La réponse adaptative au stress, un système complexe finement orchestré

Le stress est indispensable à la survie. Chaque organisme vivant est constamment soumis à divers stimuli appelé « stressseurs », internes ou externes, émotionnels ou physiques, perçus positivement (remporter un challenge, effort

physique, prendre la parole en public) ou négativement (événements menaçants, situation d'incertitude ou imprévisible) et sollicitant ainsi l'organisme à rétablir en permanence son homéostasie. Divers ajustements comportementaux et physiologiques s'articulent afin de mettre en place la réponse adaptative au stress dans le but de protéger l'organisme. Celui-ci gardera enfin une mémoire cognitivo-émotionnelle de la situation permettant alors de stocker dans la mémoire les nouvelles informations qui seront utiles lors d'une nouvelle exposition à ce même stresser. La **réponse adaptative au stress** est possible grâce à l'action complexe et finement orchestrée de nombreux circuits neuronaux centraux et périphériques (système métaboliques et immunitaire) libérant des molécules médiatrices du stress et prenant naissance dans divers niches spatiales distinctes (Joels and Baram, 2009; Ulrich-Lai and Herman, 2009). Ce système de stress est présenté dans la **figure 2**.

Schématiquement, le système de stress est caractérisé par deux vagues temporelles d'action des médiateurs du stress. **L'amygdale**, structure cérébrale impliquée dans la gestion des émotions, a été montrée comme ayant un rôle central dans la détection de l'évènement stresser physique ou psychologique (Davis and Whalen, 2001; Murray et al., 2007). Cette structure du système limbique est en connexion directe avec le locus coeruleus et de nombreux systèmes appartenant à la première vague d'action rapide (de la minute à la seconde et qui cessent leur activité tout aussi rapidement) des médiateurs du stress (Armony and LeDoux, 1997). Ainsi les **monoamines** telles que la sérotonine (libérée par les noyaux du Raphé), la dopamine (striatum), l'adrénaline et la noradrénaline (medullo-surrénales) ainsi que des **neuropeptides** comme la CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*, dans l'hypothalamus) vont exercer leur action via des récepteurs membranaires couplés à la protéine G. Cette première vague va permettre aux fonctions cérébrales supérieures telle que le **cortex préfrontal** d'augmenter la vigilance, l'éveil émotionnel, l'attention, le traitement des informations reçues et la prise de décision conduisant au choix de la stratégie optimale pour faire face au stresser, au détriment de fonctions non nécessaire à la réponse adaptative au stress comme la croissance, la reproduction ou encore la prise alimentaire. Au niveau des fonctions périphériques ces médiateurs vont favoriser l'oxygénation du cerveau, du cœur et des muscles, organes cruciaux à la coordination centrale de la réponse de *fight or flight* au stress.

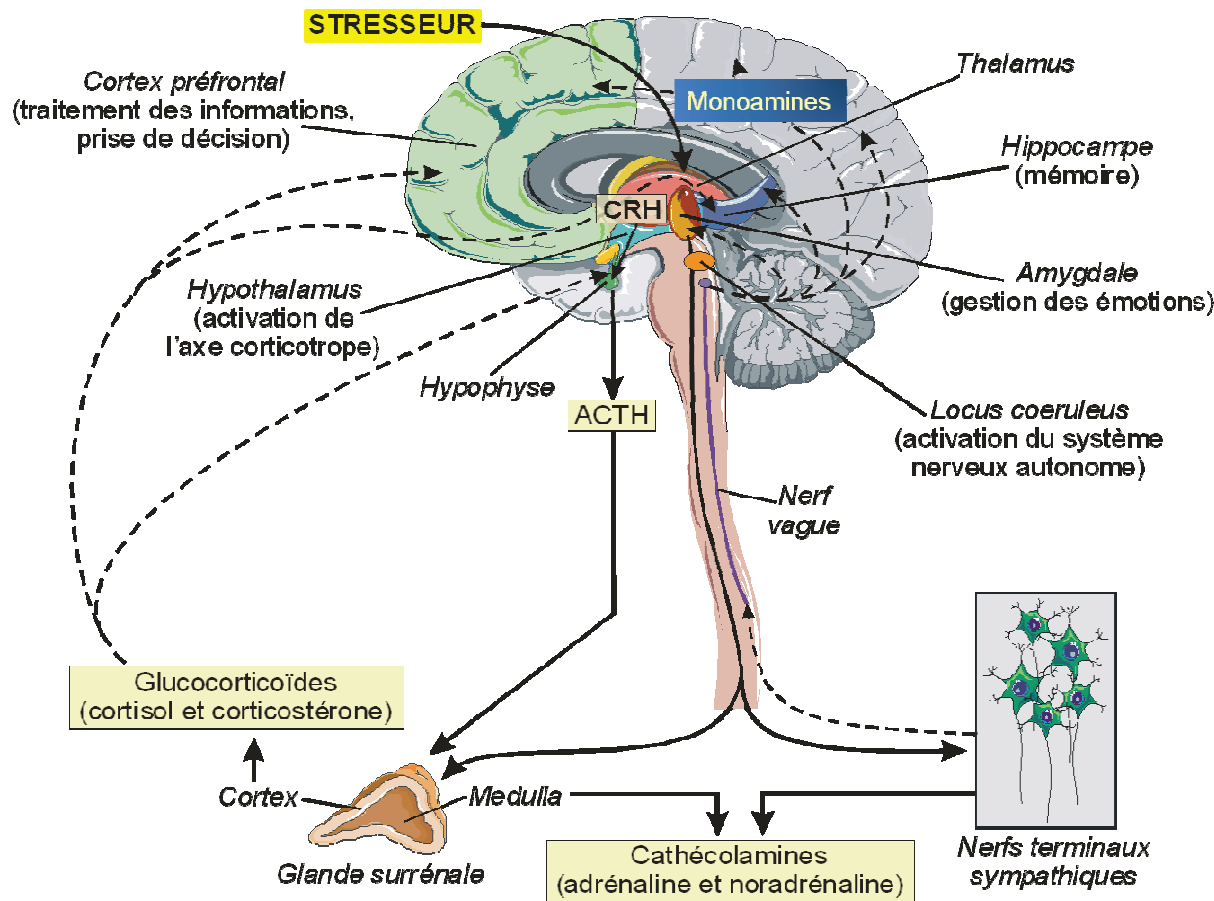


Figure 2 : Schéma général des médiateurs du système de stress
tirée de (Expertise, 2011)

Cette action rapide des premiers médiateurs du stress n'est ni suffisante ni optimale pour maintenir la réponse adaptative. C'est dans la deuxième vague d'action que la réponse adaptative prolongée est possible grâce à l'action des **hormones glucocorticoïdes**. Celle-ci est en effet plus tardive. Elle débute environ une heure après l'apparition du stressueur et perdure plusieurs heures en raison du temps nécessaire à leur synthèse et à leur libération rapide (quelques minutes), puis à leur transport de la circulation sanguine aux tissus cibles et à leur action génomique par l'intermédiaire de leurs récepteurs intracellulaires (MR : récepteurs aux minéralocorticoïdes et GR : récepteurs aux glucocorticoïdes). Les complexes récepteurs-glucocorticoïdes agissent alors en tant que facteurs de transcription altérant ainsi l'expression de gènes et des fonctions cellulaires favorisant par exemple, dans l'hippocampe, la consolidation de la mémoire des informations liées au stressueur (de Kloet et al., 2005).

Il ne faut toutefois pas considérer ce découpage temporel de manière aussi figée. Les hormones glucocorticoïdes présentent aussi des actions non génomiques, rapides via des récepteurs membranaires de type MR favorisant la libération de glutamate à la surface des synapses. De même les peptides et les monoamines entraînent également des actions génomiques prolongées en agissant via des facteurs de transcription tels que CREB (Chaouloff and Groc, 2010). Cette vague temporelle du système de stress est représentée **figure 3**.

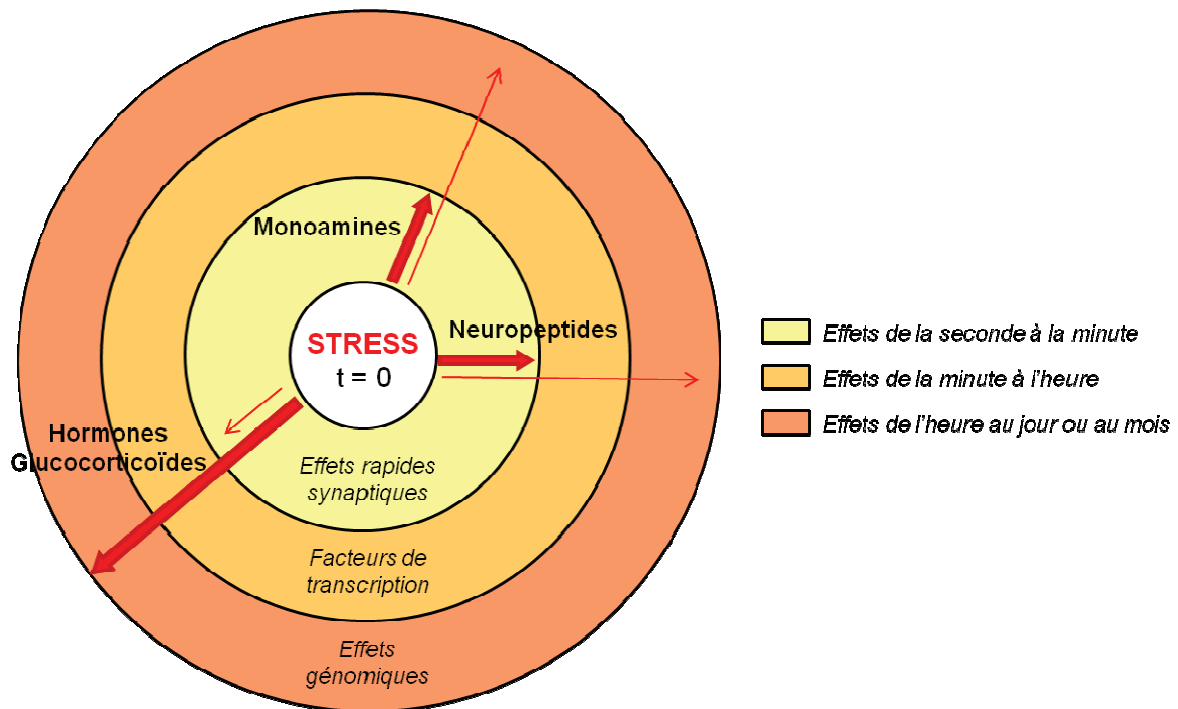


Figure 3 : Schéma général de la vague temporelle finement orchestrée du système de stress

tirée de (Joels and Baram, 2009)

La vague de réponse de stress est classiquement caractérisée par deux vagues temporelles d'action des médiateurs de stress. La première inclut les actions systémiques rapides (de la seconde à la minute) des monoamines comme la sérotonine, la dopamine, l'adrénaline, la noradrénaline etc. et des neuropeptides comme le CRH via leurs récepteurs membranaires. La deuxième vague qui permet de maintenir dans le temps la réponse adaptative, comme la consolidation de la mémoire associée aux expériences liées au stress, est attribuée aux hormones glucocorticoïdes agissant via leurs récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription impactant ainsi sur l'expression de gènes et des fonctions cellulaires. Leur action peut ainsi durer de la minute au mois.

2) *De la désadaptation au stress aux maladies liées au stress*

L'organisme est donc apte à produire la réponse adaptative au stress qui est même vitale. Il est parfaitement capable de s'adapter et de rétablir son équilibre homéostatique vis-à-vis d'un stressor ponctuel par un système de rétrocontrôle négatif de la réponse de stress. On parle ici de **stress aigu**. Cependant l'intensité du stress, sa durée, sa répétition et ses conséquences sur le long terme peuvent parfois être coûteuses physiquement, mentalement et émotionnellement pour l'individu. On parle alors de **stress intense** et/ou **chronique** qui laissent des « traces » dans l'organisme associées à des symptômes biologiques ou psychologiques.

Dans ce contexte de stress chronique, la récupération et le retour de l'organisme à une homéostasie de base deviennent difficiles voire impossible. Sterling et Eyer ont été les premiers à introduire le terme d'**allostasie** (Sterling and Eyer, 1988), largement repris ensuite par McEwen (McEwen, 1998), pour évoquer un changement de niveau basal d'homéostasie des différentes fonctions physiologiques centrales et périphériques. Le terme de **cacostasie** a ensuite été posé pour désigner une homéostasie défectueuse, contraignante pour l'organisme (Chrousos, 2009).

Toutes ces dérégulations chroniques des systèmes de stress, par le biais d'expression de gènes cibles ou de désensibilisation de récepteurs d'hormones ou de neurotransmetteurs, contribuent au développement d'une réponse inappropriée. C'est la **maladaptation** ou la **désadaptation au stress**. Les mécanismes homéostatiques des systèmes de stress permettant l'adaptation peuvent être représentés sous forme d'une courbe dose-réponse en U inversée, illustrant parfaitement le problème de balance entre ces systèmes adaptatifs. Il en résulte soit une hyperactivité soit une hypoactivité des systèmes centraux et périphériques et notamment des niveaux sanguins de glucocorticoïdes (**Figure 4**). Aux vues de la large étendue d'action du système de stress, il est aisé de comprendre que ces dérégulations homéostatiques peuvent aussi bien perturber la croissance, le développement, la composition corporelle et entraîner des troubles comportementaux, endocriniens, métaboliques, cardiovasculaires, autoimmuns ou encore allergènes.

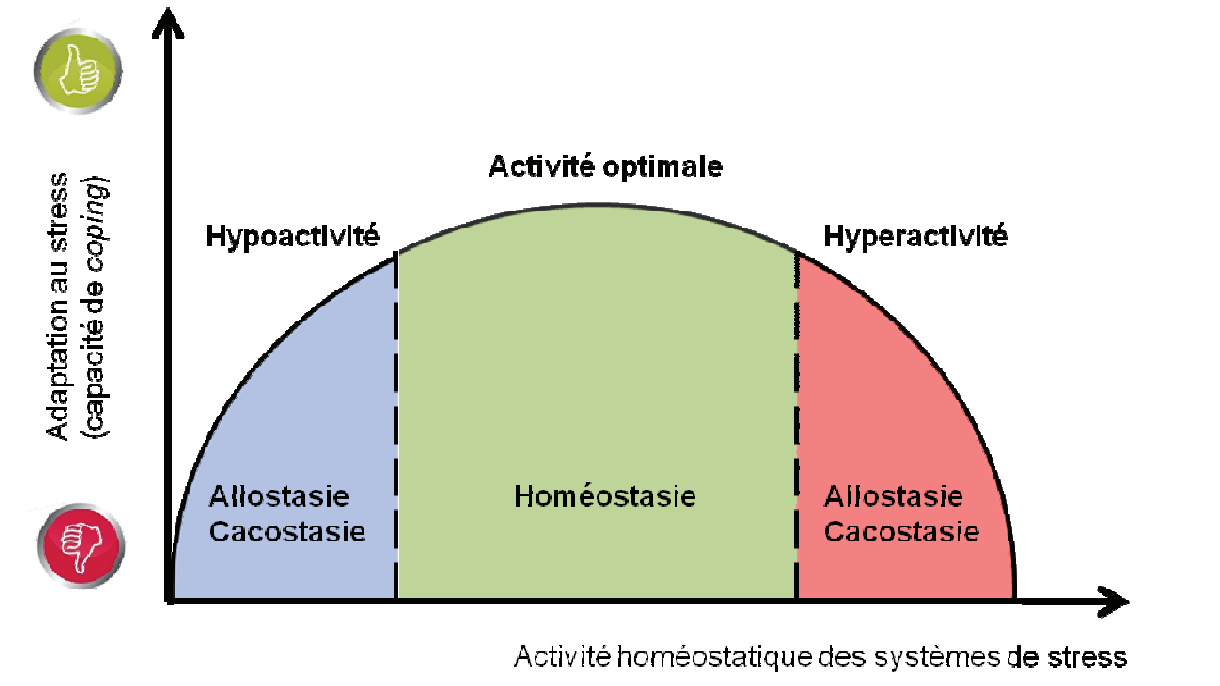


Figure 4 : Effets de la réponse homéostatique des systèmes de stress sur la réponse adaptative au stress

tiré de (Chrousos, 2009)

L'activité homéostatique des systèmes de stress sur la réponse adaptative est dose dépendante. L'homéostasie se trouve au milieu de cette courbe où les systèmes de stress permettent une réponse optimale et ainsi une bonne adaptation au stress. Une hypoactivité ou une hyperactivité de ces systèmes, appelés allostasie ou cacostasie, peuvent conduire à une mauvaise adaptation au stress voire au développement de pathologies.

Ces dérégulations sont toutes sortes d'éléments pouvant faire passer la réponse au stress de « normale » et adaptative, au pathologique. C'est le passage vers cette frontière pathologique, qualifiée de **charge allostatique (*allostatic load*)** (McEwen and Stellar, 1993; Korte et al., 2005) qui conduit au développement de « maladies-liées au stress » somatiques et comportementales telle qu'anxiété, dépression, hypertension, infarctus du myocarde, obésité, diabète, athérosclérose, maladies auto-immunes, ostéoporose, apnée du sommeil, addiction et bien d'autres encore (Piazza and Le Moal, 1998; Koob and Le Moal, 2001; Pariante and Lightman, 2008; Chrousos, 2009).

3) *Quand le système s'emballe*

Lors de situation de stress chronique ou intense donc, il y a notamment une sécrétion prolongée et répétée d'hormones glucocorticoïdes. Robert Sapolsky parle

de l'hypothèse de la « cascade glucocorticoïde » (Sapolsky et al., 1986). Le stress chronique va affaiblir toutes les structures contenant des récepteurs aux glucocorticoïdes et principalement celles qui assurent le rétrocontrôle négatif de la réponse de l'axe corticotrope au stress.

Au niveau du cerveau, cette exposition prolongée des glucocorticoïdes conduisant à un hypercortisolisme chez l'Homme, participe au développement d'altération des fonctions cérébrales. En effet, les neurones hippocampiques qui contiennent de nombreux récepteurs aux glucocorticoïdes vont être endommagés voire détruits par cette surexposition. Ainsi, connaissant leur influence sur l'apprentissage et la mémoire, cette altération neuronale conduit à la réduction de l'inhibition tonique de l'hippocampe sur l'activation de l'axe. La concentration plasmatique des glucocorticoïdes est alors augmentée ce qui va d'autant plus altérer les neurones hippocampiques. Des études chez l'animal ont démontré qu'un stress chronique ou intense ou encore l'administration de forte dose de glucocorticoïdes altère au niveau de l'hippocampe la libération de neurotransmetteurs, la morphologie des épines dendritiques, la plasticité synaptique et les processus de neurogénèse dans le gyrus denté en affectant la survie des neurones progéniteurs et matures de cette région de l'hippocampe (Galea et al., 1997; McEwen, 2000; Sousa et al., 2008). Le stress chronique ou intense mène l'organisme dans un cercle vicieux conduisant à une dérégulation progressive de l'activité de l'axe corticotrope associée à des conséquences fonctionnelles sur le cerveau comme des troubles de l'humeur, de la mémoire et de l'attention. Ces phénomènes d'atrophie ont également été observés dans le cortex préfrontal médian conduisant alors à une altération de l'attention et de la mémoire de travail (Arnsten, 2009). Ainsi un excès de glucocorticoïdes peut devenir neurotoxique (Goosens and Sapolsky, 2007).

A l'inverse, une exposition à un stress chronique va induire au niveau du noyau basolatéral de l'amygdale une hypertrophie dendritique. Chez l'animal, cette hypertrophie est associée à une augmentation de la mémoire de peur conditionnée, c'est-à-dire à une augmentation de la mémoire émotionnelle (Roosendaal et al., 2001a; Roosendaal et al., 2009a; Roosendaal et al., 2009b). Chez l'Homme, des études d'imagerie ont montré que des patients atteints du syndrome de stress post-traumatique (PTSD) suite à l'exposition de l'individu à un stress traumatique intense,

présentent une hyperactivité de l'amygdale en réponse à des stimuli rappelant le trauma (Liberzon et al., 1999).

Comme nous venons de le voir, les glucocorticoïdes ont un rôle important dans les effets de remodelage des neurones, en interagissant avec les neurotransmetteurs tels que le glutamate, la sérotonine, les opioïdes endogènes ou le GABA (acide gamma-aminobutyrique). En particulier la libération de glutamate, régulée par les glucocorticoïdes, a un rôle majeur dans la plasticité neuronale. Des études sur neurones en culture ont montré que l'application de glucocorticoïdes favorise à court terme l'intensité de la transmission synaptique en augmentant le trafic des récepteurs glutamatergiques à la surface des synapses, ce qui permet alors une connexion synaptique plus efficace faces aux demandes de l'activité cérébrale. Par contre, après plusieurs heures on observe l'effet inverse car les glucocorticoïdes en plus d'augmenter le trafic des récepteurs glutamatergiques, accroissent aussi leur nombre au niveau de la synapse, limitant de fait les possibilités de plasticité de cette dernière (Groc and Chaouloff, 2008). L'exposition prolongée à un stress ou aux glucocorticoïdes diminue l'activité des systèmes monoaminergiques tels que la sérotonine et la dopamine alors qu'ils sont activés lors d'un stress aigu. Le renouvellement de la sérotonine et sa libération sont généralement diminués, tout comme celle de la dopamine induisant une perte du désir, et de la valeur de récompense. De plus, le CRH et la noradrénaline s'activent mutuellement à travers le réseau amygdale-locus coeruleus contribuant à l'état d'anxiété et d'hypervigilance. Le rôle du remodelage des dendrites est considéré adaptatif par certains auteurs afin d'éviter une suractivation du glutamate qui engendrerait des effets neurotoxiques irréversibles alors que d'autres chercheurs pensent, qu'au contraire, la réduction de la taille et de la densité des épines dendritiques accroît la vulnérabilité des neurones aux effets neurotoxiques (McEwen, 2007; Chaouloff and Groc, 2011). La **figure 5** illustre les effets d'un stress chronique ou intense sur les structures limbiques cibles des glucocorticoïdes notamment.

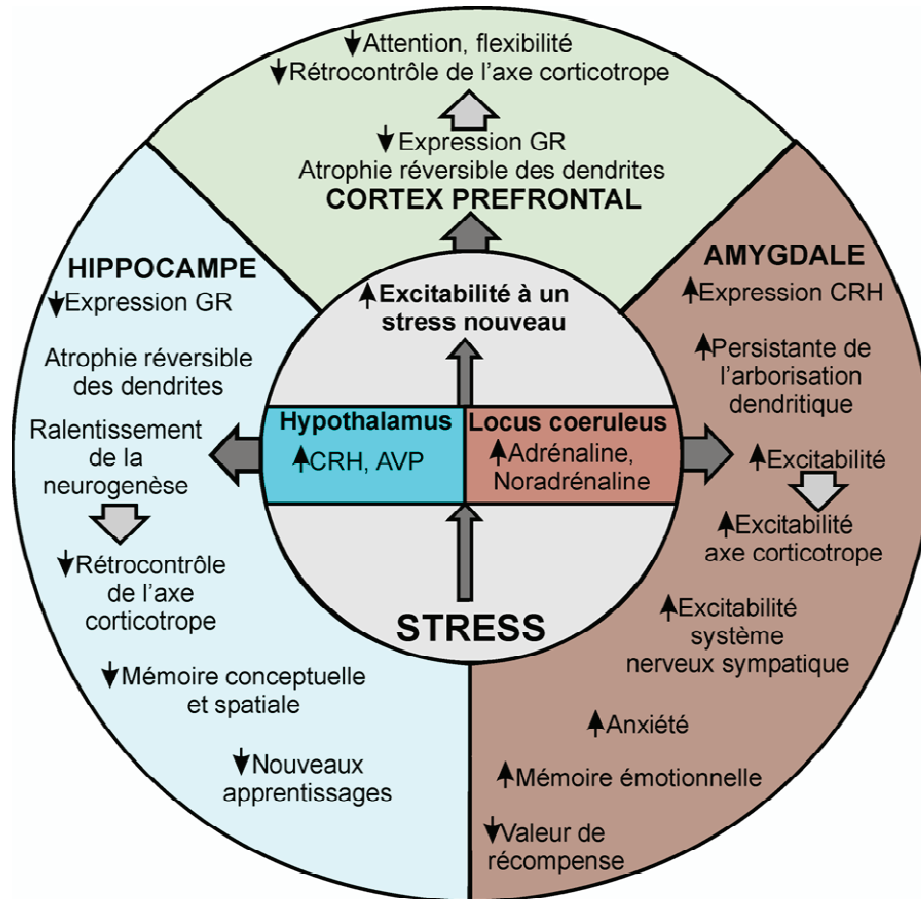


Figure 5 : Hypothèse de la cascade des glucocorticoïdes et leurs effets neurotoxiques sur le cerveau en réponse au stress chronique ou intense
tiré de (Expertise, 2011)

4) **Quand le système est trop faible**

A l'inverse de l'hypothèse de la cascade glucocorticoïdes, depuis une dizaine d'années, un ensemble de données fait apparaître qu'une déficience du signal glucocorticoïde peut engendrer des effets aussi délétères que l'hyperactivité de cette hormone (Raison and Miller, 2003). Cette déficience du signal glucocorticoïde est retrouvée dans plusieurs maladies liées au stress: le syndrome de fatigue chronique, la douleur chronique pelvienne, la fibromyalgie, le syndrome de l'intestin irritable, les douleurs lombaires, le *burn out*, la dépression atypique et le syndrome de stress post-traumatique (Heim et al., 2000; Raison and Miller, 2003).

Les conséquences physiopathologiques d'un signal glucocorticoïde déficient sont diverses et liées à la suractivation de systèmes et voie de signalisation qui sont normalement inhibées par des niveaux de glucocorticoïdes efficaces. Pour ne citer

qu'un exemple, le processus inflammatoire non refreiné conduit à une augmentation, en périphérie mais aussi dans le cerveau, de la libération de cytokines pro-inflammatoires toxiques pour l'organisme et favorisant alors le développement de symptômes dépressifs (Rhen and Cidlowski, 2005; Canello and Clement, 2006; Dantzer et al., 2008).

D. Diversités individuelles des réponses de stress et vulnérabilité

Le stress nous entoure, il fait partie de notre quotidien. Pourtant, nous ne sommes pas tous égaux face aux effets du stress et nous ne développons pas tous des pathologies liées au stress. En effet, les capacités d'ajustement au stress sont caractéristiques de l'individu. De ce fait, il existe une grande variabilité interindividuelle de la réactivité au stress qui relève d'une interaction entre le patrimoine génétique et l'histoire personnelle.

Chez l'Homme, les études comparatives menées sur des jumeaux monozygotes (partageant le même patrimoine génétique) et des jumeaux dizygotes (partageant 50% de leur patrimoine génétique), en prenant en compte des effets de l'environnement (enfance difficile versus enfance sans problème), ont montré que les gènes contribuent pour environ 40% de la variabilité interindividuelle au stress (Expertise, 2011). Chez l'animal, l'influence des gènes sur la réactivité au stress a également été démontrée par des études de sélection génétiques portant sur une mesure de réactivité au stress. En effet, le groupe de Chadi Touma a soumis une population de souris de souche hétérogène (lignée CD-1) à un stress de contrainte de 15 minutes. Par des mesures de corticostérone plasmatique totale et des mesures comportementales (comportement exploratoire, trait de type anxieux et de résignation), ils ont alors sélectionné génétiquement, par croisement sur plusieurs générations, des souris à forte réactivité au stress (souris HR), présentant une forte élévation des niveaux plasmatiques de l'hormone après stress et des comportements plutôt de type actif, et à l'inverse, des souris à faible réactivité au stress (souris LR), présentant une faible élévation de corticostérone après stress et des comportements de type passif (Touma et al., 2008). De telles sélections faites pour des mesures

comportementales et endocriniennes témoignent ainsi d'une prédisposition génétique robuste des phénotypes de réactivité au stress.

Depuis quelques années, un domaine est en plein essor : l'épigénétique appliquée au stress. En effet, les événements de vie et l'histoire de l'individu peuvent façonner dès la période intra-utérine la réactivité au stress d'un individu. Il ne s'agit pas d'un changement de séquence de l'ADN mais de l'ajout transmissible et réversible de groupement méthyle (CH₃) ou acétyle (CH₃CO) sur les histones, modifiant ainsi l'activation de certains gènes. Des études menées sur le comportement maternel chez le rat ont montré que des rats élevés par des mères prodiguant peu de soins maternels avaient une réactivité au stress accrue à l'âge adulte ainsi qu'un déclin cognitif plus prononcé au cours du vieillissement, cela de façon transmissible au cours des générations. Par contre, si ces mêmes rats, nés de mère prodiguant peu de soins maternels, étaient adoptés par une mère portant beaucoup de soins ceux-ci présentaient alors une réactivité au stress normale sans problème cognitif particulier, témoignant que ces observations n'étaient pas d'origine génétique. Les études moléculaires menées chez ces animaux rapportent que la réactivité au stress élevée des rats n'ayant pas eu de soins maternels serait due à une hyper-méthylation du gène codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes dans une structure cérébrale, l'hippocampe (Meaney and Szyf, 2005). Chez l'homme, une étude portant sur des cerveaux de suicidés rapporte que ce gène des récepteurs aux glucocorticoïdes est hyper-méthylé uniquement dans le groupe de suicidés qui a subi des traumatismes pendant l'enfance, suggérant que ces traumatismes laissent des marques épigénétiques qui rendraient les individus plus vulnérables au stress lorsqu'ils deviennent adultes (McGowan et al., 2009).

Ainsi la sensibilité au stress d'un individu et sa capacité d'y faire face sont donc dépendantes de l'environnement, de la génétique, de leur interaction.

Nous venons de voir qu'en réponse au stress, de nombreux systèmes biologiques s'activent notamment deux systèmes majeurs : le système sympathique et l'axe corticotrope. Au cours de mes travaux de thèse, je me suis particulièrement intéressée à ce dernier. Il est présenté dans la deuxième partie de cette introduction générale.

II. L'axe corticotrope et les glucocorticoïdes

A. Fonctionnement de l'axe corticotrope

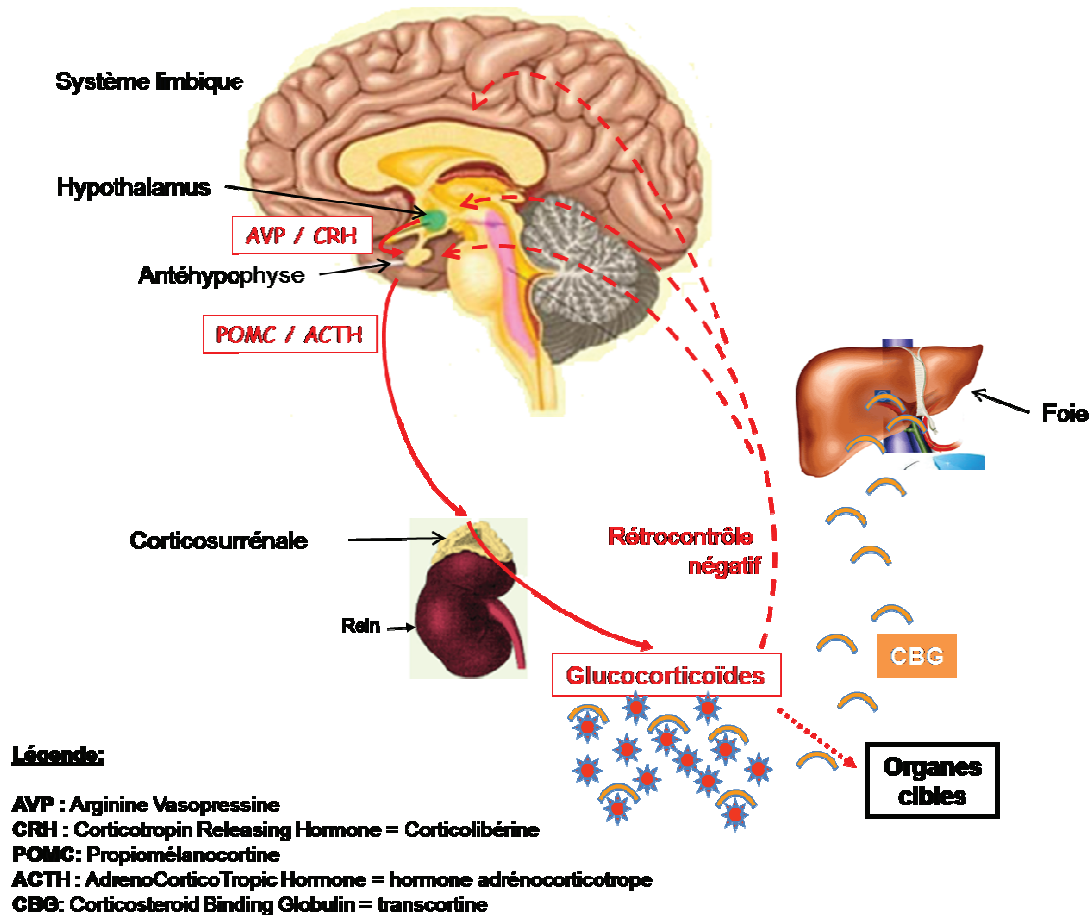


Figure 6 : Organisation fonctionnelle de l'axe corticotrope

L'activation de l'axe corticotrope est initiée par la réception par l'hypothalamus des informations provenant des centres nerveux supérieurs du système limbique. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus répond par une production de peptides hypothalamiques : AVP et CRH. Ceux-ci stimulent la production et la libération de l'ACTH par l'antéhypophyse. Cette hormone stimule à son tour la synthèse et la libération dans la circulation sanguine des hormones glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et le Porc ; corticostérone chez les rongeurs et les oiseaux) par le cortex surrénalien. Dans la circulation les glucocorticoïdes vont former un complexe avec la transcortine ou CBG, conduisant à un équilibre entre les fractions libres de l'hormone (~5%), la fraction liée à la CBG (~80%) ou à l'albumine (~15%). Enfin, les glucocorticoïdes exercent un rétrocontrôle négatif sur l'activité de l'axe corticotrope au niveau de l'hypophyse, de l'hypothalamus et des centres nerveux supérieurs afin de contrôler sa propre libération.

L'axe corticotrope ou axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA en anglais pour *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*) constitue un système neuroendocrinien majeur. Il est composé de trois structures principales en

interactions : l'hypothalamus, l'antéhypophyse et les glandes surrénales. Comme la plupart des systèmes neuroendocriniens, l'axe corticotrope est un système en cascade avec une boucle de rétroaction négative grâce à laquelle le produit final inhibe, notamment, la production ou la libération de la substance initiatrice de cette cascade d'activation. Une grande diversité de stimuli (rythme circadien, prise alimentaire, stimuli homéostatiques ou externes) peut être à l'origine de l'activation de l'axe corticotrope. Celle-ci aboutit à la libération dans la circulation sanguine des hormones glucocorticoïdes, responsables de la plupart des effets physiologiques de l'activation de l'axe corticotrope (Dallman et al., 1989; McEwen, 2007) (**Figure 6**).

1) Stimulation et libération des hormones glucocorticoïdes

L'hypothalamus et plus précisément le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus est le point de départ de l'axe corticotrope. Il est le centre intégrateur de l'axe et reçoit les afférences provenant des centres supérieurs, notamment celles du système limbique telle que le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hippocampe, le septum et encore le thalamus (Gray et al., 1989). En réponse à ces stimulations, le PVN produit et libère l'arginine vasopressine (AVP), peptide de 9 acides aminés responsable de la sécrétion de la **corticolibérine** ou **CRH** (*corticotropin releasing hormone*).

La CRH est un neuropeptide de 41 acides aminés synthétisés dans les neurones parvocellulaires du PVN. Ces neurones se projettent sur la couche externe de l'éminence médiane jusqu'au système porte hypothalamo-hypophysaire, lieu de sécrétion des hormones hypothalamiques. La CRH, ainsi libérée dans les capillaires irriguant l'antéhypophyse peut alors agir sur les cellules corticotropes en se fixant sur ces récepteurs hypophysaires spécifiques. Cette fixation permet alors l'activation de la transcription du gène codant pour la proopiomélanocortine (POMC), peptide de 241 acides aminés et précurseur de l'**hormone adrénocorticotrope** ou **ACTH** (adrenocorticotropic hormone), peptide de 39 acides aminés très conservé (Riniker et al., 1972).

L'ACTH est sécrétée et libérée dans la circulation sanguine et agit alors sur les cellules du cortex surrénalien de la glande surrénale pour activer la synthèse des

hormones glucocorticoïdes. Une libération chronique d'ACTH augmente la taille de la masse corticale des surrénales et entraîne une augmentation de la capacité de synthèse et de sécrétion des glucocorticoïdes (Slavinski et al., 1976). Au niveau hypothalamique, l'ACTH exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de CRH et donc sur la sécrétion même de l'ACTH (Aguilera, 1994).

2) Circulation des glucocorticoïdes

Une fois libérés dans la circulation sanguine et dans des conditions basales, les glucocorticoïdes se lient avec une forte affinité mais une faible capacité à la **transcortine** (~80-90%) encore appelée **CBG** (*Corticosteroid Binding Globulin*), glycoprotéine plasmatique synthétisée par les hépatocytes, et à l'albumine (~15%) avec une grande capacité mais de manière non spécifique. Les ~5-10% restant de l'hormone circulante constituent la forme libre des glucocorticoïdes (Hammond et al., 1980; Dunn et al., 1981; Siiteri et al., 1982; Breuner and Orchinik, 2002). Il est à noter que les formes circulantes libres et liées du cortisol et de la corticostérone sont retrouvées dans des fractions similaires chez l'Homme et le rongeur (Hammond et al., 1990).

La forme liée constitue ainsi une forme de réserve plasmatique inactive et biodisponible de l'hormone, et selon l'hypothèse de Mendel, seule la fraction libre est active (Mendel, 1989). C'est cette fraction qui régule négativement sa propre sécrétion par rétrocontrôle et qui agit sur les tissus cibles, en se liant à ces deux récepteurs nucléaires : le récepteur aux minéralocorticoïdes MR et le récepteur aux glucocorticoïdes GR (de Kloet et al., 2008).

3) Régulation des glucocorticoïdes par le rétrocontrôle négatif

Les glucocorticoïdes sont donc capables de réguler leur propre sécrétion en exerçant un rétrocontrôle négatif sur les structures composantes de l'axe HPA : structures du système limbique, hypothalamus, hypophyse, possédant des récepteurs aux glucocorticoïdes. Ce rétrocontrôle négatif a pour but de limiter la

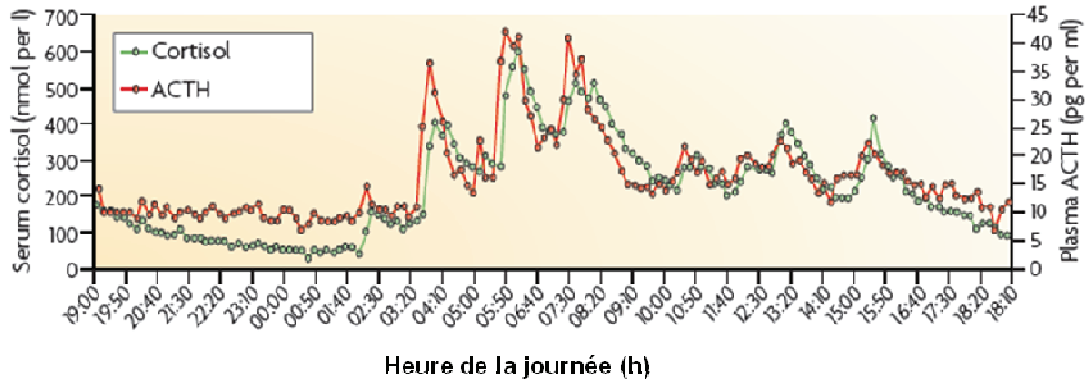
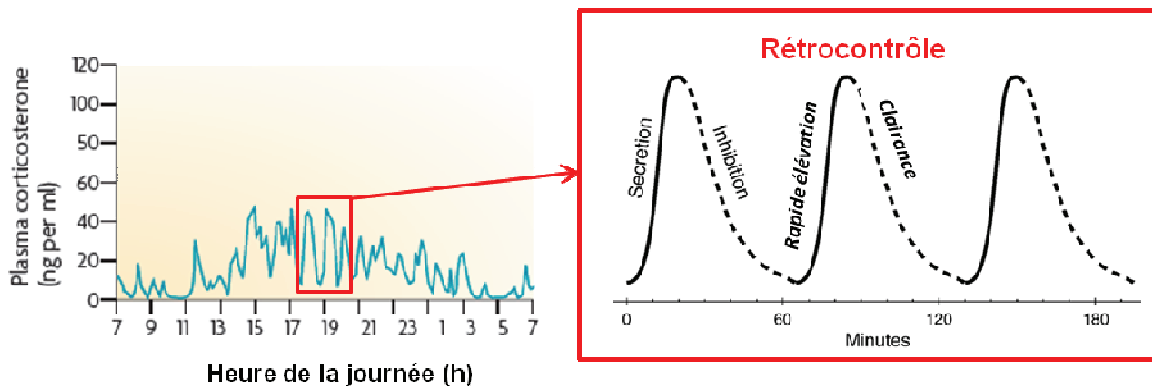
production de l'hormone dans le sang et ainsi limiter la durée d'exposition des tissus cibles aux glucocorticoïdes, délétères à long terme pour l'organisme.

Les glucocorticoïdes agissent sur le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure via leurs récepteurs, inhibant ainsi la transcription des gènes conduisant à la synthèse et la sécrétion de la CRH et de l'ACTH. Certaines structures du système limbique (hippocampe, cortex pré-frontal, amygdale) possédant des récepteurs aux glucocorticoïdes sont également fortement impliquées dans la régulation inhibitrice de l'axe HPA. Il a été montré notamment que les neurones hippocampiques activent un réseau GABAergique qui inhibent les neurones du PVN (Jacobson and Sapolsky, 1991; Herman et al., 2003; Cullinan et al., 2008).

L'inhibition de la fonction corticotrope se fait de façon dose dépendante. En effet, durant la phase active du cycle circadien l'intensité du rétrocontrôle négatif est accrue (Akana et al., 1992).

4) Rythmes biologiques

L'activité basale de l'axe HPA présente chez l'homme comme chez l'animal, une rythmicité liée à l'alternance jour-nuit appelée **cycle nyctéméral** ou encore **rythme circadien**, dont la période est de 24,2 heures (de Kloet and Sarabdjitsingh, 2008). Ce rythme est majoritairement coordonné aux signaux externes jour/nuit détectés par les noyaux supra-chiasmatiques de l'hypothalamus, mais également à d'autres stimulations de l'environnement comme la prise alimentaire (Follenius et al., 1982). Le début de la phase active (le matin chez l'Homme ; le soir chez le rongeur, animal nocturne) se produit lors du pic circadien où il est observé une augmentation en chaîne de l'amplitude des pics de sécrétion d'AVP et de CRH puis d'ACTH et enfin des glucocorticoïdes. Ce pic circadien permet une réaction anticipatrice au moment du réveil où les glucocorticoïdes ont pour rôle de mobiliser les substrats énergétiques nécessaire à cette période d'activité. Les taux d'hormones vont ensuite diminuer progressivement tout le long de la phase d'activité jusqu'à atteindre un nadir en période de sommeil, où les besoins énergétiques de l'organisme sont plus faibles (**Figure 7A**).

A. Rythme circadien:*Mesure plasmatique de cortisol et d'ACTH chez l'Homme sur 24 heures***B. Rythme ultradien***Mesure plasmatique de corticostérone chez le rat sur 24 heures***Figure 7 : Sécrétion circadienne et ultradienne des glucocorticoïdes et de l'ACTH**

tiré de (Windle et al., 1998a; Henley et al., 2009)

*A : Relation temporelle entre la sécrétion d'ACTH et du cortisol mesuré par un système automatisé de collecte d'échantillons sanguins sur 24 heures, chez l'Homme.**B : Mesure chez le rat, mâle, des pulses sécrétoires de corticostérone sur 24 heures. Un pulse de sécrétion dure environ 1 heure. Ce pulse peut être découpé en une phase de sécrétion rapide où les niveaux de corticostérone s'élèvent rapidement, suivie d'une brève phase d'inhibition d'environ 20 minutes induisant une clairance rapide des glucocorticoïdes.*

Le développement de système automatisé de collecte d'échantillons sanguins a permis de mettre en évidence que l'axe corticotrope présente également un rythme d'une période plus courte d'environ une heure, appelé **rythme ultradien**, observée dans de nombreuses espèces incluant les rongeurs (Tapp et al., 1984; Engler et al., 1989; Jasper and Engeland, 1991; Young et al., 2004; Engeland and Arnhold, 2005).

La CRH, l'AVP, l'ACTH et les glucocorticoïdes présentent une sécrétion de type pulsatile avec des épisodes sécrétoires courts d'une fréquence de un à trois pulses par heure, suivis d'une phase d'inhibition d'environ 20 minutes induisant la clairance rapide de ces hormones circulantes (Windle et al., 1998a; Windle et al., 1998b). L'origine de cette pulsatilité ultradienne n'est pas connue à ce jour mais l'équipe de Stafford Lightman propose que la pulsatilité de sécrétion des glucocorticoïdes constitue la base d'un processus d'« équilibre dynamique continu ». Plus précisément ce rythme ultradien permettrait de mettre en place rapidement les processus d'adaptation au stress c'est-à-dire une régulation fine des processus d'homéostasie et d'allostasie (Lightman and Conway-Campbell, 2010) (**Figure 7B**).

5) Réactivité corticotrope face au stress

En plus de leur activité basale, les glucocorticoïdes sont les hormones majoritaires de réponse au stress. Leur libération n'est pas une simple réponse réflexe et aspécifique, comme le supposaient les pionniers Cannon et Selye. En effet celle-ci est adaptée au stresser et à la réponse adaptative comportementale et homéostatique qui doivent être faites par l'organisme pour pouvoir y faire face.

Ainsi l'ampleur et la magnitude de la réponse des glucocorticoïdes suite à l'activation de l'axe HPA sont dépendantes du type stresser et de la valeur émotionnelle que lui donne l'individu (positive/appétitive ou négative/aversive). Une étude réalisée chez le rat s'est attachée à faire des mesures comparatives de la réactivité au stress de divers types de stressers, par la mesure de l'aire sous la courbe de la réactivité de la corticostérone totale plasmatique suite à l'exposition à un stresser durant 15 minutes (Koolhaas et al., 1997; Koolhaas et al., 2011) et les résultats sont représentés **figure 8**. Ces stressers sont de type aversifs (stimuli douloureux ou émotionnellement traumatisant comme la défaite sociale ou l'immersion forcée sous l'eau) ou au contraire appétitifs (stimuli de type récompenses comme le comportement sexuel ou remporter une interaction sociale après un combat). Les résultats ont montrés que des stress tels que le comportement sexuel et la défaite sociale induisent une réponse de stress plus forte qu'après l'exposition à un stress de contrainte ou des chocs électriques, eux même plus intenses que l'exposition à un nouvel environnement ou à un bruit fort. Ainsi, dans la plupart des

cas l'intensité de la réactivité des glucocorticoïdes au stress est le reflet direct de l'activité comportementale et donc des besoins métaboliques associés, directement ou non, pour recruter l'énergie nécessaire à cette tâche. De plus, ces résultats démontrent que la valeur du stresseur n'est pas le reflet de l'intensité de la réponse des glucocorticoïdes puisque le comportement sexuel (chargé positivement) induit l'élévation de corticostérone la plus forte, supérieure à celle mesurée lors d'une défaite sociale, fortement aversive. Le stress dans son ensemble ne doit ainsi pas être uniquement considéré comme une réactivité de l'organisme face à une situation négative.

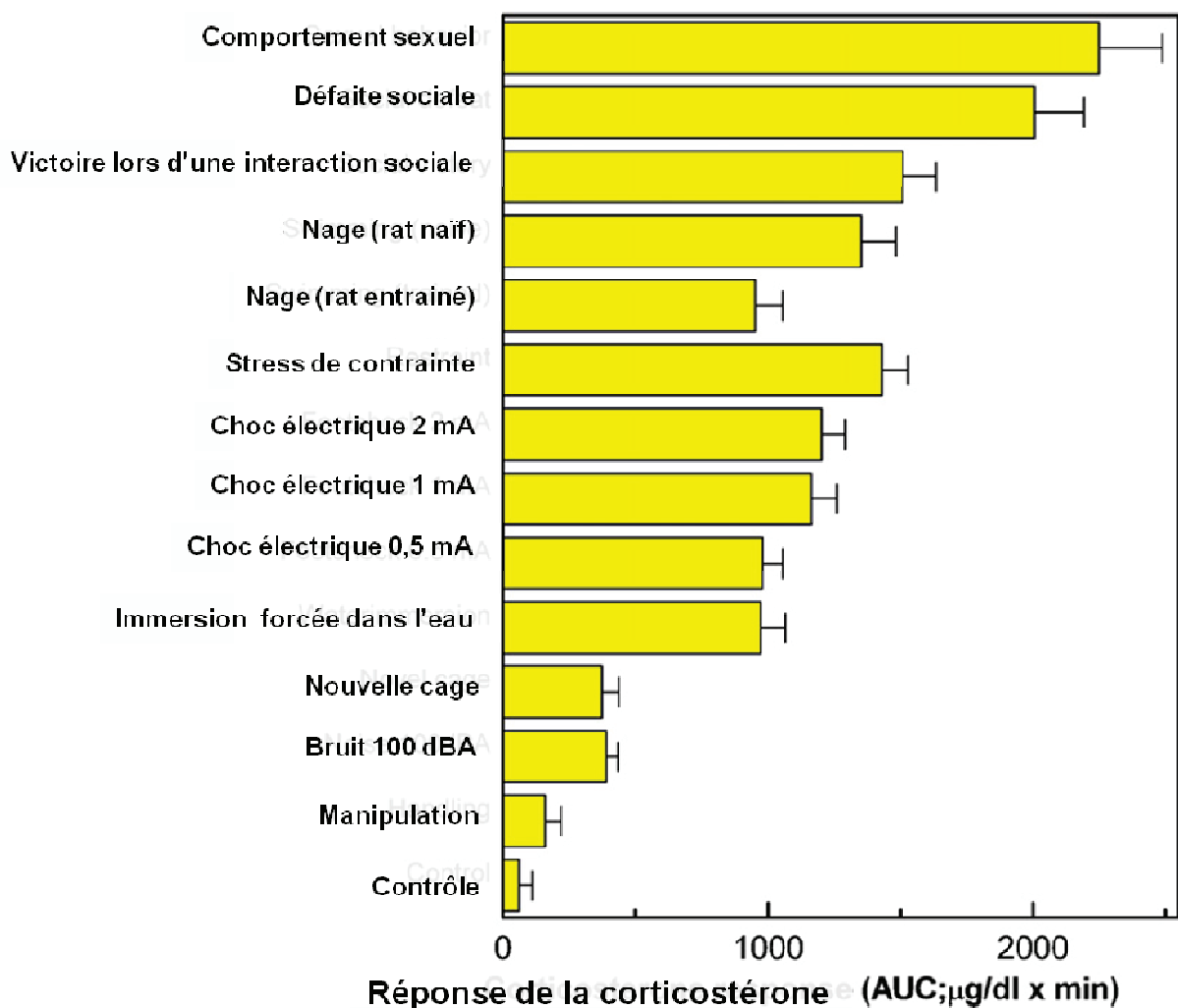


Figure 8 : Réponse de la corticostérone à différents types de stresseurs chez le rat Wistar (mâles)

tiré de (Koolhaas et al., 2011)

La mesure de corticostérone correspond à l'aire sous la courbe de la réactivité de la corticostérone totale plasmatique suite à l'exposition à un stresseur durant 15 min.

6) Réactivité corticotrope au stress dans le cerveau

Comme je l'évoquais précédemment, la forme active de glucocorticoïdes qui atteint les tissus cibles via ses récepteurs pour exercer son rôle physiologique et répondre au stress, est la forme libre de l'hormone. Depuis peu, la recherche sur la biologie des glucocorticoïdes s'est intéressée à la cinétique entre la libération des hormones dans le plasma par les corticosurrénales et leur arrivée sous forme libre aux tissus cibles ainsi que leurs concentrations dans ces tissus. En effet, la régulation des concentrations tissulaires des glucocorticoïdes, dont l'action est critique en condition saine comme en condition pathologique, est d'une importance clinique.

Chez le rat et par technique de microdialyse *in vivo*, des mesures simultanées de corticostérone totale et libre plasmatique et de corticostérone libre hippocampique (cible majeure des glucocorticoïdes) ont été réalisées. Les résultats montrent que les profils d'activité circadienne et ultradienne de la corticostérone libre plasmatique et hippocampique sont similaires, démontrant ainsi que la pulsativité basale de l'hormone est maintenue même après avoir passé la barrière hématoencéphalique.

Par ailleurs, après un stimulus de stress, les auteurs ont détecté un pic de corticostérone libre intrahippocampique seulement 20-30 minutes après l'apparition du pic de corticostérone totale dans le plasma (Droste et al., 2008). De plus, ils ont observés que l'intensité de la réponse des glucocorticoïdes au stress est dépendante du type de stresser dans le plasma (comme présenté dans la partie 5)) mais aussi dans l'hippocampe permettant ainsi aux tissus cibles tel que le cerveau d'adapter finement leur réponse de stress. En effet l'élévation de corticostérone est plus importante après un stress de type nage forcée qu'après un stress moins important de type exposition à un nouvel environnement. Dans un autre tissu cible de l'hormone tel que le tissu gras sous cutané, ce même profil de réponse retardée est également observé suggérant que ce délai n'est pas spécifique au cerveau et plus particulièrement au passage de la barrière hématoencéphalique mais bien à la concentration de corticostérone libre plasmatique.

Cette équipe a ensuite observé que le délai de la réponse de corticostérone dans l'hippocampe observé après un stress aigu est dû à une rapide libération dans le plasma, par le foie, de CBG (Qian et al., 2011). Cette libération de CBG est

observée dès la 5^{ème} minute après l'exposition au stress et atteint un pic après 15-30 minutes. Les auteurs suggèrent que cette libération, aiguë, permet dans un premier temps d'augmenter la réserve de corticostérone qui sera alors liée à la CBG, donc inactive. La fraction libre de l'hormone serait ainsi faible durant cette phase initiale. Ce n'est qu'après que la libération de CBG ait atteint un pic, que la fraction libre de corticostérone peut augmenter expliquant ainsi ce décalage.

Les auteurs proposent trois possibilités expliquant l'importance de cette libération tardive de CBG qui favorise l'augmentation retardée de la corticostérone libre :

- Cette augmentation retardée des niveaux de corticostérone libre en réponse au stress serait due à l'action retardée des glucocorticoïdes sur leur rétrocontrôle négatif.
- L'absence d'augmentation de la corticostérone libre pendant la phase précoce de la réponse au stress permettrait l'initiation des mécanismes physiologiques de défenses de l'organisme, comme le système immunitaire, avant d'être inhibés par les glucocorticoïdes.
- Lors de la phase précoce / initiale de la réponse au stress, les effets des glucocorticoïdes sont d'abord médiés par les récepteurs MR, qui ont la plus grande affinité pour ces hormones. Puis dans un deuxième temps, l'action des glucocorticoïdes passera par leurs liaisons aux récepteurs GR.

La **figure 9** est extraite de ces deux études afin d'illustrer cette partie.

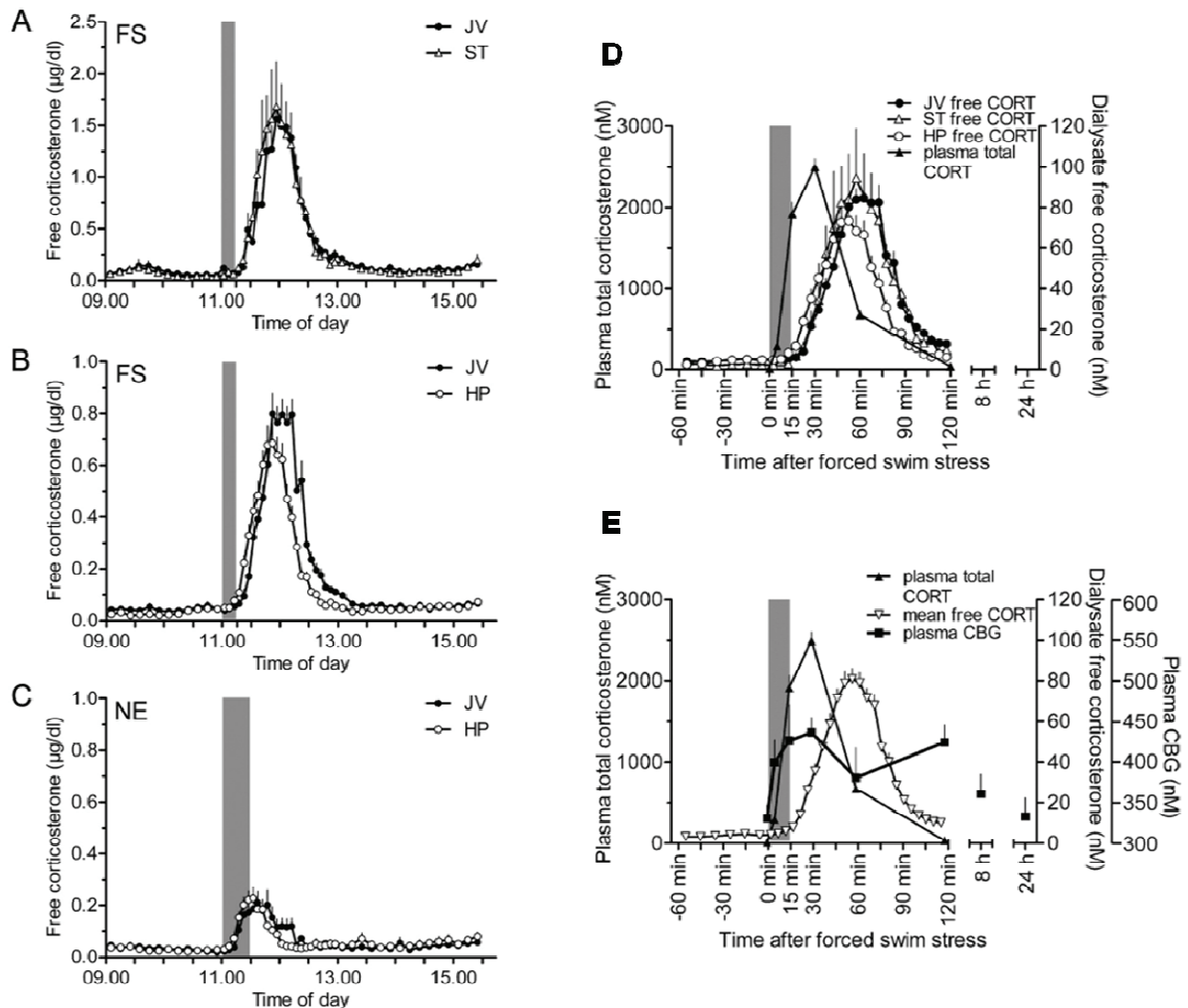


Figure 9 : Réactivité au stress des glucocorticoïdes. Comparaison entre la fraction totale et libre de l'hormone dans le plasma et dans les tissus cibles

tiré de (Qian et al., 2011)

Les Figures A, B et C présentent la concentration de corticostérone libre dans le plasma (veine jugulaire JV) et dans un tissu cible de l'hormone (tissu gras sous cutané ST ou hippocampe HP) après un stress aigu, chez le rat Wistar, mâle.

A et B : après un stress intense de type nage forcée de 15 min (barre grise), C : après un stress modéré de type nouvel environnement de 30 min.

La Figure D montre que la concentration de corticostérone totale plasmatique (plasma total CORT) augmente 5 min après le stress de type nage forcée de 15 min (barre grise) et atteint un pic à 30 min. Toutes les réponses de corticostérone libre (JV / ST / HP free CORT) sont retardées de 20-30 min et atteignent un pic après 1 h.

La figure E appose les réponses la corticostérone totale, la moyenne de la corticostérone libre mesurée dans le plasma, l'hippocampe et le tissu gras sous-cutané (mean free CORT) et la concentration de CGB plasmatique (plasma CBG) après le stress de type nage forcée de 15 min (barre grise).

B. Les glucocorticoïdes

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, les hormones glucocorticoïdes sont responsables de la plupart des effets physiologiques de l'activation de l'axe HPA en situation basale ou en réponse en stress. Cette partie est consacrée à ces hormones afin de mieux les définir.

1) Biosynthèse des glucocorticoïdes

Les hormones glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes. Leur biosynthèse a lieu dans la zone fasciculo-réticulée du cortex des glandes surrénales et est initiée par la fixation de l'ACTH sur ces récepteurs surrénaux. Cette biosynthèse se fait à partir du cholestérol, provenant soit de la synthèse hépatique soit de l'absorption intestinale, qui subit une série de réaction enzymatique (**Figure 10**). Le glucocorticoïde majoritaire dépend de l'espèce considérée. Il s'agit du **cortisol** chez l'Homme et le porc et de la **corticostérone** chez les rongeurs et les oiseaux.

Une autre classe d'hormones stéroïdiennes est synthétisée par les corticosurrénales : les minéralocorticoïdes. Ils sont 100 fois moins abondants que les glucocorticoïdes et le principal représentant est l'aldostérone.

Comme tous les stéroïdes, les glucocorticoïdes sont lipophiles. Ainsi, ils ne sont pas stockés dans la cellule mais sont immédiatement libérés dans la circulation générale après leur synthèse. Cette propriété leur confère la capacité de traverser la bicouche lipidique des cellules et ainsi de traverser la barrière hématoencéphalique. Ils entrent donc facilement dans le cerveau, sous leur forme libre.

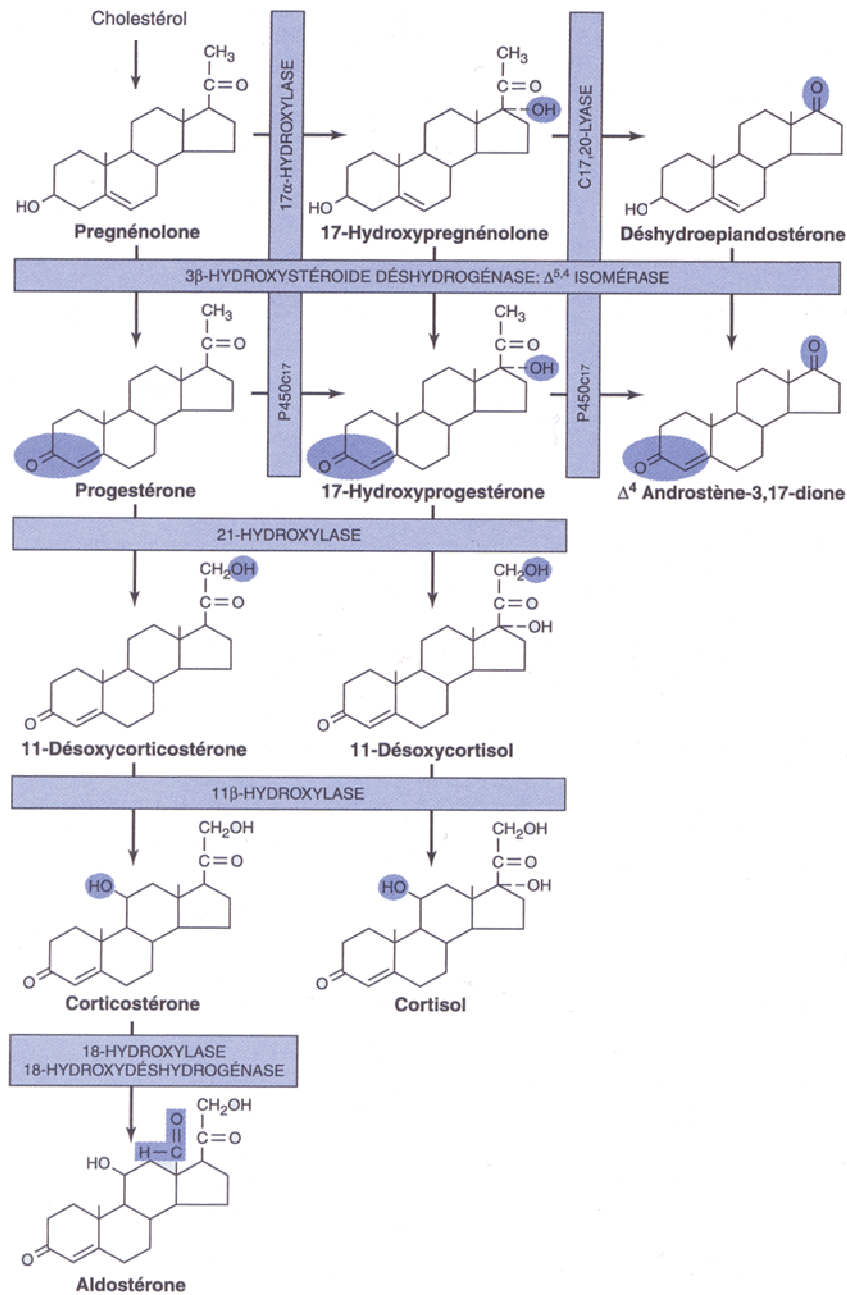


Figure 10 : Voie de biosynthèse des hormones glucocorticoïdes

tirée de « Biochimie de Harper », 25^{ème} édition, de Boeck Université

A partir du cholestérol et par une série de réactions enzymatiques en cascade (le nom des enzymes est inscrit dans l'encadré), les stéroïdes surrénaliens glucocorticoïdes (cortisol / corticostérone) et minéralocorticoïdes (aldostérone) sont synthétisés.

2) **Métabolisme des glucocorticoïdes**

La forme active de l'hormone (cortisol ou corticostérone) est en équilibre permanent avec son métabolite inactif qui a subi une déshydrogénation sur le carbone 11. Ce métabolisme met en jeu la 11 beta-hydroxystéroïde-déshydrogénase dont le type 2 (**11 β -HSD2**) oxyde le cortisol en cortisone chez l'Homme et la corticostérone en 11-déhydrocorticostérone chez le rongeur. La réaction inverse est possible par l'action de la réductase 11 beta-hydroxystéroïde-déshydrogénase de type 1 (**11 β -HSD1**).

Ces jeux enzymatiques d'interconversion bidirectionnelle permettent une modulation des concentrations tissulaires des hormones glucocorticoïdes actives et inactives. En effet, l'enzyme 11 β -HSD1 prédomine dans de nombreux tissus cibles des glucocorticoïdes tels que le foie, le tissu adipeux, les muscles, poumon, gonades, os, œil, peau, muscle lisse vasculaire et le système nerveux central. Son isoforme 11 β -HSD2 est, quant à elle, plutôt concentrée dans des tissus cibles de l'aldostérone tels que les glandes salivaires, les glandes sudoripares, les reins et le côlon. On ne la trouve pas dans des structures cérébrales telles que l'hippocampe. Le rôle de la 11 β -HSD2 est d'inactiver les glucocorticoïdes et ainsi de protéger les récepteurs aux minéralocorticoïdes MR d'une occupation prédominante des glucocorticoïdes, 100 fois plus abondants que l'aldostérone. En effet, les MR ont la même affinité pour les glucocorticoïdes et l'aldostérone. La 11 β -HSD2 est également exprimée dans le placenta et les tissus du fœtus. *In utero*, elle aura pour rôle ici de protéger les récepteurs aux glucocorticoïdes GR de l'action des glucocorticoïdes maternels (Seckl, 1997; Seckl and Walker, 2001; Walker and Stewart, 2003; Seckl, 2004; Wyrwoll et al., 2011).

La demi-vie plasmatique du cortisol, chez l'Homme, est de 60 à 90 minutes ; celle de la corticostérone, chez le rongeur, est un peu plus courte et dure environ 50 minutes. La demi-vie biologique, correspondant au temps nécessaire pour perdre la moitié de ces effets biologiques, est elle de l'ordre de 8 à 12 heures. La majorité des glucocorticoïdes est réduite et conjuguée dans les cellules cibles et le foie. Ces hormones sont ensuite excrétées et éliminées dans les urines soit sous forme dégradée en glucuronides, soit sous forme non dégradée, libre.

3) Les récepteurs aux glucocorticoïdes

Comme toutes hormones stéroïdiennes, les glucocorticoïdes agissent sur leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs intracellulaires. Deux types distincts de récepteurs aux corticostéroïdes ont été identifiés : le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR ou récepteur de type 1) et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR ou récepteur de type 2) (Reul and de Kloet, 1985; de Kloet et al., 1998).

Ces récepteurs ont une demi-vie relativement longue par rapport à celle des glucocorticoïdes (demi-vie de 90min) : 20 à 30h en l'absence de ligand, diminué de moitié en présence de celui-ci (Dong et al., 1988). Les deux types de récepteurs ne sont pas distribués uniformément dans les tissus. Leurs activations respectives dépendent de la concentration en ligand (Schmidt and Meyer, 1994), du stade du cycle cellulaire (Hu et al., 1997) et du rythme circadien (Spencer et al., 1993). Pour le développement de l'individu, ces récepteurs sont d'une grande importance. En effet, les études de modèles animaux invalidés pour l'expression des gènes codant pour les récepteurs MR comme GR ont montrés que leur déficience est létale. Les souris knock-out pour le MR ne survivent pas au-delà de 8 à 12 jours après la naissance et présentent des signes marqués de perte sodique et d'hypovolémie (Berger et al., 1998). Concernant les souris knock-out pour le GR celles-ci meurent quelques heures après leur naissance, le surfactant pulmonaire n'étant pas assez développé pour permettre leur survie dans un milieu extra-utérin (Cole et al., 1995; Ridder et al., 2005).

Les MR lient le cortisol (ou la corticostérone chez les rongeurs) et l'aldostérone avec une forte affinité (constante de dissociation : $K_d \sim 0.5$ nM). Les GR, en revanche, lient les glucocorticoïdes endogènes avec une affinité dix fois moins importante que celle des MR ($K_d \sim 5$ nM) mais à l'inverse de ceux-ci sont spécifiques des glucocorticoïdes car ils sont très peu affins pour l'aldostérone ($K_d \sim 20$ nM). Les GR présentent par contre une forte affinité pour les glucocorticoïdes de synthèse, comme la dexaméthasone ($K_d \sim 0.5$ nM). Du fait de leurs affinités différentes pour le MR et le GR, les glucocorticoïdes sont préférentiellement liés aux MR. Ces récepteurs sont quasiment saturés pour de faibles niveaux de l'hormone, c'est-à-dire dans des conditions basales du rythme circadien et de ce fait, les GR sont peu saturés dans ces conditions. En revanche, les GR sont progressivement

occupés en cas d'hypersécrétion de glucocorticoïdes, notamment lors du pic circadien, d'un pulse ultradien ou après une exposition à un stress où l'occupation des MR atteint une saturation (Reul et al., 1987b, a). C'est pourquoi il a été proposé que les GR seraient plutôt impliqués dans la variation de l'activité de l'axe corticotrope observée au cours de la réponse au stress, alors que les MR seraient impliqués dans l'activité basale de l'axe corticotrope permettant ainsi une action différentielle de l'hormone selon les taux circulants (De Kloet *et al.* 2005).

a) Structure des récepteurs nucléaires MR et GR

Ces deux récepteurs sont phylogénétiquement et structurellement proches. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et à la famille des récepteurs aux stéroïdes (Beato and Klug, 2000). Comme tous récepteurs nucléaires, MR et GR sont des protéines monomériques et sont caractérisés par six domaines structurels et fonctionnels (**Figure 11**).

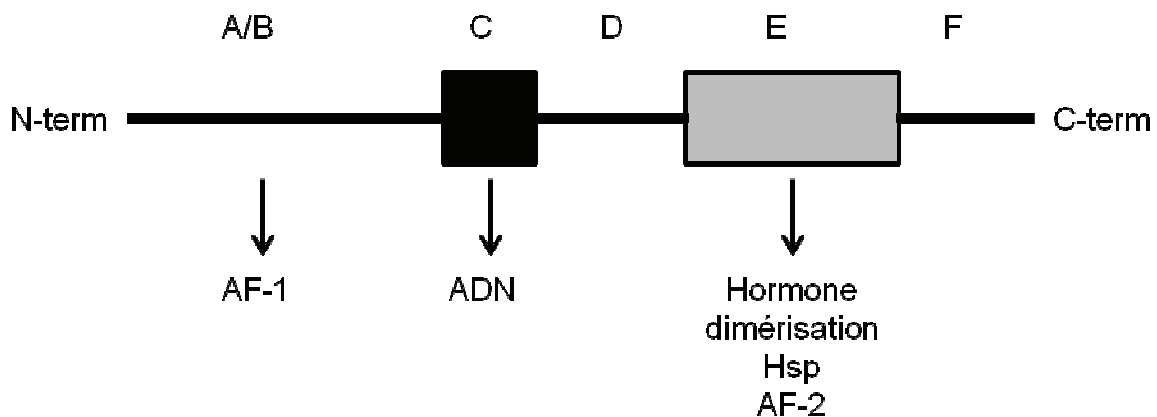


Figure 11 : Structure primaire et relations structure-fonction des récepteurs nucléaires

tiré de (Beato and Klug, 2000)

Les récepteurs nucléaires sont organisés en six domaines déterminés sur la base d'homologies de séquence et de leurs fonctions respectives

- Le domaine A/B en partie N-terminale de la protéine a un rôle dans l'initiation et la régulation de la transcription des gènes cibles (sur la figure 11, AF-1 pour *activation function 1*).
- Le domaine C, configuré en doigts de zinc, est la région de fixation à l'ADN appelé DBD pour *DNA-binding domain*. Ce domaine est considéré comme la signature de la super famille des récepteurs nucléaires.
- Le domaine D correspond à une région charnière reliant les domaines C et E et peut être impliqué dans la fixation à l'ADN et dans l'adressage du récepteur dans le noyau.
- Le domaine E est la région de liaison du ligand nommé LBD pour *ligand-binding domain*. Ce domaine contient également une fonction activatrice de la transcription (AF-2 pour *activation function 2*), une interface de dimérisation et une région d'interaction pour les protéines de choc thermique Hsp (*Heat shock protein*).
- Le domaine F, enfin, en C-terminal peut également être une région de fixation du ligand.

Les domaines impliqués dans la liaison à l'ADN ou au ligand (C et E) présentent un fort degré de conservation structurelle au sein de la superfamille des récepteurs nucléaire, tandis que les domaines A/B, D et F peuvent présenter beaucoup de variations structurelles.

b) Mécanismes moléculaires d'action de l'action des glucocorticoïdes

A l'état libre, les récepteurs sont présents dans le cytoplasme sous forme de complexe multiprotéique composé du récepteur lui-même, de deux molécules de protéine de choc thermique (*heat shock protein*) hsp90, d'une molécule hsp70 et d'une molécule hsp50. Les glucocorticoïdes libres, protéines liposolubles, diffusent librement à travers la membrane cytoplasmique pour venir au contact de leurs récepteurs présents à l'état inactif dans le cytosol. La liaison de l'hormone à son récepteur induit un changement conformationnel et une hyperphosphorylation du récepteur qui provoque la dissociation du complexe récepteur-protéines chaperonnes. Ceci entraîne le passage actif dans le noyau avec l'aide de protéines de translocation nucléaire recrutées par la libération de signaux spécifiques lors du

changement conformationnel. Les récepteurs peuvent alors agir selon plusieurs voies. Les récepteurs, après dimérisation, peuvent se lier à l'ADN sur une séquence spécifique : les GRE (*glucocorticoids responsive elements*). Ces GRE sont situés à proximité de la région promotrice des gènes cibles qu'ils vont stimuler ou inhiber. Deux types de GRE existent : les GRE positifs activent la transcription des gènes cibles tandis que les GRE négatifs (nGRE) répriment la transcription. En cas de stimulation, la transcription du gène aboutit à la production d'ARNm, qui permet la synthèse de protéines, résultat final de l'activité physiologique des glucocorticoïdes (Zhou and Cidlowski, 2005; Lu and Cidlowski, 2006) (**Figure 12**).

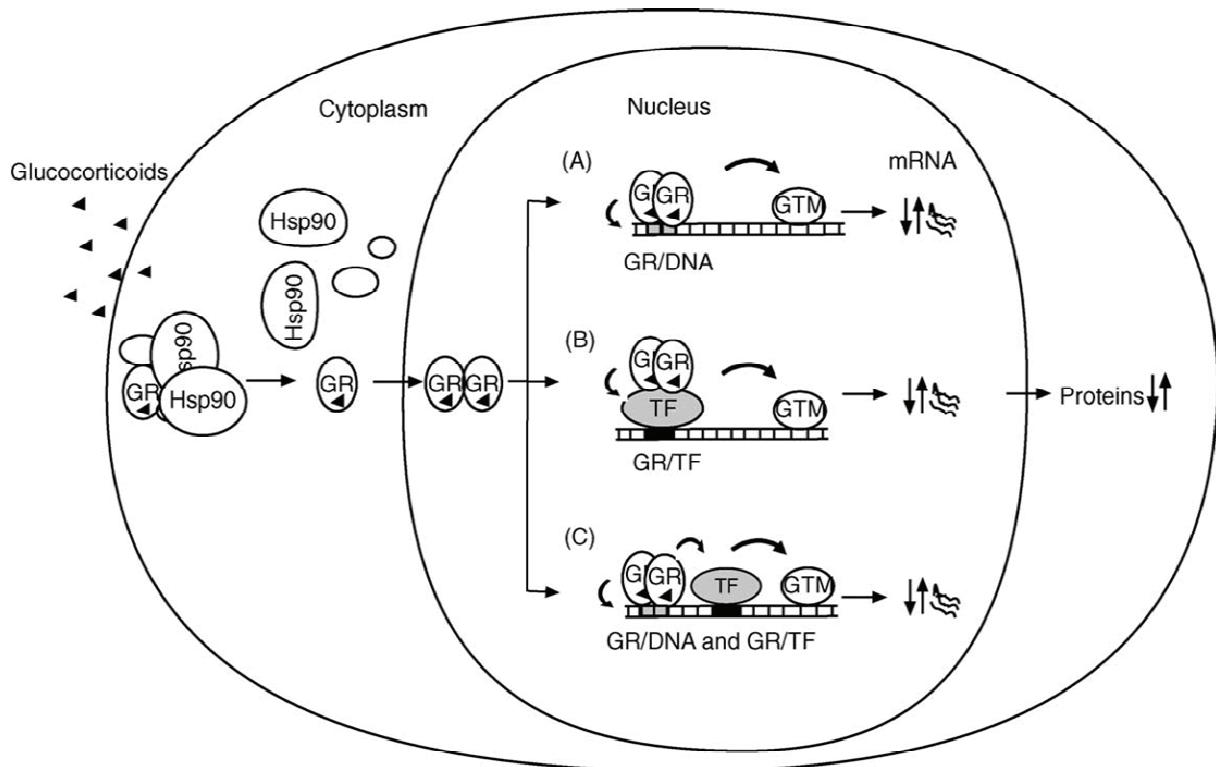


Figure 12 : Mécanisme d'action des récepteurs aux glucocorticoïdes : exemple du GR

tiré de (Zhou and Cidlowski, 2005)

Les glucocorticoïdes entrent dans le cytoplasme de la cellule et se fixent sur les récepteurs GR présents. Le GR ainsi activé se dissocie des protéines Hsp, peut se dimériser avec un autre GR ou avec un MR et est transloqué vers le noyau. Il peut se fixer directement sur l'ADN au niveau d'une séquence GRE ou nGRE et interagir avec un autre facteur de transcription (noté TF sur la figure) pour se lier à l'ADN. La fixation du GR à l'ADN active ou réprime alors la transcription du gène.

GTM (*general transcription machinery*) : machinerie de transcription.

c) Récepteurs membranaires

Il a récemment été découvert un autre type de récepteurs aux hormones glucocorticoïdes localisés sur la membrane plasmique. Ce sont des récepteurs de type MR (Joels et al., 2008) qui contrairement aux récepteurs MR nucléaires présentent une faible affinité pour les glucocorticoïdes comparable à celle des GR nucléaires (Karst et al., 2005). Ainsi ils sont activés lorsque les niveaux de l'hormone augmentent comme pour les GR au pic circadien ou encore en réponse au stress. Ils sont responsables des effets rapides non-génomiques des glucocorticoïdes. Les premières études ont montré qu'ils augmentent la neurotransmission glutamatergique et régulent le trafic de surface des récepteurs de type AMPA, augmentant ainsi la transmission de la plasticité synaptique dans l'hippocampe (Groc et al., 2008; Chaouloff and Groc, 2010). Enfin, une récente étude a mis en évidence leur implication au niveau hippocampique dans les effets délétères des glucocorticoïdes en réponse au stress sur la mémoire de travail (Dorey et al., 2011).

4) Action des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont impliqués dans un grand nombre de fonctions vitales et ce paragraphe se focalise sur leurs influences majeures.

a) Actions sur la croissance et le développement

Les glucocorticoïdes ont un impact sur la différenciation et la maturation de certains tissus. Chez le fœtus, les glucocorticoïdes sont nécessaires à la maturation du système nerveux central, de la rétine, du tractus digestif et des poumons. Chez le rongeur il a été montré qu'une administration de glucocorticoïdes chez la mère gestante conduit à une diminution du poids des petits à la naissance, à une altération de la maturation des organes et des problèmes persistants comme de l'hypertension, hyperglycémie, hyperinsulinémie, et des problèmes comportementaux et neuroendocriniens (O'Regan et al., 2001). Chez l'Homme, les patients atteints du syndrome de Cushing, hypercortisolémiques, présentent des problèmes d'infertilité qui peuvent être corrigés par un traitement à la métyrapone (un inhibiteur de la synthèse des glucocorticoïdes) (Trainer, 2002).

Par ailleurs, un grand nombre d'études rapporte une interaction, bidirectionnelle, entre l'hormone de croissance (*growth hormone* : GH) et l'axe corticotrope. Cependant, la relation entre le cortisol et la GH est complexe. Une hypercortisolémie chronique, d'origine endogène ou exogène, entraîne une réduction de la sécrétion de GH et de la croissance ainsi qu'une diminution de la réponse de la GH face aux stimuli extérieurs (Tsigos and Chrousos, 2002). De même, les patients souffrant d'une déficience en ACTH ont une sécrétion de GH anormale qui est rétablie après un traitement aux glucocorticoïdes. D'autre part, les patients déficients en GH ont des concentrations basales et post stress de cortisol plus faibles qui sont rétablies par un traitement à la GH (Charmandari et al., 2001).

b) Actions sur le métabolisme

Les glucocorticoïdes ont de nombreux effets sur le métabolisme des protéines, des lipides et des sucres. Leur action majeure est la constitution de réserves de glucose en vue de la protection des tissus glucose-dépendants tels que le cœur et le cerveau.

Comme leur nom l'indique, les glucocorticoïdes ont un rôle important dans le métabolisme glucidique. Leur effet principal est d'augmenter la production de glucose en favorisant la néoglucogenèse hépatique. Le glucose ainsi produit est stocké sous forme de glycogène hépatique. Les glucocorticoïdes utilisent les intermédiaires de la glycolyse musculaire (le lactate), de la protéolyse (l'alanine) et de la lipolyse (le glycérol) pour cette néoglucogenèse. A cette fin, ils induisent également la transcription hépatique de nombreuses enzymes impliquées dans le mécanisme de la néoglucogenèse et dans le métabolisme des acides aminés (Yabaluri and Bashyam, 2010). Au niveau des tissus périphériques, notamment dans le tissu adipeux, le tissu musculaire squelettique, la peau, les fibroblastes, les thymocytes et les leucocytes polynucléaires, les glucocorticoïdes inhibent la capture et l'utilisation du glucose, augmentant ainsi la résistance à l'insuline. Ainsi les glucocorticoïdes favorisent la synthèse de glycogène hépatique et la production hépatique de glucose tout en diminuant la captation et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques. Cette action hyperglycémiant des glucocorticoïdes a pour effet global d'accroître les ressources énergétiques. L'activation de l'axe corticotrope et

donc l'augmentation des taux plasmatiques de glucocorticoïdes a lieu dans des situations où la teneur en glucose est insuffisante. Cette insuffisance peut être due soit à la hausse de l'utilisation de glucose par l'organisme (en cas d'hypoglycémie, de diabète, d'exposition au froid, d'exercice physique intense ou de stress), soit à la diminution des apports alimentaires (situation de privation de nourriture).

Au niveau du métabolisme protéique, les glucocorticoïdes ont une action catabolique prédominante sur les protéines du muscle squelettique et du tissu conjonctif, ainsi que sur les os, provoquant à long terme des atrophies musculaires et cutanées et une ostéoporose. Les glucocorticoïdes ont deux effets majeurs sur le métabolisme osseux. Le premier est d'induire l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes diminuant alors la formation osseuse. Le deuxième est de prolonger la durée de vie des ostéoclastes augmentant la résorption osseuse. Une exposition aux glucocorticoïdes peut alors altérer l'équilibre entre l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes et ainsi perturber le métabolisme osseux et favoriser l'ostéoporose. En effet, il a été montré qu'un traitement aux glucocorticoïdes supérieur à 3 mois augmente significativement le risque de fracture chez les personnes âgées de plus de 65 ans et pouvait expliquer 20% des ostéoporoses (Mitra, 2011).

Au niveau du métabolisme lipidique, les glucocorticoïdes ont une action différente en fonction du taux plasmatique d'insuline dans les tissus adipeux. Lorsque l'insulinémie est basse, les glucocorticoïdes augmentent la concentration plasmatique des acides gras libres et du glycérol en stimulant la lipolyse. Cette augmentation de la lipolyse potentialise également l'action lipolytique d'autres hormones comme l'adrénaline. A l'inverse, en présence d'insuline (conditions postprandiales et en cas d'obésité), les glucocorticoïdes ont une action lipogénique induite par une diminution de l'activité de l'enzyme HSL (lipase hormono-sensible) qui régule l'hydrolyse des triglycérides (Samra et al., 1998). Les glucocorticoïdes, en synergie avec l'insuline, augmentent également la différenciation des adipocytes.

- *Cas du stress chronique et ses conséquences sur le poids*

Les glucocorticoïdes intervenant fortement dans les fonctions métaboliques et également sur la régulation du comportement alimentaire, un dysfonctionnement de

l'axe corticotrope peut donc engendrer un éventuel dérèglement de ces fonctions et ainsi favoriser le développement d'une forte prise de poids voire de l'obésité. De nombreuses études menées chez l'Homme et l'animal font état d'une association entre obésité et hyperactivité de l'axe corticotrope (Rosmond et al., 1998b; Duclos et al., 1999; Dallman et al., 2006; Kyrou and Tsigos, 2009). L'obésité est notamment un des symptômes du syndrome de Cushing, caractérisé par un hypercortisolisme (Carroll and Findling, 2010). L'administration chronique de glucocorticoïdes exogènes conduit également au développement de l'obésité (Covar et al., 2000). De même il a été montré qu'une période de stress chronique peut mener à une rapide prise de poids. Il a par exemple été observé que des parents d'enfants atteints d'un cancer récemment diagnostiqué présentaient une prise de poids rapide associée à leur situation de stress chronique alors que leur apport calorique est inférieur à celui de parents d'enfants sains (Smith et al., 2005). Des études importantes menées chez le rat ont montré que le stress chronique entraîne une élévation des niveaux de corticostérone et favorise ainsi, en synergie avec l'insuline, l'ingestion d'aliments à caractère hédonique c'est-à-dire riches en sucre et en lipide. Des taux élevés de glucocorticoïdes et d'insuline favorisent le stockage de calories dans des dépôts intra-abdominaux. Ces dépôts vont ensuite envoyer un signal au cerveau qui va en conséquence réduire l'activité de la réponse de stress et notamment la sécrétion de CRH, cette diminution ayant un effet anxiolytique. Il s'agit de la théorie de **comfort food** développée par l'équipe de Mary Dallman. C'est ainsi que des rats en situation de stress chronique préfèrent une alimentation riche en gras et en sucre à une diète équilibrée entraînant une diminution des effets du stress chronique notamment sur le comportement émotionnel (Dallman et al., 2003; Dallman et al., 2004; Dallman et al., 2005).

Cependant, le stress chronique et ses effets sur la prise de poids ne sont pas si simples et présentent même des effets bidirectionnels. Par exemple, les effets du stress au travail peuvent conduire selon l'indice de masse corporelle de l'individu à une prise de poids ou au contraire à une perte de poids (Kivimaki et al., 2006). De plus, il a été démontré que la réactivité cortisolique au stress pouvait être un marqueur de vulnérabilité à prendre du poids en situation de stress. Une étude a montré qu'une femme à forte réactivité au stress, c'est-à-dire présentant une hyper-

sécrétion de cortisol après stress va plus manger qu'une femme à faible réactivité au stress (Epel et al., 2001; Adam and Epel, 2007).

c) Actions sur le système immunitaire et inflammatoire

L'axe corticotrope peut être activé par un agent infectieux, des processus inflammatoires auto-immuns ou après un traumatisme physique. De part leur action inhibitrice sur la migration des leucocytes vers les sites d'infection et la diminution de leur activité phagocytaire, les glucocorticoïdes ont alors une action anti-inflammatoire et immunosuppressive. Les glucocorticoïdes affectent également les réponses immunitaires. Ils diminuent le nombre de lymphocytes T circulants, en particulier les T4, par l'intermédiaire de facteurs déterminants dans la genèse de ces réponses qu'ils inhibent, les cytokines (interleukine-1 (Il-1), Il-6, interféron gamma ou encore le facteur de nécrose tumorale TNF- α) (Huang and Cidlowski, 2002; Rhen and Cidlowski, 2005). Ainsi, au travers de ces diverses inhibitions, l'axe corticotrope « protège » l'organisme d'une réaction inflammatoire démesurée qui pourrait menacer l'homéostasie. Un dysfonctionnement de l'axe corticotrope pourrait induire une réponse inadaptée, voire prédisposer certains individus aux maladies auto-immunes ou encore au développement de troubles dépressifs. En effet, dans le cas d'un processus inflammatoire non refreiné en raison d'une hypocortisolémie, la libération des cytokines pro-inflammatoires est alors continue et conduit à une concentration circulante en périphérie comme dans le cerveau beaucoup trop élevée. Dans la durée, cette concentration accrue de cytokine est toxique pour l'organisme et favorise alors le développement de symptômes dépressifs (Anisman et al., 2008; Dantzer et al., 2008)

d) Actions sur le système nerveux central

L'action des glucocorticoïdes sur le système nerveux central est multiple. Elle peut être directe ou indirecte, via leur effet sur le taux plasmatique de glucose et la maintenance de la pression artérielle. De manière générale, il a été montré que les glucocorticoïdes sont impliqués dans divers aspects du comportement tels que le sommeil (diminution du sommeil paradoxal et augmentation du sommeil lent) (Born

et al., 1989), la mémoire et les apprentissages (Schwabe et al., 2010b; Schwabe and Wolf, 2010), l'humeur (Lupien and McEwen, 1997) ou encore l'appétit (stimulation de la prise alimentaire par l'intermédiaire du neuropeptide Y, NPY) (Sapolsky et al., 2000). Par ailleurs, dans le cas de dérégulation de la libération de glucocorticoïdes en réponse au stress, leurs effets peuvent être délétères et participer à la mise en place d'un certain nombre de troubles et de pathologies. Une hyperactivité de l'axe HPA augmente la vulnérabilité à développer de nombreux troubles tels que l'insomnie (Buckley and Schatzberg, 2005), des perturbations de l'humeur (anxiété exacerbée, dépression) (de Kloet et al., 1998; Pariante and Lightman, 2008), l'euphorie, l'augmentation de l'activité locomotrice, des troubles de la mémoire, l'obésité (Kyrou and Tsigos, 2009), les psychoses et la paranoïa (Brunner, 1997) ou encore l'addiction (Koob and Le Moal, 2001). Une hypoactivité est également observée dans des troubles de la dépression, dans le syndrome de stress post-traumatique, la fibromyalgie, le *burn out*, ou encore le syndrome de fatigue chronique (McEwen, 2007; Chrousos and Kino, 2009).

- *Cas de la mémoire*

L'apprentissage et les différentes phases de la mémoire (encodage, consolidation et rappel / rétention) sont largement influencés par les glucocorticoïdes qui peuvent constituer un « filtre sélectif » des informations pertinentes à mémoriser au vu de l'expérience. L'étude de la mémoire spatiale, forme de mémoire à court terme dépendante de l'hippocampe et influencée par le stress et les glucocorticoïdes, a suscité de nombreuses investigations menées chez les rongeurs grâce à l'utilisation de tâche d'apprentissage classiquement utilisées pour évaluer la mémoire spatiale : la **piscine de Morris** ou le **labyrinthe en Y** ou **en T**. Les premières études ont permis de montrer qu'un stress comme l'exposition à un environnement nouveau, à un prédateur ou à des chocs électriques diminue les performances mnésiques. Cependant l'intensité du stress ou la période d'exposition au stress pendant l'apprentissage peut impacter différemment sur les performances mnésiques. En effet, le niveau de performances mnésiques suit une courbe en U inversée selon le niveau d'occupation des GR dans l'hippocampe, structure fortement impliquée dans les processus mnésiques (Oitzl et al., 1994; Conrad et al.,

1999; Salehi et al., 2010). Il apparaît qu'un niveau d'occupation modéré des GR permet un apprentissage optimal, tandis qu'une suractivation de ces récepteurs devient délétère pour l'apprentissage. C'est ainsi qu'une injection systémique d'une dose modérée de corticostérone facilite chez le rongeur l'apprentissage et la rétention en piscine de Morris (Diamond et al., 1996; Sandi et al., 2005). Au contraire, l'injection d'une forte dose diminue ces mêmes performances. Par ailleurs, après un apprentissage, il a été observé que l'exposition de rats à des chocs électriques ou l'injection systémique de glucocorticoïdes mimant un stress, perturbe la mémoire de rétention mesurée en piscine de Morris (Yau et al., 1995; de Quervain et al., 1998). De façon similaire, une administration de cortisone chez l'Homme, conduisant à des niveaux élevés de cortisol mesurés dans la salive 1 heure après, perturbe le rappel de mots appris 24 heures auparavant (de Quervain et al., 2000). Plus récemment, il a été montré que les effets délétères du stress, et de l'élévation de glucocorticoïdes, sur la mémoire de rétention sont médiés par des récepteurs MR membranaires dorso-hippocampiques (Chauveau et al., 2010; Tronche et al., 2010; Dorey et al., 2011).

- *Cas de la dépression*

La dépression et notamment la dépression majeure, pathologie complexe et multifactorielle, semble résulter d'une incapacité du système nerveux central à adapter la réponse de stress entraînant, entre autres systèmes, une dérégulation de l'activité et de la réactivité de l'axe corticotrope.

En effet, cette pathologie a été très souvent associée à une augmentation des taux basal et après stress des glucocorticoïdes notamment, c'est-à-dire à une hyperactivité de l'axe corticotrope et à une hyper-réponse des glucocorticoïdes au stress (Pariante and Lightman, 2008). On parle ici de dépression majeure à symptômes mélancoliques. Les mécanismes sous tendant cette dérégulation dans le sens d'une hyper-réponse peuvent être expliqués à différents niveaux du fonctionnement de l'axe HPA. En effet, des évènements de vie traumatisant (Bale et al., 2010) ou encore les effets d'une inflammation chronique (Raison et al., 2006; Dantzer et al., 2008) peuvent favoriser une modification de l'activité de l'axe (par des phénomènes génétiques ou épigénétiques) conduisant à l'altération du rétrocontrôle

de l'axe par les glucocorticoïdes, à une augmentation de la sécrétion de CRH et/ou d'ACTH, ou encore à une modification du fonctionnement des récepteurs GR ou des récepteurs au CRF. De nombreuses études menées sur des modèles animaux de variation d'expression des principaux acteurs de l'axe corticotrope ont été menées. Par exemple, il a été montré qu'une surexpression du CRH est associée au comportement de type dépressif (Lu et al., 2008). De même, la variation d'expression des récepteurs GR a permis d'observer qu'une diminution de l'expression de 50% du GR (souris GR+/-) entraîne une augmentation du comportement de type dépressif alors qu'une surexpression de ce gène (souris YGR) au contraire diminue ce phénotype (Ridder et al., 2005).

Récemment, un ensemble de données a fait apparaître un deuxième versant de la dérégulation de l'axe HPA en réponse au stress : l'hypoactivité de l'axe (évoqué dans la partie I. C. 4)). Ainsi une faible élévation du niveau de glucocorticoïdes (libres) en situation basale et après stress favorise également le développement de troubles dépressifs tels que la dépression majeure à symptômes atypiques ou encore le syndrome de stress post-traumatique (PTSD) (Heim et al., 2000; Gold and Chrousos, 2002; Bremner et al., 2007). Plusieurs mécanismes peuvent conduire à une efficacité diminuée des glucocorticoïdes : une production ou une biodisponibilité réduite appelés hypocortisolisme, une sensibilité augmentée du rétrocontrôle négatif ou encore une diminution de la réponse des tissus cibles due par exemple à une désensibilisation des récepteurs MR ou GR. Cette dernière possibilité implique que même en cas d'hypersécrétion de l'hormone, une déficience du signal glucocorticoïde peut apparaître si l'effet de cette hyposensibilité tissulaire n'est pas compensé par l'excès de glucocorticoïdes circulants. Aujourd'hui, très peu de modèles animaux existent. Nous pouvons évoquer toutefois le modèle souris de Touma issus de sélection génétique : les souris LR, présentées partie I. D.

Il est important de noter que les femmes présentent une prévalence plus importante que les hommes à développer des symptômes dépressifs. Cet aspect est développé dans la partie I.D.1).

C. Modèles d'étude des émotions chez les rongeurs

Nous venons d'évoquer l'utilisation de modèles animaux, notamment des rongeurs, dans l'étude des émotions ou encore de la mémoire. En effet, compte tenu du continuum phylogénétique des réponses comportementales et physiologiques à l'exposition à un stimulus chargé émotionnellement, les animaux peuvent modéliser les émotions humaines (Dantzer, 2002). L'absence de verbalisation chez le rongeur conduit à étudier le comportement et les modalités d'expression des animaux. Certains travaux de psychologie expérimentale consistent à exposer les animaux à des situations artificielles bien définies et censées induire des états émotionnels différents selon la nature des agents stressants et provoquent des états de peur et/ d'anxiété.

Différents tests comportementaux (**Figure 13**) sont utilisés pour évaluer la réactivité émotionnelle de ces modèles, et les épreuves reposent souvent sur l'attirance spontanée des rongeurs pour les espaces clos et obscurs, moins anxiogènes. Notamment, le test de l'**open field** (ou **champ ouvert**) consiste à exposer les animaux à un espace ouvert et fortement éclairé, c'est-à-dire aversif, d'autant que ce sont des animaux nocturnes. Les animaux dits « émotifs », sont peu actifs et passent l'essentiel de leur temps immobiles, le long des parois périphériques. Ils sont dits présenter un « trait de type anxieux », réversibles par les anxiolytiques. Les animaux qui, au contraire, sont « non émotifs » ont le comportement inverse. Ce test est ainsi principalement utilisé pour mesurer l'activité exploratoire des rongeurs ainsi qu'un potentiel trait phénotypique de type anxieux (van Gaalen and Steckler, 2000). Le test de l'**elevated plus maze** (ou labyrinthe en croix surélevé) repose sur le même principe. Le rongeur est placé au centre d'une plateforme surélevée constituée de deux bras obscurcis par de hautes parois opaques dits bras fermés et de deux bras perpendiculaires dits ouverts, sans parois et donnant sur le vide, fortement éclairés et donc anxiogènes. L'évitement des bras ouverts constitue un index de la réactivité émotionnelle des animaux notamment un index de mesure du phénotype « de type anxieux ». La plupart des anxiolytiques commercialisés sont évalués au préalable avec ce test, ce qui justifie l'intérêt de ce modèle comportemental (Pellow and File, 1986). D'autres tests comme le test du **light/dark box** (ou chambre claire/obscur) et encore de l'**interaction sociale**

reposent sur le même principe d'approche et d'évitement et donnent également un index des niveaux d'anxiété de l'animal, un animal dit peu « anxieux » explorant les compartiments éclairés et interagissant avec ses congénères.

D'autres tests comportementaux ont été développés afin d'étudier des modèles de troubles émotionnels et plus particulièrement le « trait de type dépressif » induits par un stress chronique (de type modéré et imprévisible ou intense par exemple induit par le défaite sociale) ou par un modèle génétique (knock out, knock in, transgénique etc.) et reversés par l'utilisation d'antidépresseurs commercialisés. Par exemple, le **forced swim test** (test de la nage forcée ou test de Porsolt) (Porsolt et al., 1977) ou le **tail suspension test** (test de suspension par la queue) (Steru et al., 1985) reposant sur un comportement non conditionné, sont largement utilisés pour évaluer l' « état de type dépressif ». Celui-ci se traduit par le renoncement de l'animal à se sortir d'une situation de laquelle il ne peut pas s'échapper, c'est à dire de nager dans un bac d'eau ou encore de se redresser lorsqu'il est suspendu dans le vide par la queue. L'analyse comportementale de réponses apprises, dites conditionnées, permet également d'évaluer le niveau de résignation de l'animal (Paul et al., 2005). Par exemple, le test du **learned helplessness** (ou test de résignation apprise) consiste à soumettre un animal à une série de chocs électriques inéchappables et imprévisibles pendant quelques jours. Puis le jour du test, l'animal doit apprendre qu'il peut s'échapper s'il veut éviter le choc électrique qui cette fois est annoncé par un stimulus sonore. Sa capacité à apprendre la réponse d'évitement est un index du niveau de résignation de l'animal (Seligman and Maier, 1967; Mineka and Kihlstrom, 1978).

Les données obtenues à partir de ces tests doivent être interprétés avec prudence et éviter au maximum l'anthropomorphisme. Elles sont souvent contradictoires entre laboratoires, les effets observés variant en fonction des conditions expérimentales (luminosité, caractéristiques de dimension et de géométrie des plateformes utilisées, odeurs, conditions d'élevage des animaux...), des traitements administrés, de la souche étudiée, du sexe et de l'âge des animaux (Kudielka et al., 2009). De plus, la réponse émotionnelle implique le recrutement de réseaux neuronaux spécifiques de la nature du stimulus aversif qui induit cette réponse. Ainsi, l'utilisation de plusieurs modèles comportementaux semble nécessaire afin d'évaluer avec plus de certitude l'état émotionnel de l'animal.

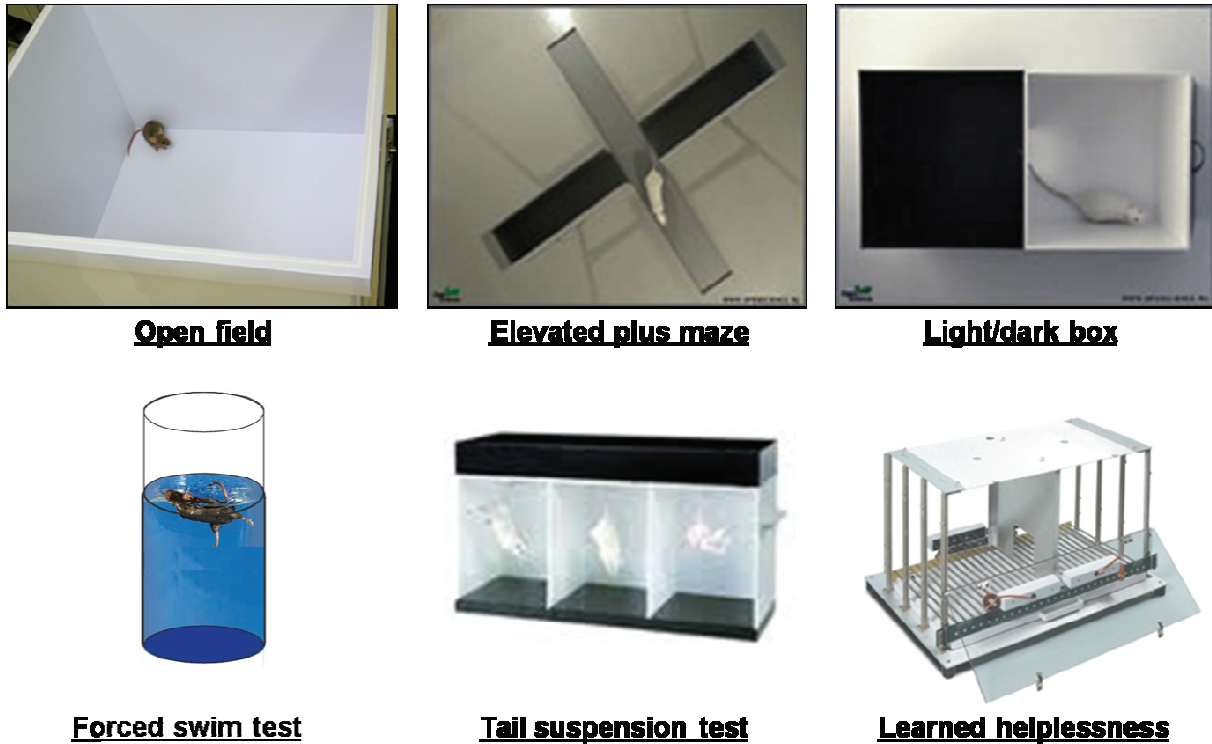


Figure 13 : Dispositifs des appareils expérimentaux classiquement utilisés pour évaluer les comportements émotionnels chez le rongeur

D. Facteurs de variabilité de l'axe HPA

Des dysrégulations des réponses au stress prolongées dans le temps et conduisant à une libération de glucocorticoïdes excessives ou au contraire insuffisante, favorisent un grand nombre de troubles et de pathologies comme la dépression, les désordres métaboliques entraînant l'obésité, ou encore des troubles de la mémoire (Dallman et al., 2006; McEwen, 2007). Le sexe, le statut social, l'âge, l'environnement et encore la génétique sont tout autant de facteurs conduisant à une variabilité individuelle dans la vulnérabilité de la réactivité au stress de l'axe HPA (Datson et al., 2008; Odermatt and Gumy, 2008; Kudielka et al., 2009; Lupien et al., 2009). Nous détaillerons dans cette partie les effets du facteur sexe / genre ainsi que certains facteurs génétiques sur la variabilité de l'activité de l'axe corticotrope.

1) Le sexe et le genre

Selon le sexe et le genre de l'individu (appelé sexe sociale), la prévalence des pathologies liées au stress n'est pas la même. En effet, les hommes sont plus sensibles à développer des pathologies comme les maladies cardio-vasculaires, les infections ou les addictions face aux drogues d'abus. Les femmes sont plutôt sujettes aux maladies auto-immunes, à développer des anxiétés, des phobies ou encore de dépression (Kajantie and Phillips, 2006; Kudielka et al., 2009).

Ces différences liées au sexe et au genre peuvent s'expliquer d'une part par des différences morphologiques de structures cérébrales. Par exemple, des études d'imagerie cérébrale d'IRMf ont mis en évidence une activation de l'amygdale différente entre les hommes et les femmes selon la valence émotionnelle perçue lors d'une diffusion de clips vidéo présentant des visages heureux ou effrayants. En effet, une valence émotionnelle négative (visages effrayants) entraîne chez l'homme comme chez la femme une plus forte activation de l'amygdale gauche. Par contre, une valence émotionnelle positive (visages heureux) entraîne une plus forte activation de l'amygdale droite chez l'homme alors que chez la femme l'activation similaire des amygdales droite et gauche est observée (Cahill et al., 2001; Killgore and Yurgelun-Todd, 2001).

Ces différences liées au sexe et au genre peuvent également s'expliquer par le dimorphisme sexuel bien connu et documenté de l'axe corticotrope en situation basale mais surtout en réponse au stress. Les études chez l'Homme sont peu claires et montrent des résultats plutôt divergents du fait de la difficulté à réaliser des mesures « propres » de l'hormone de stress. Cependant il a été observé que les hommes et les femmes ne présentent pas la même sensibilité face à un même stress. Des études rapportent que les hommes sont en effet plus sensibles aux stress portant sur les performances alors que les femmes sont plus sensibles aux stress liés aux conflits interpersonnels (Stroud et al., 2002; Otte et al., 2005). Par ailleurs, des mesures de cortisol après un même stress ont montré que les niveaux de cortisol sont en général plus élevés chez les hommes, mais par contre durent plus longtemps chez les femmes (Kirschbaum et al., 1999; Chopra et al., 2009). Chez le rongeur de laboratoire, où les mesures de corticostérone en réponse au stress sont plus facilement contrôlées, il a été observé que les concentrations de corticostérone

en condition basale ou en réponse au stress sont plus élevées chez les femelles (Rhodes and Rubin, 1999). Par ailleurs, de nombreuses études indiquent que les hormones stéroïdiennes sexuelles favorisent ce dimorphisme. Les œstrogènes notamment augmentent la sensibilité vis-à-vis de l'agent stressueur et la réponse au stress de l'axe corticotrope (Patchev et al., 1995; Kajantie and Phillips, 2006) et la testostérone, à l'inverse, diminue les réponses. En effet, il a été observé que des femelles ovariectomisées répondent au stress comme les mâles et inversement pour les mâles castrés (Seale et al., 2004b; Seale et al., 2004a; Seale et al., 2005b).

D'un point de vue mécanistique, il a été montré chez le rat que les œstrogènes, notamment la 17β -œstradiol (E2), diminuent l'action de rétrocontrôle de l'axe corticotrope par les glucocorticoïdes par un mécanisme dépendant des récepteurs α aux œstrogènes situés dans les neurones paraventriculaire de l'hypothalamus, favorisant ainsi l'augmentation des concentrations plasmatiques de corticostérone (Weiser and Handa, 2009).

Enfin, le stress chronique et l'élévation continue de glucocorticoïdes ont des effets délétères sur la plasticité cérébrale comme une atrophie des neurones hippocampiques conduisant à des déficits cognitifs. Des études menées chez le rat ont montré que cet effet délétère de stress chronique sur le remodelage cérébral est plus important chez les mâles que chez les femelles, qui semblent en être protégées grâce à l'action des œstrogènes (Shors et al., 2001; Takuma et al., 2007; Dalla et al., 2009; McEwen, 2010).

2) Facteurs génétiques de la variabilité de l'axe corticotrope

Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette introduction il existe une grande variabilité interspécifique et interindividuelle dans les réponses de stress et par conséquent de l'activité et de la réactivité corticotrope. Ceci a pour conséquence une vulnérabilité à développer des maladies liées au stress. Une partie de cette variabilité a été démontrée d'origine génétique. De nombreuses études menées chez l'Homme et chez l'animal se sont notamment largement intéressées à la variabilité d'expression des gènes des récepteurs MR et GR ainsi que leurs polymorphismes dans la variabilité des réponses de stress et leurs impacts cliniques. De nombreux modèles de souris transgéniques (knock-out, knock-in, inductibles

et/ou tissus spécifiques) ont d'ailleurs été construits afin d'étudier les conséquences fonctionnelles de leur variabilité d'expression ((Wust et al., 2004; Datson et al., 2008; Erdmann et al., 2008) pour revues).

Une technique de génétique inverse : la cartographie génétique de locus de traits quantitatifs ou QTL (*quantitative traits locus*), a permis de rechercher des gènes participant à cette variabilité génétique de l'axe corticotrope en réponse au stress. Le principe de l'analyse QTL consiste à associer les valeurs phénotypiques d'un caractère quantitatif à une ou plusieurs régions du génome à l'origine de la variabilité observée. Cette technique permet de ne pas émettre d'hypothèse de départ sur les mécanismes biologiques et les gènes impliqués, considérant l'intégralité des gènes comme candidat à la présence de QTL par un criblage du génome dans son entier. Ainsi, cette approche présente l'avantage d'analyser les gènes en cause de façon exhaustive et éventuellement, de dévoiler des gènes non encore identifiés ou même dont on ne soupçonnait pas l'influence sur le trait étudié.

- *Exemple du gène codant pour la CBG*

Dans les années 1990, le laboratoire de P. Mormède a mené une étude QTL sur des porcelets issus d'un croisement entre deux races ségrégeantes dans leurs réponses comportementales et endocriniennes au stress. Il s'agissait de la race du porc Large White, caractérisé par une cortisolémie basale et après stress ainsi qu'une adiposité dites « normales » et un comportement actif. L'autre race de porc appelée Meishan présente à l'inverse un trait hypercortisolémique, une adiposité élevée ainsi qu'un comportement plutôt passif (Mormède et al., 1984; Desautels et al., 1999). L'étude a été menée sur les porcelets de la population F2 de ce croisement et a permis de mettre en évidence un locus situé sur le chromosome 7 expliquant 20% de la variabilité des taux de cortisol après stress (Desautels et al., 2002).

L'équipe de MP. Moisan a poursuivi cette étude sur ce modèle porcin. Par cartographie comparée avec le génome humain, elle a observé que le gène codant

pour la CBG se trouvait dans ce même locus ainsi défini. Cette localisation a été confirmée par la méthode de FISH (*fluorescent in situ hybridation*) à l'aide d'une sonde porcine contenant le gène *Cbg* ainsi que par l'utilisation d'hybrides de radiation. Ce gène *Cbg* est alors devenu un très bon gène candidat fonctionnel de la variabilité génétique des réponses au stress.

Afin de confronter l'hypothèse que le gène *Cbg* était bien le gène causal du locus détecté par analyse génétique, la capacité de liaison de la CBG a ensuite été mesurée chez les descendants F2 issus d'un même mâle. Puis par liaison génétique il est apparu que cette capacité de liaison de la CBG était non seulement liée au locus du chromosome 7 porcine mais ce de façon encore plus forte que le taux de cortisol après stress. Ceci renforce l'hypothèse d'un rôle primaire de la CBG par rapport aux variations de la cortisolémie.

L'analyse des propriétés biochimiques de la CBG chez les races parentales montre que le porc Meishan a une capacité de liaison de la CBG trois fois plus grande que le porc Large White, associée à une constante de dissociation de 40% supérieure. Le taux de cortisol total est deux fois plus élevé et le taux de cortisol libre 1,85 fois plus élevé, résultats comparables aux données obtenues dans une étude précédente (Desautels et al., 1999). La quantité d'hormone libre, active, est alors plus importante chez le porc Meishan.

Par analyse statistique, les auteurs ont montré que le taux de CBG était corrélé positivement au dépôt de gras et négativement à la teneur en muscle. Par une nouvelle analyse de liaison génétique, une liaison a été révélée entre la région du QTL contenant le gène de la CBG et le dépôt de gras, plus particulièrement le poids et l'épaisseur du gras dorsal.

L'ensemble des résultats obtenus par l'étude phénotypique et par l'analyse moléculaire de la population F2 Meishan x Large White montrent donc que l'hypercortisolémie caractéristique de la race Meishan reste associée à l'accumulation de gras dans la population ségrégeante et que le gène *Cbg* est un bon candidat comme source de variabilité génétique responsable de l'hypercortisolémie et des différences de la composition corporelle (Ousova et al., 2004) ; Moisan, 2010).

L'implication de la CBG dans la variabilité des taux de glucocorticoïdes en réponse au stress a également été validée dans une autre étude d'association indépendante. En 2006, une étude de QTL sur la réponse de l'axe corticotrope après un stress de contention a été menée sur une population F2 de rats issue d'un croisement de rat Wistar Kyoto (WKY) avec le rat Fischer 344 (F344), souches ségrégeantes dans leur réponse de corticostérone au stress. Chez les rats WKY, la réponse en corticostérone suite au stress de contention est en effet beaucoup plus faible que chez les rats F344 (Solberg et al., 2006). L'analyse génétique a elle aussi mis en évidence un locus associé à la réponse en corticostérone dans lequel se trouvait le gène de la *Cbg*. Chez les rats WKY, une mutation ponctuelle portant sur le gène de la CBG a été identifiée. Celle-ci, déjà étudiée dans un autre modèle, entraîne une substitution d'acides aminés ayant pour conséquence une affinité réduite de la CBG pour les glucocorticoïdes (Smith and Hammond, 1991a).

L'ensemble de travaux de l'équipe, renforcé par ces travaux indépendants menés sur une autre espèce suggèrent fortement que la CBG peut, en partie, être à l'origine de la variabilité des taux de glucocorticoïdes dans les réponses de stress. Afin d'analyser les conséquences fonctionnelles des variations génétiques de la CBG et d'étudier son impact sur les réponses au stress, l'équipe a développé un modèle original de souris *Cbg* « floxée » permettant d'obtenir un knock out (k.o.) total ou tissu spécifique du gène *Cbg*. Par croisement avec une souris CMV-Cre un **k.o total du gène *Cbg*** a été obtenu et rétrocroisé sur plusieurs générations afin d'obtenir un fond génétique homogène C57Bl/6. C'est ce modèle rongeur original, les souris partiellement (*Cbg*^{+/-}) ou totalement (*Cbg*^{-/-}) déficientes en CBG, que j'ai étudié lors de mon travail de thèse.

Avant d'introduire les objectifs de mes travaux de thèse, une dernière partie de cette introduction générale a été consacrée à la transcortine ou CBG.

III. La transcortine ou CBG

Comme je l'évoquais précédemment, la transcortine est une glycoprotéine plasmatique, synthétisée par le foie, qui joue un rôle dans le transport des glucocorticoïdes. Chez l'Homme (Siiteri et al., 1982) comme chez le rongeur (Hammond 1980) 80 à 90% des glucocorticoïdes circulent sous forme complexée (donc inactive) à la CBG, 10% sous forme liée de manière aspécifique à l'albumine et 5 à 10% sous forme libre. Seule la forme libre de l'hormone étant biologiquement active (Mendel, 1989), la CBG est de ce fait un important régulateur de la biodisponibilité des glucocorticoïdes dans le sang.

A. Structure et fonctions de la CBG

1) *La CBG, un membre de la super famille des SERPINS*

L'existence de la CBG est connue depuis 1956. Elle a été purifiée à la fin des années 1960 par plusieurs groupes indépendants, à partir d'échantillons de sang humain et de rat (Breuner and Orchinik, 2002). Plus récemment, le gène de la CBG, appelé SerpinA6 en raison de la similarité de séquence avec d'autres SERPINS a été cloné et caractérisé dans 20 espèces d'après la base de donnée ENSEMBL (www.ensembl.org).

Le gène de la *Cbg*, composé de 5 exons, est localisé sur le bras long du chromosome 14 humain, dans la région q32.1 et fait partie d'un cluster de 11 gènes appartenant à la superfamille des SERPINS de classe A. Les SERPINS sont un groupe de protéines hautement conservées capable d'inhiber les protéases notamment les sérines protéases comme l'indique leur acronyme : *SERine Protease INhibitors and Substrates*. Le gène de la CBG, SerpinA6, est probablement dérivé d'un ancêtre commun avec les dix autres du cluster. D'ailleurs, le sens de transcription des gènes SERPINS de ce cluster est inversé d'un sous ensemble à l'autre. Ceci suggère que ces gènes dérivent d'un ancêtre commun par un processus de duplication inversée (Zhao et al., 2007; Moisan, 2010).

La structure primaire et la composition moléculaire de la CBG ont été révélées en 1987 pour la première fois à partir de l'isolation d'un ADNc de CBG humaine dans le foie et le poumon par Hammond et ses collaborateurs (Hammond et al., 1987). Ceci a permis de caractériser ce gène et sa localisation chromosomique chez l'Homme (Underhill and Hammond, 1989; Seralini et al., 1990b).

Son existence dans une large variété d'espèces et sa structure hautement conservée supportent l'idée que la CBG joue un rôle crucial dans la physiologie des corticostéroïdes. La **Figure 14** présente un arbre phylogénétique de la CBG.

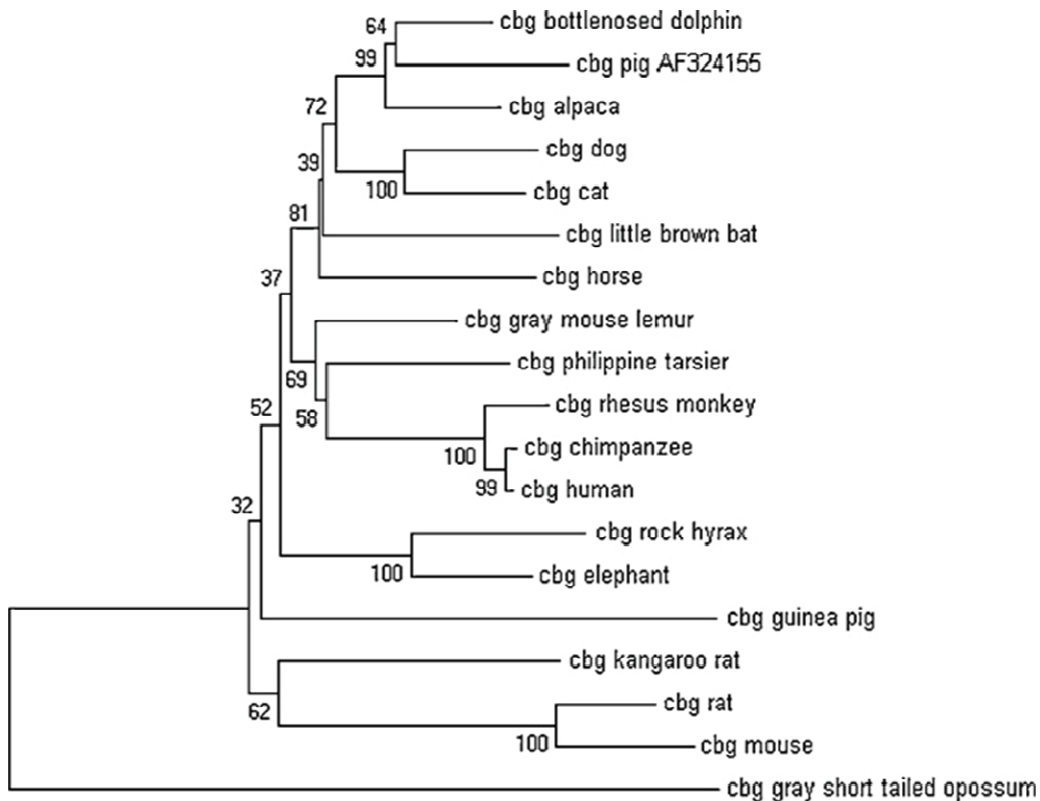


Figure 14 : Arbre phylogénétique de l'ADNc de la CBG dans 19 espèces.
Tiré de la revue (Moisan, 2010)

Au niveau protéique, une forte homologie (supérieure à 30%) a été établie entre la CBG et les 10 autres membres de la superfamille des SERPINs dont elle fait partie au même titre que la protéine de transport de la thyroxine, la TBG (*thyroxine binding globulin*, 44% d'homologie) (Law et al., 2006). Cependant la CBG, comme la TBG, a perdu cette propriété intrinsèque d'activité inhibitrice de protéase, mais sert plutôt de substrat à une protéinase spécifique comme l'élastase neutrophile. Le **tableau 1** liste les 11 membres de la superfamille des SERPINs regroupés sur le cluster chromosomique 14q32.1 (d'après (Law et al., 2006).

Nom de la protéine	Nom commun	Locus chromosomique	Rôle	Homologie avec la CBG
SerpinA1	α 1-antitrypsin (ATT)	14q32.1	Inhibe élastase neutrophile	43,2%
SerpinA2	Antitrypsin-related protein	14q32.1	Probable pseudogène	> 30%
SerpinA3	α 1-antichymotrypsin (ACT)	14q32.1	Inhibe cathepsine G	44,2%
SerpinA4	Kallistatin (KAL)	14q32.1	Inhibe kallikreine	> 30%
SerpinA5	Protein C inhibitor (PCI)	14q32.1	Inhibe protéine C active	> 30%
SerpinA6	Corticosteroid binding globulin (CBG)	14q32.1	Non inhibitrice, lie le cortisol	> 30%
SerpinA9	Centerin	14q32.1	Inhibitrice	> 30%
SerpinA10	Protein Z-dependant proteinase inhibitor	14q32.1	Lie la protéine Z et inhibe les facteurs Xa et XIa	> 30%
SerpinA11	Non caractérisé	14q32.13	Non caractérisé	
SerpinA12	Vaspin	14q32.1	Adipocytokine insulino-sensible	> 30%
SerpinA13	Non caractérisé	14q32	Non caractérisé	

Tableau 1 : Les 11 membres de la superfamille des SERPINs regroupés sur le cluster chromosomique humain 14q32.1

2) *Lieu de biosynthèse de la CBG*

Les hépatocytes sont le lieu de synthèse principal de la CBG (Brien, 1981). Après le clivage d'un peptide signal de 22 acides aminés au niveau du réticulum endoplasmique, le peptide de la CBG est sécrété dans le sang et circule, chez l'Homme, a des concentrations comprises entre 30 et 52 pg/mL (Torpy and Ho,

2007). *In vitro*, la protéine est également produite et sécrétée par les hépatocytes en culture (Emptoz-Bonneton et al., 1997).

Malgré la prédominance de la synthèse hépatique, la protéine a également été détectée dans d'autres tissus comme les poumons, les reins et les testicules (Hammond et al., 1987). Dans ces études, la protéine a été détectée par immunohistochimie, Western blot ou mesure de capacité de liaison. L'ARNm a été détecté par Northern Blot, RT-PCR ou hybridation *in situ*.

Les reins représentent le site extrahépatique majoritaire de la synthèse de la CBG. Scrocchi et collègues ont montré, chez la souris nouveau-né, que les tubules des reins sont le site principal de synthèse de la CBG jusqu'au 10^{ème} jour après la naissance, devant le foie. Cette expression est transitoire : elle atteint un pic à la troisième semaine postnatale puis disparaît (expression indétectable dès la 6^{ème} semaine). Il est cependant remarquable que les taux d'ARNm de la *Cbg* dans les cellules des tubules contournés proximaux des néphrons juxtamedullaires, chez la souris nouveau-né, atteignent des valeurs jamais atteintes par les hépatocytes (Scrocchi et al., 1993a). Dans d'autres espèces, chez les fœtus, une expression transitoire mais considérable a également été détectée dans le rein du Mouton (Berdusco et al., 1995) et du Lapin (Seralini et al., 1990a) mais aussi dans le pancréas de la Souris (Scrocchi et al., 1993b).

Au niveau cérébral, très peu d'études ont été réalisées. Par des techniques d'immunocytochimie et de biochimie, la protéine de la CBG a été observée dans les cellules endocrines de l'hypophyse antérieure puis dans le fluide cérébrospinal chez l'Homme (De Moor et al., 1962; de Kloet et al., 1984). De plus, la présence d'ARNm de CBG dans l'hypophyse a été montrée à la fois chez l'adulte (Perrot-Appianat et al., 1984; Kuhn et al., 1986) et chez le fœtus (Berdusco et al., 1995). Plus récemment, la présence de CBG a été observée par immunohistochimie et hybridation *in situ* dans les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus de rat, coexprimés avec la vasopressine et l'ocytocine. De plus, elle a été observées tout le long des projections axonales de l'hypothalamus latéral, de l'éminence médiane et de l'hypophyse postérieure (Mopert et al., 2006) et de manière plus répandue dans tout le cerveau de rat : hypothalamus latéral, région pré-optique, le noyau du lit de la strie terminale, la zone périaqueducule du mésencéphale, le cervelet, ou encore les

cellules de la corne dorsale de la moelle épinière, suggérant alors un rôle de la CBG dans la modulation de la perception sensorielle (Jirikowski et al., 2007). A l'instar des résultats obtenus chez le rat, des travaux du même type ont été menés chez l'Homme où il a également été démontré la présence de la CBG dans l'hypothalamus, co-localisée avec la vasopressine et l'ocytocine (Sivukhina et al., 2006). Il a été montré chez le rat, que la CBG ne peut pas traverser la barrière hématoencéphalique (Pardridge et al., 1986). Ainsi, ces co-localisations avec la vasopressine, qui agit en synergie avec le CRH pour stimuler la libération d'ACTH puis de glucocorticoïdes, suggèrent que la CBG jouerait un rôle probable dans la modulation fine de l'activité de l'axe HPA en délivrant spécifiquement les glucocorticoïdes au niveau de l'hypothalamus riche en récepteurs MR et GR, notamment lors du rétrocontrôle (Mopert et al., 2006). Dernièrement, il a également été observé que les cellules gliales synthétisent et sécrètent de la CBG en présence de glucocorticoïdes, certainement par un mécanisme non-génomique (Pusch et al., 2009). Depuis que la CBG a été trouvée dans les cellules épendymaires du troisième ventricule de rat ou dans le plexus choroïde chez l'Homme, deux types cellulaires dérivés des astrocytes, l'hypothèse a été formulée que les cellules gliales peuvent être la source de la CBG cérébrale. Il est à noter également que les cellules gliales tumorales sont sensibles aux stéroïdes surrénaliens (Paoletti et al., 1990; Carroll et al., 1995). Il est ainsi raisonnable de conclure que la présence de la CBG dans le cerveau témoignerait d'un rôle important dans la régulation de la biodisponibilité intracellulaires et extracellulaires des glucocorticoïdes dans le cerveau (Pusch et al., 2009; Henley and Lightman, 2011).

3) Structure de la CBG

La forte homologie de séquence notamment avec AAT et ACT (cf. Tableau 1, (Lin et al., 2010b)) suggère que la CBG est un substrat d'une protéase (Hammond et al., 1987). Les SERPINs présentent une structure en boucle de 30 à 40 acides aminés à l'extrémité C-terminale en surface de la protéine, comme la CBG, et c'est cette région qui est susceptible d'être clivée par une protéinase spécifique (Potempa et al., 1994). En effet, il a été démontré dans une étude *in vitro* que l'elastase des cellules neutrophiles clive spécifiquement la CBG. Ce clivage entraîne alors un

changement conformationnel important faisant passer la protéine dans une forme native « stressée » ($K_d = 1,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$) à une forme « relâchée » ($K_d = 1,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$). Cette forme clivée de la CBG (374 à 408 acides aminés selon les espèces) présente une affinité dix fois plus faible pour les glucocorticoïdes entraînant alors une libération de 80% des glucocorticoïdes liés à la CBG (Pemberton et al., 1988; Hammond et al., 1990).

Ce n'est que très récemment que la structure cristallographique de la CBG a été observée. Des travaux de cristallographie à haute résolution ont permis de mettre en évidence le détail mécanistique sur la façon dont la CBG libère son ligand stéroïdien après clivage protéolytique et son réarrangement conformationnel (Klieber et al., 2007; Lin et al., 2010b). Brièvement, lorsque le glucocorticoïde se lie à la CBG sur son site de liaison, la molécule prend alors une conformation en S typique de la forme native stressée des SERPIN. Dans cette conformation, la structure en boucle évoquée ultérieurement et appelée boucle réactive centrale (RCL) est complètement exposée. C'est cette boucle qui est clivée par les activités protéolytiques et qui en s'insérant au centre de la molécule entraîne un changement conformationnel de la CBG en une structure relâchée R (**Figure 15**).

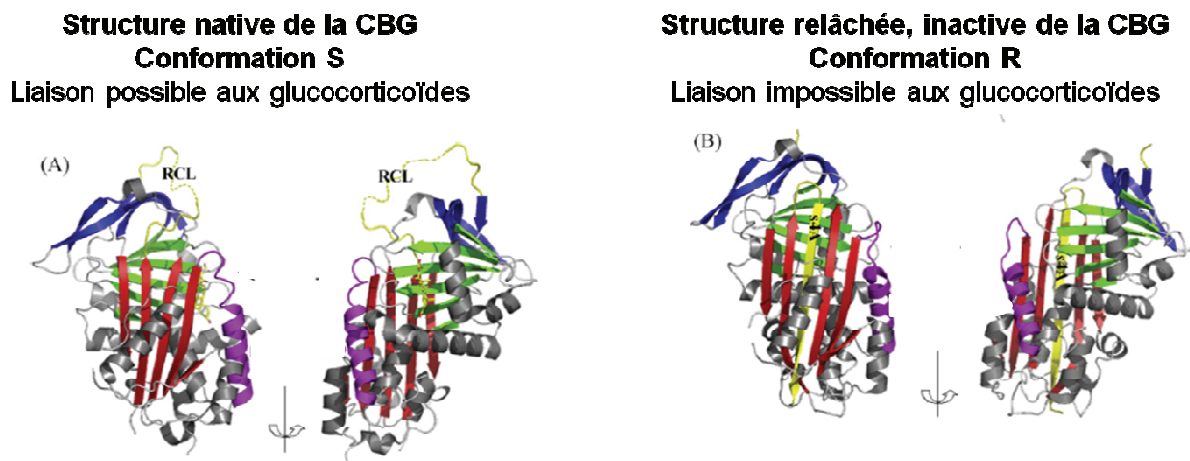


Figure 15 : Changement conformationnel de la CBG suite au clivage protéolytique.

Tiré de (Lin et al., 2010a)

RCL : reactive center loop, boucle réactive centrale qui s'internalise après clivage par les protéases rendant ainsi la CBG inactive.

Le clivage de la CBG par les élastases neutrophiles conduit à une destruction irréversible du site de liaison des stéroïdes. Cette observation a été notamment faite au niveau de sites inflammatoires où il se produit une attaque protéolytique du complexe circulant CBG-glucocorticoïdes. Celui-ci est en effet clivé localement par les sérines protéases, conduisant à une augmentation locale de la concentration de stéroïdes libres sur le site inflammatoire. C'est ainsi que la CBG a d'abord été vu comme un transporteur spécifique des stéroïdes anti-inflammatoires au site d'inflammation (Hammond et al., 1990; Hammond et al., 1991). Plus tard, il a été observé que lors du développement embryonnaire de la souris une augmentation de l'expression de la CBG extra-hépatique et plus précisément dans le rein coïncidait avec le remodelage tissulaire du rein associée à une activité protéolytique locale (Scrocchi et al., 1993a; Scrocchi et al., 1993b).

4) Glycosylation

La glycosylation est une modification classique des protéines chez les eucaryotes. Elle ajoute un nouveau niveau de complexité structurale qui peut influencer la biosynthèse, la sécrétion et l'activité biologique de la protéine. Une glycoprotéine typique contient une ou plusieurs chaînes de glucides liées à des résidus asparagines par des liaisons N-glycosidiques.

La CBG n'échappe pas à cette règle. La glycosylation de la CBG, comme toutes les glycoprotéines, s'effectue dans le RE grâce aux enzymes situées du côté luminal de la membrane du RE, pour donner une protéine riche en mannose. Les oligosaccharides, une fois liés à la protéine, sont rapidement modifiés. L'élagage est amorcé dans le RE (un mannose et trois glucoses sont enlevés de la plupart des glycoprotéines) et poursuivi dans l'appareil de Golgi (soustraction de plusieurs mannoses). De plus, au niveau de l'appareil de Golgi, quelques oses peuvent être ajoutés.

Chez les Vertébrés, les fractions glucidiques de la CBG représentent entre 20 et 30% de la masse moléculaire. La composition en sucre est caractéristique de l'espèce et peut varier au cours de différentes situations physiologiques afin de modifier les propriétés de la protéine (par exemple : modification de la demi-vie de la CBG, de sa clairance ou encore de sa capacité de liaison (Seralini et al., 1989;

Berdusco et al., 1993; Mitchell et al., 2004). C'est le cas pendant le développement fœtal, au cours de la grossesse et de certaines maladies (Avvakumov, 1995).

L'analyse de la CBG révèle que pour une mole de glycoprotéine provenant de plasma humain on observe cinq moles d'oligosaccharides du type N-acétyllactosamine bi et tri-antennaires (ratio 3 :2) (Avvakumov et al., 1993). Dans la séquence de la CBG humaine, six sites consensus de N-glycosylation ont été déterminés (Hammond *et al.* 1987). Le rôle des N-glycosylations n'est pas clairement défini. Cependant il apparaît que le bon déroulement des glycosylations est essentiel au bon repliement de la protéine qui permet alors l'acquisition d'une conformation active de la CBG et du site de liaison aux glucocorticoïdes (Avvakumov et al., 1993; Avvakumov, 1995). En effet, si la première étape de glycosylation sur le réticulum endoplasmique est bloqué, la CBG sécrétée ne se lie plus aux glucocorticoïdes (Ghose-Dastidar et al., 1991).

De plus, pour diriger certaines protéines vers les organites cibles, les organismes eucaryotes utilisent l'addition post-traductionnelle de polyosides liés par une liaison N-glycosidique. L'utilisation de variant de la CBG pour les différents sites de glycosylation a permis de mettre en évidence que l'absence des chaînes glucidiques entraîne une sécrétion réduite de CBG (Avvakumov et al., 1993; Avvakumov, 1995; Larsen et al., 1999). Ainsi, la glycosylation semble jouer un rôle important dans la compartimentation intracellulaire (Seralini et al., 1989) et la sécrétion de la CBG. D'autre part, les groupes glycosidiques peuvent stabiliser la conformation de la protéine et protéger la CBG contre la protéolyse.

5) Clairance de la CBG

La clairance métabolique de la CBG est la constante qui caractérise le volume de plasma épuré de CBG par unité de temps. La CBG circulante est dégradée progressivement. La vitesse d'élimination de la CBG dépend essentiellement des niveaux de glycosylation de la protéine et de l'activité des neuraminidases.

La clairance métabolique est caractéristique de l'espèce. En effet, si l'on injecte par voie intraveineuse de la CBG de Rat et de la CBG humaine chez le Rat, les demi-vies des deux types de CBG varient : la demi-vie de la CBG de Rat est cinq

fois plus grande que celle de la CBG humaine (Hossner and Billiar, 1981). Les auteurs concluent que l'espèce assure une spécificité de la demi-vie de la glycoprotéine via les neuraminidases endogènes. Chez l'Homme, la demi-vie de la CBG est de cinq jours (Brien, 1981) ce qui est largement supérieur à celles rapportées dans les autres espèces : environ 13h chez le Mouton (Berdusco et al., 1993), 14,5h chez le Rat (Smith and Hammond, 1991b) et aux alentours de 13h chez le Lapin (Seralini et al., 1989).

Certaines variations des concentrations plasmatiques de la CBG ont parfois été expliquées par des changements de sa clairance métabolique. Un exemple significatif nous est donné par l'expérience de Smith et Hammond chez les rats matures et immatures. Chez le rat nouveau-né, le taux plasmatique de CBG est relativement bas. Les taux plasmatiques atteignent les valeurs d'un animal adulte à partir de la 6^{ème} semaine après la naissance alors que les taux d'ARNm de *Cbg* hépatique sont équivalents à ceux d'un animal mature dès la 3^{ème} semaine. Les auteurs ont montré que c'est une variation de la clairance métabolique qui est à l'origine de ce décalage. En effet, chez le rat immature, la clairance métabolique est de 6,9h contre 14,5h chez l'animal mature. La variation de la clairance métabolique n'est pas imputable à une différence de composition en acides aminés : la protéine CBG est la même quel que soit l'âge de l'animal. Une activité élevée des sérines protéinases dans le sang du nouveau-né constitue une explication possible ainsi qu'une différence de glycosylation (Smith and Hammond, 1991b).

6) Propriétés moléculaires

La CBG mature est une glycoprotéine monomérique de 50-60kDa (Hammond, 1990). Son point isoélectrique est acide. La CBG circule sous forme monomérique, à l'exception de la CBG des primates du Nouveau Monde qui circule sous forme de dimère avec deux sous unités de 55kDa chacune (Hammond et al., 1994).

De nombreuses publications font état d'un doublet protéique lors de la migration de la CBG purifiée sur gel de polyacrylamide dénaturant : une forme courte et une forme longue sont alors visualisées. Ce doublet électrophorétique a été mis en évidence au cours de différentes recherches indépendantes chez plusieurs espèces :

chez l'Homme (Mickelson et al., 1982; Kato et al., 1988), le Rat (Wolf et al., 1981; Ali and Bassett, 1995), le Lapin (Chader et al., 1972), le Cochon d'Inde (Kato et al., 1988) et le Porc (Roberts et al., 2003).

7) Propriétés de liaison

La CBG se lie avec une très forte affinité (de l'ordre de 10^8 M^{-1} à 37°C , avec une variation de un à deux ordres de grandeur suivant l'espèce considérée) aux hormones glucocorticoïdes (cortisol, corticostérone) (Breuner and Orchinik, 2002) mais également et pour de nombreuses espèces à la progestérone (Pugeat et al., 1981). Elle ne comprend qu'un seul site de liaison par molécule (Mickelson et al., 1981). La comparaison phylogénétique de la CBG montre que l'affinité et la spécificité du site de liaison pour les stéroïdes varient entre les espèces. Cependant, quelle que soit l'espèce, la CBG se lie préférentiellement avec le glucocorticoïde le plus actif de l'espèce (Hammond et al., 1991). Ainsi, chez l'Homme et le porc, la CBG se lie au cortisol alors que chez la souris et le rat ainsi que chez la volaille, elle se lie à la corticostérone.

Son affinité pour les stéroïdes de synthèse dépend de la molécule considérée. Chez l'Homme, la prednisolone se lie à la CBG avec une affinité comparable à celle du cortisol alors que la dexaméthasone ne se lie pas à la CBG (Dunn et al., 1981; Pugeat et al., 1981). Son affinité pour les œstrogènes est très faible (Dunn et al., 1981). Il faut noter que les capacités de liaison de la CBG pour certaines substances varient en fonction de l'avancement de la grossesse chez les femmes. Dans quelques espèces, la CBG se lie avec une forte affinité à la testostérone (Siiteri et al., 1982). On peut imaginer que dans les tissus des organes reproducteurs, la grande concentration de progestérone et de testostérone entre en compétition avec les taux de glucocorticoïdes pour la liaison à la CBG.

8) La dynamique de liaison aux glucocorticoïdes : un mécanisme thermosensible

La dynamique de liaison aux glucocorticoïdes est critique et peut déterminer le niveau tissulaire de corticostéroïdes libres. Or, les niveaux de glucocorticoïdes varient rapidement puisqu'ils sont sécrétés de manière pulsatile en suivant un rythme ultradien. Une question a alors été posée : puisque la CBG ne peut lier qu'une seule hormone, est ce que celle-ci n'est pas saturée au pic ultradien ? Ou plus largement quelle est la dynamique de liaison des glucocorticoïdes à la CBG (Cameron et al., 2010). Comme évoqué plus haut, le mouvement de « flip-flop » de la boucle réactive centrale de la CBG qui permet de lier et de libérer l'hormone est, comme pour toutes les Serpins, sensible à la température. Il a ainsi été suggéré que la CBG est une protéine thermosensible (Beauchamp et al., 1998; Zhou et al., 2008). Cette propriété permettrait de moduler l'affinité de liaison avec les glucocorticoïdes et expliquerait aussi la variabilité de liaison des glucocorticoïdes à la CBG pour différentes températures (Mickelson et al., 1981).

Une étude très récente menée dans le groupe de S. Lightman, a étudié l'effet de la température (32°C, 37°C, 42°C) sur la liaison CBG-cortisol, combiné à l'effet de concentrations croissantes de cortisol plasmatique sur la saturation de la CBG. Pour cela, les fractions de cortisol libre, reflet des niveaux de CBG (Lewis et al., 2005), ont été mesurées après le traitement dans le plasma humain (Henley and Lightman, 2011). Les résultats, présentés **figure 16**, montrent qu'à 37°C, température physiologique, la fraction libre est stable pour des concentrations de cortisol comprises entre des valeurs basales jusqu'à 400nmol/L. C'est à partir d'une concentration de cortisol de 600nmol/L que cette fraction libre augmente successivement avec la concentration. Ceci témoigne d'une saturation de la CBG (l'albumine n'étant pas sensible aux effets de la température et de la concentration de cortisol) à partir d'une concentration de cortisol total plasmatique de 500 à 600nmol/L, comme ultérieurement observé (Ballard, 1979). Les fractions de cortisol libre sont également modulées par la température, modifiant alors le niveau de saturation de la CBG. De hautes températures (42°C) augmentent la fraction libre de cortisol, suggérant ainsi que la liaison du cortisol à la CBG est ponctuellement diminuée par une température élevée. Il a d'ailleurs été montré que la liaison CBG-

Cortisol augmente avec la baisse de la température (Burton and Westphal, 1972), comme observé dans cette étude à 32 °C.

Cette observation suggère qu'en effet, la CBG agit comme une protéine thermosensible qui permet de délivrer ponctuellement et localement le cortisol comme par exemple dans le cas de la fièvre, de l'inflammation ou de l'exposition à des sources externes de chaleurs (Cameron et al., 2010).

	Basal	400 nM	600 nM	800 nM	1500 nM
32 °C	9.0	10.2 NS	15.6**	22.8**	34.5**
37 °C	11.1	12.8 NS	17.6**	25.3**	36.2**
42 °C	16.9	19.6*	24.8**	29.3**	38.5**

Les comparaisons ont été faites avec la colonne de gauche adjacente
NS: Non significatif, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

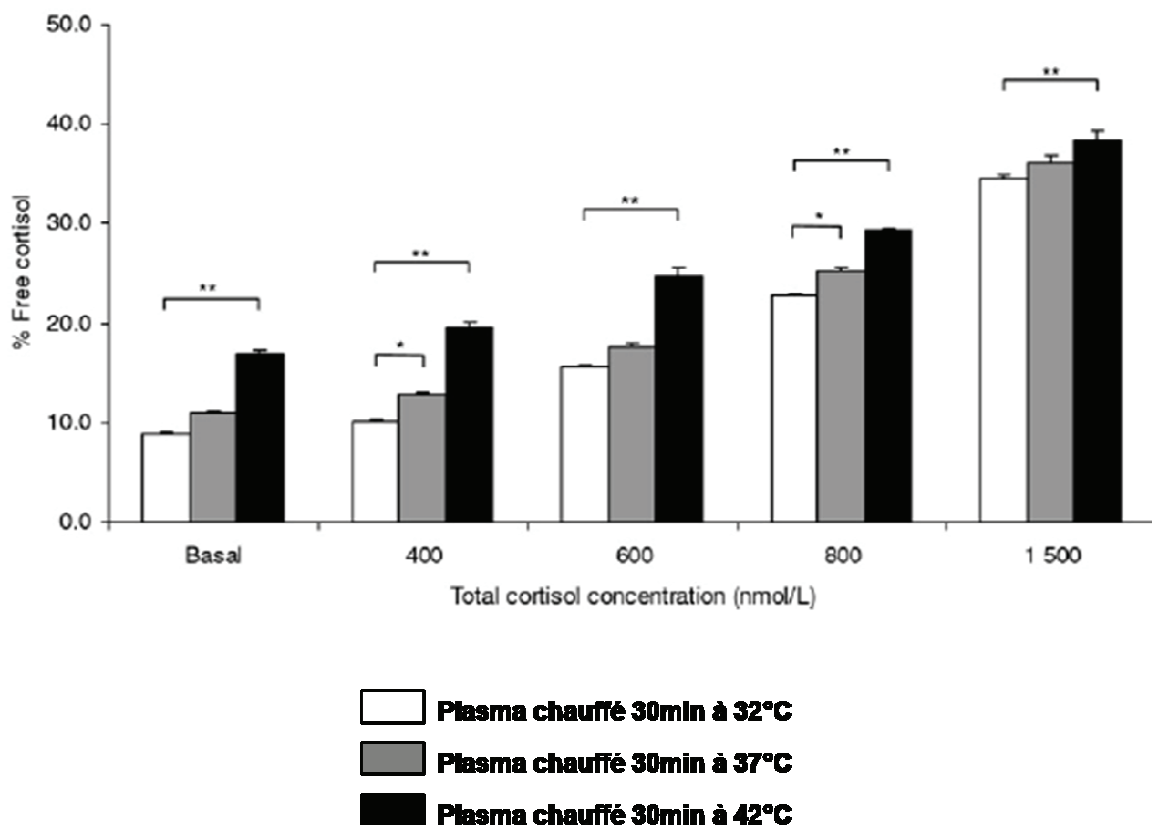


Figure 16 : Effet de la température sur la liaison CBG-cortisol dans le plasma humain.

Tiré de (Henley and Lightman, 2011)

Mesure de la fraction plasmatique de cortisol libre par ultrafiltration.

La concentration basale de cortisol total est de 230nmol/L, la CBG est de 49,9 mg/L et d'albumine qui n'est pas sensible aux variations de température est de 35,6 g/L.

9) **Interaction de la CBG avec les membranes cellulaires**

Nous avons évoqué la présence intracellulaire de CBG au sein de tissus cibles des glucocorticoïdes, hors du foie, leur principal lieu de synthèse. Plusieurs hypothèses ont été formulées sur cette présence de la CBG extrahépatique comme une synthèse *de novo* de la protéine ou une internalisation de la CBG plasmatique. Certaines études se sont alors focalisées sur la recherche d'un récepteur membranaire de la CBG expliquant alors l'internalisation de celle-ci.

Chez l'Homme, il a été observé que la CBG se lie à la membrane des cellules du foie (Strel'chyonok and Avvakumov, 1983), de la prostate (Hryb et al., 1986), de l'endomètre et du syncytiotrophoblaste (Krupenko et al., 1991). Chez le Singe rhésus, Hryb et collègues ont mis en évidence une liaison entre la CBG et les membranes des cellules de rein, de rate, de foie et d'utérus (Hryb et al., 1986). Chez le Rat, les tissus impliqués sont la rate, le rein, l'endomètre et le foie (Maitra et al., 1993). Maitra et collègues ont observé, chez le Rat, une liaison de la CBG à la membrane uniquement si la CBG est « libre », non liée aux glucocorticoïdes (Maitra et al., 1993). Strel'chyonok et collègues montrent au contraire, que la liaison de la CBG à une hormone stéroïdienne ne modifie pas la mise en place du complexe CBG-membrane (Strel'chyonok and Avvakumov, 1991). Cependant, les expérimentations de cette équipe ont été réalisées à 4°C alors que celles de Maitra, à 37°C. Cette différence de température peut expliquer les divergences de résultats puisque, nous l'avons vu, la CBG est thermosensible.

Malgré cette découverte d'une liaison de la CBG à la membrane, à ce jour aucun récepteur membranaire à la CBG n'a pu être isolé. Cependant, trois hypothèses ont émergé quant au rôle potentiel d'un récepteur à la CBG (Gagliardi et al., 2010). La première hypothèse sous-entend une fonction intracellulaire de la CBG. Le récepteur membranaire permettrait alors l'entrée de la CBG dans la cellule (Rosner, 1990; Rosner et al., 2010). La deuxième hypothèse tend à montrer que le récepteur serait une voie d'internalisation du complexe CBG-glucocorticoïdes et permettrait un meilleur contrôle de la distribution des glucocorticoïdes dans certains tissus, notamment dans les régions peu vascularisées (Rosner, 1990; Hammond, 1995). Une fois à l'intérieur de la cellule, la CBG pourrait libérer le glucocorticoïde actif : il s'agit d'un transport actif des glucocorticoïdes en comparaison avec le

transport classique par diffusion à travers les capillaires ou les membranes cellulaires (Hryb et al., 1986). La dernière hypothèse consiste à considérer la CBG comme une pro-hormone capable d'activer un système de second messager. La CBG libre (mais pas la liée) se lie aux récepteurs en surface des cellules. Une fois fixée, un glucocorticoïde se lie au complexe récepteur – CBG. Ceci entraîne l'augmentation d'adénylate cyclase et d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) en quelques minutes ce qui préfigure d'une action non transcriptionnelle des glucocorticoïdes. Les AMPc pourront alors à leur tour stimuler ou inhiber d'autres systèmes biologiques (Maitra et al., 1993).

B. Variabilité du taux de CBG

Nous l'avons évoqué, la CBG lie principalement les glucocorticoïdes et permet ainsi de réguler le transport et la biodisponibilité de ceux-ci. Les taux de CBG plasmatique résultent de l'équilibre entre sa biosynthèse par les hépatocytes et sa clairance métabolique. Ainsi tout facteur ayant une influence sur l'un ou l'autre de ces paramètres est susceptible de modifier les concentrations plasmatiques de la CBG ou de modifier son activité, par exemple, en modulant l'efficacité de liaison du complexe CBG-glucocorticoïdes. Ces variabilités des taux de CBG sont observées au niveau physiologique et peuvent aussi avoir des conséquences pathologiques. Cette partie s'attache ainsi à présenter ces facteurs modifiant les taux de CBG ou ses propriétés intrinsèques et les conséquences de cette variabilité de la CBG.

1) *Variabilité physiologique de la CBG*

L'âge, la croissance et le développement, l'influence hormonale (hormones thyroïdiennes, Vitamine A, Vitamine D, ou encore cytokines), le stress, mais aussi le sexe et la gestation sont tout autant de facteurs capables de moduler les niveaux plasmatiques de la CBG (Kudielka et al., 2009). Nous allons ici faire un point sur l'influence de certains de ces facteurs sur la variabilité physiologique de la CBG en commençant par le dimorphisme sexuel et l'influence des hormones sexuelles, facteurs qui m'ont fortement intéressée lors de ma thèse.

a) Dimorphisme sexuel

Chez l'Homme, peu d'études font état d'une claire différence des taux de CBG plasmatique entre les 2 sexes. Ceci s'explique par le fait que la comparaison de ces mesures est difficile puisque divers facteurs sont capables de moduler les taux de CBG et qu'ils ne sont pas forcément contrôlés chez l'Homme. De plus, la mesure de la CBG n'est pas systématique. Toutefois, les études menées sur des cohortes humaines qui ont rapporté des différences statistiques entre les deux sexes, vont toujours dans le sens de taux plasmatiques de CBG plus élevés chez la femme (Lewis et al., 2004; Fernandez-Real et al., 2005). De même, l'observation de variations des taux plasmatiques de CBG au cours du cycle menstruel chez la femme n'est pas évidente. Certaines études ont rapporté que les taux de CBG plasmatique sont statistiquement plus élevés durant la phase lutéale que durant la phase pré-folliculaire (Angeli et al., 1978) Kudielka and Kirschbaum, 2005), pour d'autres ces variations existent mais ne sont pas significatives (Moore et al., 1978; Brien, 1981).

Chez l'animal, ces mesures de CBG entre mâles et femelles sont plus simples du fait d'un meilleur contrôle environnemental. Il a été mis en évidence qu'en effet les taux de CBG sont plus élevés chez les femelles. Une étude menée chez le rat montre une différence d'un facteur 2 entre les deux sexes (Jansson et al., 1989) et cette différence est retrouvée chez la souris. De plus, différentes souches de souris ont été testées et quel qu'elles soient, ce dimorphisme sexuel est toujours retrouvé (Faict et al., 1986; Jones et al., 1998).

Les hormones stéroïdiennes sexuelles semblent être fortement impliquées dans ce dimorphisme. Les œstrogènes notamment stimulent positivement les niveaux de CBG dans le plasma, via un mécanisme dépendant des récepteurs α aux œstrogènes (Nader et al., 2006). En effet, il a été observé chez la femme que la prise de contraceptifs œstrogéniques, augmente de manière dose dépendante les taux de CBG (Moore et al., 1978; Wiegratz et al., 2003; White et al., 2006; Qureshi et al., 2007). De ce fait, il a été suggéré que la CBG pouvait être un marqueur quantitatif et un contrôle des niveaux d'œstrogènes circulants. Chez le rongeur de laboratoire, cette observation a également été faite. En effet, il a été observé que les taux de CBG chez le rat femelle étaient 2,5 fois supérieurs à ceux des mâles, seulement

dans le cas où l'animal est mature. Ce dimorphisme sexuel n'est en effet pas observé chez le rat immature. De plus, il a aussi été montré que l'administration d'œstrogènes chez le rat castré augmente les niveaux de CBG quand l'administration d'androgène les diminue (Mataradze et al., 1992).

b) Cas de la gestation / grossesse

Compte tenu de l'influence des hormones sexuelles stéroïdiennes sur les taux de CBG, il n'est pas étonnant d'observer une variation des niveaux de CBG au cours de la gestation. En effet, il a été observé chez l'Homme et dans de nombreuses espèces que la CBG augmente jusqu'en milieu de gestation (de 50 à 70%) avant de diminuer progressivement jusqu'à la parturition.

Chez la femme, pendant la grossesse, les taux de CBG augmentent visiblement à partir de la 9^{ème} semaine d'aménorrhée, puis augmentent encore jusqu'au sixième mois en parallèle à l'augmentation des niveaux d'œstrogènes. Durant le dernier trimestre de grossesse, les taux de CBG restent stables. Il est à noter que la teneur maximale en CBG plasmatique pendant la grossesse est de deux à trois fois supérieure à la valeur basale (Abou-Samra et al., 1984). De plus, ces augmentations protéiques de la CBG corrélerent à l'augmentation des niveaux d'ARNm de CBG plasmatique. Après l'accouchement, les niveaux de CBG tombent brusquement favorisant ainsi une forte augmentation des niveaux de cortisol libre (Ho et al., 2007), puis les taux de CBG reviennent rapidement aux valeurs plasmatiques basales en une semaine (De Moor et al., 1966). Ces données sont en accord avec les valeurs mesurées chez les primates non humains (Pepe et al., 1996), le rat (Hammond et al., 1991), le lapin (Seralini et al., 1990a), la souris (Scrocchi et al., 1993a; Scrocchi et al., 1993b) ou encore le mouton (Berdusco et al., 1995).

Cette hausse des taux de CBG durant la gestation semble être consécutive à l'augmentation des niveaux de glucocorticoïdes plasmatiques également observée lors de cette période, de même qu'une augmentation des niveaux d'ACTH et de CRH (McLean et al., 1995; de Weerth and Buitelaar, 2005). Le rôle de la CBG serait alors de protéger le fœtus d'une trop forte exposition aux glucocorticoïdes libres pendant

cette période, tout en permettant de constituer un réservoir de glucocorticoïde plasmatique plus important qu'en situation « normale » favorisant ainsi une action anti-inflammatoire, immunitaire ou encore développementale des glucocorticoïdes.

c) Variation circadienne

Nous l'avons vu, les concentrations de glucocorticoïdes dans le sang ne sont pas statiques mais présentent un rythme circadien bien décrit. En parallèle de celui des glucocorticoïdes, il a aussi été observé un rythme circadien de la CBG dans plusieurs espèces vertébrées : l'Homme (Frairia et al., 1988), le rat (Meaney et al., 1992), la souris (Ottenweller et al., 1979), ou encore les oiseaux (Lynn et al., 2003).

Chez le Rat, il a été mis en évidence que la variation circadienne du taux de CBG est en relation étroite avec les variations circadienne des glucocorticoïdes. Chez des femelles rat Sprague Dawley, il a été montré que les concentrations de CBG les plus élevées apparaissent en début de phase nocturne, donc lors du pic circadien. La concentration plasmatique diminue alors jusqu'à atteindre un nadir en début de phase diurne. Ces études montrent ainsi que la concentration de CBG reflète les variations circadiennes des taux de glucocorticoïdes. Cependant, l'amplitude des variations du taux de CBG est bien moins importante que celles des taux de corticostérone : la concentration de CBG est multipliée de 1,4 à 1,6 entre la phase diurne et la phase nocturne alors que la concentration de corticostérone est multipliée par 13 (D'Agostino et al., 1982; Hsu and Kuhn, 1988; Meaney et al., 1992). Il en résulte ainsi une légère hausse du taux de corticostérone libre lors du pic circadien.

Afin d'étudier l'influence des glucocorticoïdes sur la mise en place de ce cycle, un groupe de rats a été surrénalectomisé. Il a tout d'abord été observé que cette surrénalectomie entraîne la disparition des variations cycliques des taux de CBG. De plus, lorsque la surrénalectomie est complétée par une administration en continu de corticostérone (par voie orale), aucune variation du taux de CBG n'est observée. En revanche, si la complémentation est administrée de manière discontinue, la concentration de CBG diminue parallèlement à la diminution des glucocorticoïdes (Hsu and Kuhn, 1988).

Par ailleurs, les études concernant les variations circadiennes du taux de CBG chez l'Homme montrent des résultats discordants. En effet, quand certains auteurs n'observent aucune variation du taux de CBG au cours de la journée (De Moor et al., 1962), d'autres décrivent des variations mais de nature et de rythmicités différentes. Ainsi, la chute du taux de CBG plasmatique a été mesurée entre 3h et 9h du matin (Doe et al., 1964), à 4h (Angeli et al., 1978) ou encore à minuit (Deuschle et al., 1996). Cette discordance de résultats peut s'expliquer par le fait que les mesures du taux de CBG n'ont pas été faites de manière similaire : la fréquence ainsi que les heures de prélèvements sanguins ne sont pas les mêmes. Cependant, tous les auteurs démontrant l'existence d'une rythmicité circadienne s'accordent sur le fait que les valeurs maximales de CBG sont atteintes lors de la phase d'activité comportementale (phase diurne) et les valeurs minimales lors de la phase d'inactivité (phase nocturne).

d) Variabilité de la CBG en réponse au stress

Une réponse à un stress aigu est suivie d'une élévation des niveaux de glucocorticoïdes. Cependant, la plupart des études menées chez l'Homme comme chez l'animal, évalue l'impact « biologique » du stress par une mesure de la concentration de glucocorticoïde totale. Or, une mesure de l'hormone libre s'avère être plus appropriée à cette évaluation du stress puisque c'est cette fraction de l'hormone qui est biologiquement active. Certaines études ont réalisées des mesures parallèles de concentrations de glucocorticoïdes totale, libre ainsi que de CBG témoignant de l'importance de cette prise de conscience.

Après un stress aigu, il a été montré une relation négative entre les taux de glucocorticoïdes et les taux de CBG, notamment dans une étude récente menée chez le porc. Dans le plasma, la CBG, le cortisol total et le cortisol libre ont été mesuré 1 heure après une injection systémique d'ACTH (mimant un stress physiologique), toutes les 15 minutes et pendant 5 heures. Les auteurs ont mis en évidence que cette injection systémique d'ACTH conduit à une élévation de cortisol total et libre, mais à une diminution de CBG plasmatique. A l'inverse une injection de

dexaméthasone, agoniste des récepteurs GR, induit une diminution des taux de cortisol total et libre et une augmentation des niveaux de CBG (Adcock et al., 2007).

Une étude conduite par Breuner et collaborateurs, et menée chez le moineau, a fortement mis en avant le rôle potentiel de la CBG dans la modulation de la réponse au stress. Des mesures de corticostérone totale en condition basale et après stress ont été réalisées sur cinq souches de moineau présentant une réactivité comportementale différente face au stress. Celles-ci se sont révélées être homogènes entre ces souches de moineaux. Pourtant, la mesure des taux de CBG plasmatique a montré une grande variabilité selon les souches considérées, conduisant par conséquent à une grande variabilité des taux de glucocorticoïdes libres. Ainsi, ces différences, importantes sur le plan fonctionnel, auraient été masquées sans ces mesures de CBG et d'hormone libre mettant alors en avant un rôle potentiel de la CBG dans la modulation de la réponse au stress (Breuner and Hahn, 2003). Rappelons le travail de (Qian et al., 2011), présenté dans la partie II. A 6) de cette introduction, qui met en évidence un délai entre le pic de corticostérone totale et libre après stress causé par une rapide libération dans le plasma, par le foie, de CBG, permettant dans un premier temps d'augmenter la réserve plasmatique de corticostérone (corticostérone totale) pour permettre ensuite, une fois la CBG saturée (Gayrard et al., 1996; Henley and Lightman, 2011), d'augmenter les niveaux de corticostérone libre.

Enfin, une étude conduite chez l'Homme a montré que les réponses de cortisol et d'ACTH à un stress psychosocial peuvent être modulées par les niveaux de CBG. En effet, une femme sous contraceptif, donc présentant des niveaux sanguins de CBG plus élevés (cf. partie III. B 1) a)), présente des niveaux de cortisol salivaire (libre) plus faible et des niveaux de cortisol total plasmatique plus élevés après un stress psychosocial tel que le TSST (*trier social stress test*). Chez ces femmes, la CBG est donc négativement associée à l'ACTH et le cortisol libre en réponse à ce stress TSST. Cependant, chez l'homme (présentant donc des niveaux de CBG « normaux », du moins plus faibles que ceux de ces femmes) une association positive cette fois est retrouvée entre ces mêmes paramètres. Cette étude démontre ainsi un rôle de la CBG dans la régulation des réponses des acteurs de l'axe corticotrope en réponse au stress ou à des stimulations pharmacologiques (Kumsta et al., 2007).

e) Pathologies associées à des niveaux altérés de CBG

Il a été observé que les niveaux de CBG baissent de 50% lors d'affections critiques comme dans le cas de brûlures importantes, un multi traumatisme, après une chirurgie cardiaque, les cirrhoses, ou encore lors de chocs septiques. Cette observation est concomitante avec une élévation de niveau de cortisol libre (Savu et al., 1981; Pugeat et al., 1989; Tinnikov et al., 1996; Bernier et al., 1998; Ho et al., 2006).

Dans le cas de brûlure, il a été proposé que la baisse de CBG soit causée par l'action de l'interleukine de type 6 (Il-6). En effet, les niveaux d'Il-6 sont négativement corrélés à ceux de la CBG après la brûlure. L'Il-6 a été présentée dans une étude de cohorte humaine, comme le meilleur prédicteur des concentrations de CBG (Bernier et al., 1998). Dans une étude *in vitro* conduite sur des cellules humaines Hep G2, il a été observé que l'Il-6 induit une inhibition dose-dépendante de la CBG (Bartalena et al., 1993; Emptoz-Bonneton et al., 1997). De plus, chez l'Homme, l'injection d'une dose Il-6 par voie intraveineuse diminue de moitié les niveaux de CBG de 24 à 48 heures après l'injection (Tsigos et al., 1998). Dans le cas du choc septique, une augmentation de la clairance de la CBG, une augmentation de la dégradation de la CBG par l'elastase ou la recapture cellulaire ont été proposés pour expliquer cette chute des taux de CBG (Pugeat et al., 1989; Hammond, 1990). Ainsi, lors d'un stress physique extrême, cette importante chute de CBG permettrait d'exagérer et d'intensifier la réponse du cortisol libre et d'augmenter la délivrance de cortisol aux niveaux de tissus cibles (Gagliardi et al., 2010).

La diminution des niveaux de CBG peut également être observée lors d'un excès de glucocorticoïdes. Chez les patients atteints du syndrome de Cushing, maladie caractérisée par une hypercortisolémie, on observe une diminution des taux plasmatiques de CBG avec une augmentation des taux de cortisol libre par rapport aux sujets sains. Le même phénomène est observé chez les patients sous traitement aux glucocorticoïdes.(Schlechte and Hamilton, 1987; Carroll and Findling, 2010). Dans l'étude de Schlechte, chez les patients souffrant du syndrome de Cushing, il a été observé que la baisse des niveaux de CBG plasmatique est associée à une diminution de la capacité de liaison de la CBG. En effet, celle-ci est diminuée de 40% chez les sujets atteints de Cushing par rapport aux individus contrôles et de

30% chez les patients sous traitement aux glucocorticoïdes. Le syndrome de dépression majeure peut lui aussi être associé à une hypercortisolémie. Maes et collaborateurs observent une diminution des taux de CBG chez les dépressifs majeurs comparés aux taux des sujets contrôles. Cette baisse n'est d'ailleurs significative que chez les femmes ; il ne s'agit que d'une tendance chez les patients hommes (Maes et al., 1996). Enfin, chez l'animal en situation de stress chronique comme le stress social dominant/dominé (Spencer et al., 1996), on observe également une diminution de la concentration plasmatique en CBG ainsi qu'une diminution de la capacité de liaison et de la constante d'affinité pour les glucocorticoïdes. Il a été suggéré que ce phénomène favorise l'accès des glucocorticoïdes à leurs récepteurs (GR) (Spencer et al., 1996).

Il a également été observé que des traitements à l'insuline ou à la thyroxine entraînent une diminution des taux de CBG, en altérant notamment la glycosylation de la protéine (Crave et al., 1995; Mhrshahi et al., 2006; Metz et al., 2008). De même, des traitements aux hormones de croissance comme IGF-1 diminuent de 30% la sécrétion de CBG (Crave et al., 1995; Tschop et al., 2000).

Ainsi des conditions pathologiques ou les traitements thérapeutiques favorisent une modulation des niveaux de CBG qui par conséquent module les niveaux de cortisol total et surtout libre. La variation du taux de CBG peut également être la conséquence, généralement inattendue, de mutations génétiques.

2) Variations génétiques et polymorphismes influençant le fonctionnement de la CBG

Des mutations du gène de la CBG ont été recensées dans différentes espèces. Celles-ci sont à l'origine de fortes variations de l'activité et des propriétés biochimiques de la glycoprotéine (Gagliardi et al., 2010; Moisan, 2010).

a) Etudes chez l'animal

Chez le rongeur de laboratoire, Smith et Hammond en 1991 font état d'une baisse d'affinité de la CBG chez le rat BioBreeding (rat BB) (Smith and Hammond, 1991a). En effet, l'affinité de la CBG chez cette souche est 50% plus faible en comparaison de celle des rats Wistar. Cette variation d'affinité est due à une mutation ponctuelle sur le résidu 276 : elle donne lieu à une substitution des acides aminés Met → Ile.

Dans une autre étude menées sur 26 souches de souris, une mutation aux effets similaires a été identifiée chez la souris SIIIIS/J (Orava et al., 1994). La substitution Lys→Glu sur le résidu 201 est à l'origine d'une constante de dissociation de la CBG plus élevée dans cette souche (3,97nM contre 2,11nM chez la souris contrôle).

Cependant, dans ces deux cas, la variation d'affinité de la CBG n'explique pas les pathologies de ces modèles animaux. En effet, le rat BB est un modèle de diabète auto-immun, comparable au diabète de type 1 humain. Cette pathologie peut être retardée par un traitement aux glucocorticoïdes. Jusqu'à aujourd'hui aucun lien n'a été mis en évidence entre cette mutation ponctuelle de la *Cbg* (et la variation d'affinité associée) et le diabète auto-immun de ce modèle. La souche murine SIIIIS/J présente, elle, une forte mortalité à la naissance. Or, le taux de glucocorticoïdes influe sur le développement embryonnaire de certains organes. Mais, comme pour le rat BB, aucun lien entre cette mortalité précoce et la mutation n'a pu être démontré.

b) Etude chez l'Homme, polymorphisme de la CBG

Chez l'Homme, une série d'études cliniques a montré que la CBG plasmatique est un marqueur de la sécrétion d'insuline (Fernandez-Real et al., 1999; Fernandez-Real et al., 2000; Fernandez-Real et al., 2001) et corrèle (mieux que les taux de cortisol) avec de nombreux marqueurs du syndrome métabolique et de l'obésité comme les mesure de l'indice de masse corporelle, du tour de taille, de la glycémie à jeun ou encore de l'adiponectine (Fernandez-Real et al., 2002; Fernandez-Real et al., 2005).

Au laboratoire, le rôle d'un polymorphisme de la Cbg en relation avec l'obésité et les marqueurs métaboliques a été étudié dans une population humaine (Barat et al., 2005). L'activité et réactivité de l'axe corticotrope ainsi que les paramètres métaboliques et le degré d'obésité ont été caractérisés dans une population de 44 femmes obèses pré-ménopausées. Une analyse génétique a également été conduite grâce à l'utilisation de marqueurs microsatellites localisés dans l'intron 1 du gène de la CBG. Trois génotypes ont été détectés à partir des tailles des paires de bases des produits de PCR : 86/86, 86/90 et 90/90. La dernière paire d'allèle 90/90 est très rare, elle n'est observée qu'une fois sur 44. Aucune différence entre les trois génotypes n'a été trouvée pour les mesures phénotypiques évoquées. Cependant, une forte corrélation entre le cortisol salivaire après le test de suppression à la dexaméthasone et le tour de taille a été mesurée pour le génotype 86/90 ($r = -0,84$, $p < 0,001$), alors que cette corrélation n'est pas significative pour le génotype 86/86 ($r = -0,34$, $p = 0,09$). Ces résultats suggèrent ainsi que le polymorphisme du gène de la Cbg peut moduler l'influence de l'axe corticotrope sur la distribution de la masse grasse chez ces femmes obèses non ménopausées.

Dans une seconde étude menée au laboratoire, le même marqueur microsatellite du gène de la Cbg a été utilisé pour génotyper une population humaine de 295 hommes dont l'indice de masse corporelle (BMI) est compris entre 19 et 55kg/m² (Richard et al., 2009). La présence de l'allèle 90 a été retrouvée fortement augmentée pour les hommes présentant une obésité morbide (BMI > 40) comparé au reste de la population (30% vs 18%, $p = 0,02$). Il a aussi été observé, dans cette population, que le polymorphisme de la Cbg influençait le BMI et le tour de taille. De plus, les patients avec l'allèle 90 ont une tendance à présenter des niveaux plasmatiques de CBG plus faibles que les autres patients ($p = 0,07$) et cette tendance devient significative lorsque l'obésité morbide est intégrée dans les paramètres d'analyse ($p = 0,01$). Ainsi, les polymorphismes de la CBG influencent le BMI et le tour de taille chez les hommes.

De manière intéressante, cet allèle 90 du gène de la Cbg a été trouvé associé à une autre pathologie. Il a en effet été retrouvé légèrement augmenté (25% contre 20%, $p = 0,05$) pour une population de patients atteints d'arthrite idiopathique juvénile par rapport à une population contrôle (Donn et al., 2002).

c) Etudes chez l'Homme, mutations familiales de la CBG

Une étude portant sur la régulation de la CBG par les œstrogènes a permis de mettre en évidence pour la première fois et par hasard, une déficience partielle et familiale du gène de la Cbg (Doe et al., 1965). Aucun phénotype clinique n'a été détecté bien que des cas d'hypertension, d'hémorragie cérébrale et peut être une augmentation des cas de mort-nés aient été observés dans cette famille (Lohrenz et al., 1967). Par colonne de chromatographie, les niveaux de CBG plasmatiques ont été mesurés sur 45 individus de cette famille, testée sur trois générations. Il a été observé que 26 individus de cette famille présentent des taux de CBG plus faibles ($18,8 \pm 3,2$ mg/L) que les autres membres de cette famille ($35 \pm 3,6$ mg/L).

De récentes études ont plus précisément analysé les mutations familiales de la CBG par des mesures génétiques et phénotypiques. Ces mutations du gène Cbg sont rarement rapportées, certainement parce que les mesures de CBG plasmatique ne sont actuellement pas faites en routine (Torpy et al., 2004). Il existe à ce jour trois variants CBG héréditaires connus conduisant à la diminution de l'affinité pour le cortisol à cause d'une substitution d'un acide aminé : la mutation Leuven (1982), la mutation Lyon (2000) et une mutation dans l'exon 3 récemment observée (2010). Deux autres variants CBG conduisant à une diminution des niveaux de CBG par la formation d'un codon STOP prématuré ont été identifiés : la mutation Null (2001) et la mutation Santiago très récemment publiée (octobre 2011) (**Figure 17**).

- *La mutation CBG Leuven*

En 1981, Van Baelen et collaborateurs identifient pour la première fois dans une population caucasienne le variant appelé « transcortin Leuven », présentant une affinité plus faible pour le cortisol (affinité 2,6 fois moins importante à 4°C, 3,6 fois à 28°C) mais des concentrations plasmatiques de CBG normale (Van Baelen et al., 1982). C'est en 1992 que Smith identifie, dans une famille polonaise, l'origine de cette variation d'affinité : une substitution Leu → His sur le résidu 93, dans l'exon 2 du gène (Smith et al., 1992). La présence de cette mutation entraîne une dissociation plus rapide du complexe CBG-cortisol ($K_d = 0,40$ nM contre 0,30nM chez les sujets contrôles). Pour l'instant, l'implication clinique de cette mutation n'est pas claire, voire inexistante. Des problèmes d'hypertension ont été détectés chez trois individus

hétérozygotes pour la mutation, mais les huit autres hétérozygotes et les deux homozygotes identifiés dans une étude familiale, sont en bonne santé (Van Baelen et al., 1993).

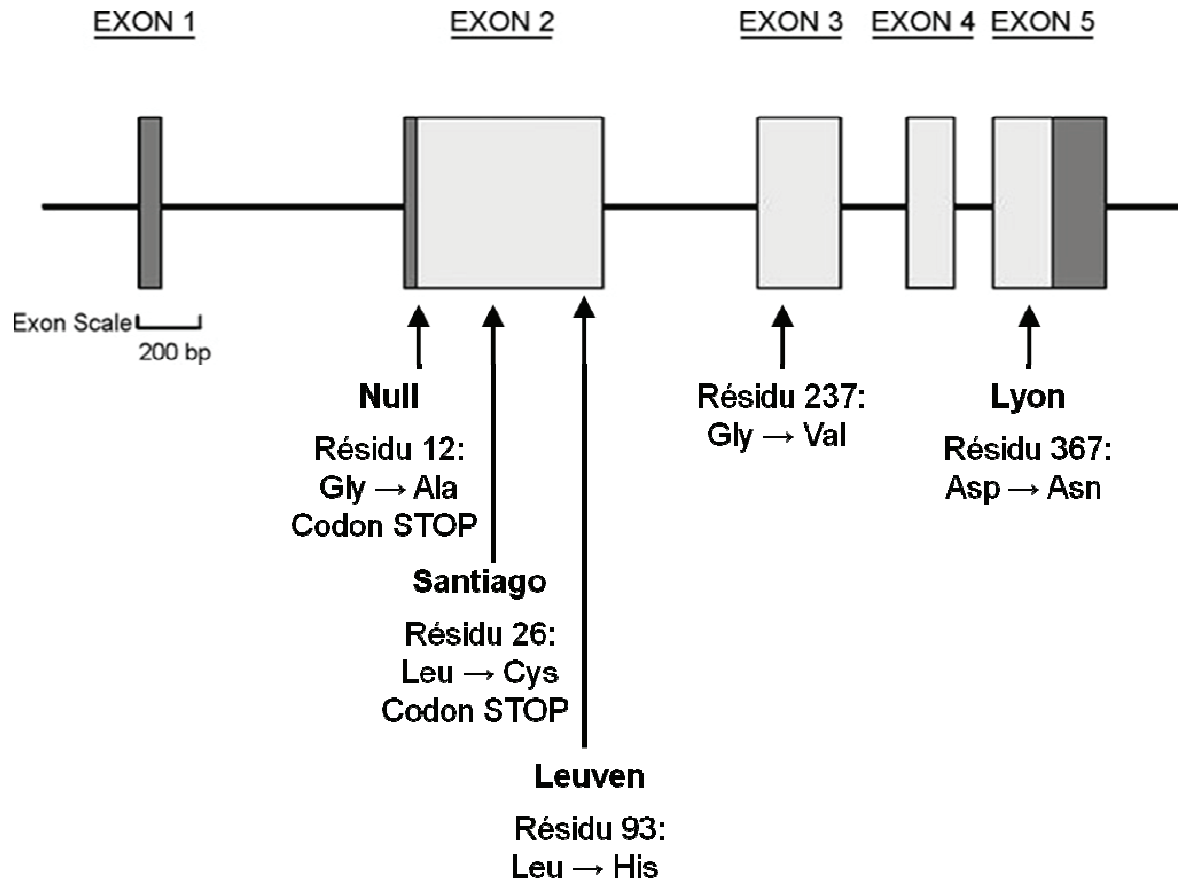


Figure 17 : Variants génétique de la CBG chez l'Homme

inspiré de (Gagliardi et al., 2010)

Le variant Null est une substitution de base G → A en position 121 de l'exon 2 qui conduit à la formation d'un codon STOP prématuré au niveau du résidu 12 de la molécule et à la perte complète de la fonction de la CBG.

Le variant Leuven est une substitution de base T → A en position 433 de l'exon 2 qui conduit au niveau du résidu 93 à un changement d'acide aminé de la molécule et à la diminution de l'affinité de liaison de la CBG au cortisol d'un facteur 3.

Le variant CBG Santiago est une délétion d'une base C en position 13 de l'exon 2 qui conduit à la formation d'un codon STOP prématuré au niveau du résidu 26 de la molécule et à la perte de la fonction CBG.

Le variant Lyon est une substitution de base G → A en position 125 de l'exon 5 qui conduit au niveau du résidu 367 à un changement d'acide aminé de la molécule et à la diminution de l'affinité de liaison de la CBG au cortisol d'un facteur 4.

La substitution de base G → T en position 776 de l'exon 3 qui conduit au niveau du résidu 237 à un changement d'acide aminé de la molécule et une diminution de l'activité de liaison de la CBG au cortisol.

- *La mutation CBG Lyon*

Une deuxième mutation affectant les propriétés de liaison de la CBG a été décrite dans trois familles et sur une personne isolée (Emptoz-Bonneton et al., 2000; Torpy et al., 2001; Brunner et al., 2003; Buss et al., 2007).

Le premier cas de mutation CBG Lyon a été observé chez une femme de 43 ans d'origine maghrébine (Emptoz-Bonneton et al., 2000). Cette patiente, présentait des symptômes d'asthénie chronique, une humeur dépressive et une hypotension suggérant une insuffisance surrénalienne. De plus, ses taux plasmatiques de cortisol total étaient très faibles alors que les niveaux d'ACTH plasmatique et de cortisol libre urinaire étaient normaux, de même que les fractions de cortisol libre (~9,2% versus ~3,4% chez les individus contrôles). Il s'est avéré que la concentration et la capacité de liaison de la CBG étaient quatre fois plus faibles que les valeurs standards. La baisse d'affinité de la CBG pour le cortisol résulte d'une mutation au niveau de l'exon 5 du gène de la CBG pour laquelle cette femme était homozygote. Cette mutation induit une substitution d'acides aminés Asp → Asn sur le résidu 367. Les quatre enfants de cette femme sont nés hétérozygotes pour cette mutation Lyon et à part l'aîné qui est obèse, ils sont tous en bonne santé. Cependant, ils présentent une réduction de 20% des niveaux de CBG d'origine encore inconnue et une réduction de 40% des niveaux de cortisol total.

Cette mutation CBG Lyon a ensuite été décrite dans trois générations différentes d'une famille brésilienne (Brunner et al., 2003). Cette étude a été menée sur dix individus comprenant deux individus homozygotes pour la mutation Lyon et huit individus hétérozygotes. Le taux de cortisol plasmatique, le taux de CBG et la capacité de liaison de celle-ci ont été mesurées chez tous ces individus et comparés à ceux de neuf individus contrôles. Pour ces trois mesures, les porteurs homozygotes et hétérozygotes de la mutation montrent des valeurs significativement inférieures à celles des individus contrôles, les valeurs des homozygotes étant également inférieures à celles des hétérozygotes. Il est intéressant de noter que le premier cas décrit, homozygote pour la mutation, souffrait d'obésité avec un BMI de 33 (Emptoz-Bonneton et al., 2000). Dans la famille brésilienne, la mutation n'a été associée ni à l'obésité ni à aucune autre pathologie à l'exception d'une patiente homozygote souffrant de fatigue chronique.

En 2007, un nouveau cas de mutation Lyon a été observé chez un jeune homme qui présentait une fatigue musculaire sévère, amplifiée dans une situation stressante telle que le TSST, évoqué ultérieurement (Buss et al., 2007). Il a été observé qu'après le TSST les niveaux de cortisol total dans le sérum étaient comparables à ceux d'individus normaux alors que les niveaux de cortisol libre étaient augmentés.

- *Mutation sur l'exon 3 du gène SerpinA6*

Récemment, une nouvelle mutation de gène de la CBG a été observée sur l'exon 3 dans une famille pakistanaise (Perogamvros et al., 2010). Il s'agit d'une femme âgée de 26 ans qui présente des symptômes d'hypotension et de fatigue et des niveaux très faibles de cortisol total dans le sérum. L'étude du gène SerpinA6 a permis de mettre en évidence une mutation homozygote dans l'exon 3 conduisant à une substitution d'acides aminés Gly → Val sur le résidu 237. Cette mutation conduit à une légère modification du positionnement des feuillets β de la CBG, feuillets constituant en partie le site de liaison aux corticoïdes. Dans cette famille, la mère est hétérozygote pour cette mutation et deux de ses enfants sont homozygotes. La concentration de CBG dans le sérum mesurée par RIA (*Radioimmuno assay*) est en dessous des taux normaux pour les individus homozygotes qui présentent également des niveaux faibles de cortisol total dans le sérum en situation basale ou stimulée. De plus il est observé que la pulsatilité du cortisol est augmentée chez ces individus. Les auteurs suggèrent que ceci peut modifier l'activité des glucocorticoïdes et ainsi participer au développement des symptômes décrits. Cependant, le cortisol libre mesuré dans le sérum ou dans les urines ainsi que l'ACTH sont reportées être à des concentrations normales. Par ailleurs, l'une des deux sœurs de cette famille est homozygote par cette même mutation mais celle-ci est en bonne santé et ne présente pas de différence de pulsatilité.

- *La mutation CBG Null*

Le premier cas de déficience totale de CBG a été découvert en 1984 par l'équipe de Roitman dans une famille d'origine iranienne (Roitman et al., 1984). Cette

déficiences est basée sur un taux de CBG plasmatique indétectable, une concentration en cortisol plasmatique total basse (2 µg/dL contre 6,1 à 15,6 µg/dL chez les individus contrôles) et une fraction de cortisol libre élevée (32,8% contre 2,3 à 5,5% chez les contrôles). Le patient ainsi que sa sœur souffrent de cette déficience. Les parents et un des deux frères ont des valeurs plasmatiques de CBG et de cortisol égales à la moitié des valeurs standard. Leur taux de cortisol libre mesuré le matin est comparable aux valeurs standards. Le deuxième frère présente des taux de CBG, de cortisol total et libre dans les normes. Ceci laisse supposer une transmission mendélienne autosomique récessive ou co-dominante de l'anomalie. Aucune étude génétique n'a été menée sur cette famille. L'anomalie responsable de cette déficience en CBG n'a pas été identifiée. Il est à noter que le patient souffre d'obésité et qu'un historique de diabète a été mis en évidence dans cette famille.

Un deuxième cas de déficience totale a été observé (Torpy et al., 2001). Chez trois membres d'une famille Italo-Australienne de 32 individus, une déficience totale en CBG a été clairement mise en évidence. Cette déficience résulte d'une substitution d'un seul acide aminé Gly → Ala dans l'exon 2 du gène *Cbg* (TGG → TAG) qui code alors pour un codon stop à la place d'un tryptophane sur le résidu 12, terminant alors très prématurément la synthèse de la protéine. Une étude plus approfondie a été menée chez les membres de cette famille notamment trois personnes homozygotes pour la mutation null, dix-neuf personnes hétérozygotes pour la mutation, trois personnes hétérozygotes pour la mutation Lyon décrite précédemment et deux personnes hétérozygotes possédant à la fois un allèle pour la mutation null et un pour la mutation Lyon. Le taux de CBG plasmatique est indétectable par dosage radio immunologique chez les homozygotes pour la mutation null et équivalent à 50% de la valeur standard chez les hétérozygotes. Dans les deux cas, les taux plasmatiques de cortisol total sont très faibles et la fraction de cortisol libre est élevée. Le nombre de sujets portant la double mutation n'est pas suffisant pour pouvoir en tirer des conclusions. Il semble toutefois que les conséquences de la mutation Lyon soient plus atténuées que celles de la mutation null. De manière générale, les individus porteurs de la mutation nulle, homozygotes et hétérozygotes, souffrent de problème d'hypotension artérielle et 82% des porteurs d'au moins un allèle ont un syndrome de fatigue chronique. Les trois sujets homozygotes ont des symptômes d'obésité : deux sont obèses et le troisième est en

surpoids. Enfin, une stéatose hépatique a été observée chez deux individus, un hétérozygote et un homozygote pour la mutation Null.

- *La mutation CBG Santiago*

Très récemment, une nouvelle mutation nulle a été identifiée (Torpy et al., 2011). Cette étude présente le cas d'un garçon âgé de 9 ans avec des problèmes de faiblesse musculaire et de fatigue accentuée après l'effort et de migraine. Il a été observé que cet enfant présente des concentrations de cortisol effondrées au pic circadien, le matin, en condition de repos ou après stimulation à l'ACTH. Le séquençage du gène *SerpinA6* a permis de détecter dans l'exon 2 la délétion d'une base cytosine en position 13, conduisant à la formation prématurée d'un codon STOP et ainsi à une diminution de 50% des niveaux de CBG chez ce patient, hétérozygote pour cette mutation. Il est à noter qu'un traitement à l'hydrocortisone n'a aucun effet sur les symptômes de fatigue. Torpy et collaborateurs concluent que les symptômes de fatigue et de douleur idiopathique sont à relier à une hypoactivité du système de stress due à une déficience en CBG.

La conséquence mécanistique précise de cette déficience en CBG est inconnue. Cependant, aux vues des symptômes de fatigue et de douleur chroniques, les auteurs suggèrent que la CBG est importante par exemple dans le transport des glucocorticoïdes dans le tronc cérébral pour activer les voies nociceptives. De même, les symptômes d'hypotension observés chez ces individus suggèrent un rôle du complexe CBG-cortisol dans la régulation vasculaire et la pression sanguine.

d) *Le premier modèle murin CBG null*

Afin d'étudier les rôles physiologiques de la CBG, l'équipe de T. Willnow a généré en 2006, le premier modèle de souris déficiente pour le gène *Cbg* (Petersen et al., 2006). Ces souris sont viables, se reproduisent bien et ne présentent pas d'anomalies évidentes. Ils ont tout d'abord évalué la régulation de l'axe HPA de ces souris. Ils ont tout d'abord observé que la clairance de la corticostérone est augmentée chez ces souris *Cbg*^{-/-}. De plus, la concentration de corticostérone totale

mesurée le matin se trouve diminuée chez ces mêmes animaux mutants par rapport aux souris contrôles. Par ailleurs, les auteurs observent que les concentrations de corticostérone libre sont augmentées de 10 fois et que les concentrations d'ACTH sont augmentées d'un facteur 3, par rapport aux souris de type sauvage. Ils présentent ainsi leur modèle comme un modèle d'hyporéactivité des glucocorticoïdes libres. Toutefois, nous pensons que les valeurs de corticostérone totale et d'ACTH qu'ils ont mesurées sont trop élevées pour être des valeurs basales, surtout si elles sont mesurées le matin (Moisan, 2010). De plus, ils mesurent une fraction de corticostérone libre extrêmement basse chez les souris contrôles (0.7% alors qu'elle est généralement comprise entre 5 et 10%). Les auteurs ont également observé que les souris déficientes en CBG ont une réponse au choc septique aggravée par rapport aux souris contrôles, aux vues de la plus grande mortalité observée 48 heures après une injection intrapéritonéale de LPS (lipopolysaccharide),

L'homéostasie métabolique de ces souris mutantes a ensuite été étudiée. Aucune différence entre les génotypes n'a été détectée dans les mesures dans le sang et les urines de souris nourris *ad libitum* ou placée à jeun pendant 12 heures, des électrolytes Na^+ , Ca^{2+} , K^+ et Cl^- ainsi que des métabolites créatinine, glucose, insuline et leptine. Les auteurs ont également observé qu'un régime enrichi en gras (26% de gras vs. 4% de gras pour le régime standard), donné à l'âge adulte, n'entraîne aucune modification du poids après 6 semaines de régime chez les deux génotypes. Cependant nous estimons que la durée de leur régime est trop courte par rapport aux autres études qui imposent plutôt un régime entre 12 à 15 semaines pour pouvoir observer une modification de poids chez la souris. Enfin, les concentrations de corticostérone totale et libre ont été mesurées dans le plasma après un stress aigu (36 heures de mise à jeun). Ils observent qu'après ce stress, les niveaux de l'hormone totale et libres sont augmentés par ce stress pour les deux génotypes. Cependant les niveaux de corticostérone totale sont plus bas et les niveaux de l'hormone libre ont une tendance ($p = 0.07$) à être plus élevés chez les souris *Cbg*^{-/-} par rapport aux souris contrôles. Nous pensons encore ici que ces mesures n'ont pas été réalisées de la manière la plus optimale possible. En effet, une importante variation intra-groupe apparaît dans leurs résultats, à en juger par les très importantes erreurs type de la distribution des moyennes.

Ainsi ce modèle apporte des informations importantes sur le rôle de la CBG. Le résultat le plus intéressant de cette étude porte sur le rôle critique de la CBG lors d'un choc septique, en raison de sa structure de SERPIN permettant à la CBG de libérer les glucocorticoïdes localement aux sites d'inflammation (Hammond et al., 1990). Cependant, nous estimons que l'évaluation de la régulation de l'axe HPA en condition basale et après stress n'a pas été correctement menée pour toutes les raisons que nous avons évoquées. En situation basale, il aurait été par exemple intéressant de mesurer la corticostérone le soir, lors du pic circadien. Enfin, ce modèle de souris k.o. Cbg ne modélise pas complètement les symptômes observés chez les patients CBG Null. En effet, plusieurs contradictions apparaissent. Tout d'abord les patients CBG Null sont en surpoids ou obèses alors que les souris Cbg-/- ne présentent pas de modification de poids après un régime enrichi en gras de 6 semaines. De plus, les niveaux de glucocorticoïdes libres mesurés après stress sont observés plus élevés chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles, or ils sont diminués chez l'Homme CBG Null. Ce modèle présenté par l'équipe de Willnow ne semble ainsi pas présenter d'impact majeur de la déficience en CBG mais n'apporte pas énormément d'éléments quant au rôle de la CBG *in vivo*.

OBJECTIFS

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

A ce jour, la CBG est considérée comme ayant un rôle majeur dans la formation d'un réservoir plasmatique de glucocorticoïdes. Elle joue également un rôle important dans le transport de l'hormone jusqu'à ses cibles, notamment aux sites inflammatoires où la CBG subit les attaques des élastases libérant ainsi les glucocorticoïdes libres. Par contre, la fonction exacte de la CBG dans la réponse de stress n'est à ce jour pas clairement connue. En effet, dans les études cliniques et animales, elle a souvent été toujours considérée comme maintenant des niveaux constants et par conséquent n'a que très rarement été mesurée, ne permettant ainsi pas d'avoir une évaluation correcte de sa fonctionnalité.

Pourtant, nous venons de le voir, sa variabilité génétique d'expression chez l'Homme comme chez l'animal (conduisant à une diminution de sa capacité de liaison aux glucocorticoïdes ou à une diminution de son expression et ainsi de sa synthèse et libération dans le sang) induit des répercussions directes sur la fonction glucocorticoïde. Ces hormones jouent un rôle majeur dans la réponse au stress permettant une adaptation de l'individu à son environnement. Cependant, une dérégulation de la réponse au stress notamment due à une hyper ou à une hypo-activité des glucocorticoïdes en réponse au stress, peut conduire à une mauvaise adaptation physiologique et comportementale. Il est bien souvent observé que ces dérégulations aboutissent à diverses conséquences physiopathologiques, conduisant alors au développement de nombreux « troubles et maladies liées au stress » comme la dépression, l'obésité, les troubles de la mémoire etc.

Cependant, selon ses caractéristiques, chaque individu évalue les évènements de vie selon sa propre échelle de valeur allant de l'indifférence à une perception mineure voire majeure. Il apparaît ainsi une très grande diversité dans la réponse adaptative au stress expliquant ainsi la vulnérabilité à développer des maladies liées au stress de certains. Ces différences d'appréciation et de retentissements dépendent de facteurs individuels qui varient selon l'âge et le sexe/genre et qui relèvent de l'interaction permanente du patrimoine génétique et de l'histoire personnelle (Korte et al., 2005; Odermatt and Gumy, 2008; Kudielka et al., 2009).

Deux études génétiques indépendantes conduites sur deux espèces animales différentes (porc et rat) et menées sans hypothèses de départ (analyse de QTL) ont placé le gène codant pour la CBG comme le facteur génétique le plus important influençant les réponses glucocorticoïdes de stress (Ousova et al., 2004; Guyonnet-Duperat et al., 2006; Solberg et al., 2006). L'étude de modèles animaux knock out (k.o.) pour ce gène de la *Cbg* semble alors nécessaire pour comprendre l'impact de la déficience en CBG observée chez l'Homme et également pour disséquer le rôle de la CBG pour différents traits spécifiques. Ainsi, l'équipe a développé au laboratoire un modèle original de souris *Cbg* « floxée » permettant d'obtenir un k.o. total ou tissu spécifique du gène *Cbg*. Par croisement avec une souris CMV-Cre un **k.o total du gène *Cbg*** a été obtenu et rétrocroisé sur plusieurs générations afin d'obtenir un fond génétique homogène C57Bl/6.

A l'aide de ce modèle rongeur original, l'objectif principal de ce travail de thèse est d'étudier les conséquences fonctionnelles de la déficience en CBG en particulier sur les réponses de stress.

Dans une première partie, nous nous sommes attachés à évaluer l'influence de la variabilité d'expression du gène *Cbg* chez les mâles. La réactivité de l'axe corticotrope à un stress aigu de valence modérée à intense a ainsi été mesurée puis, dans un deuxième temps, les réponses comportementales émotionnelles à ces stress (comportement de type anxieux ou de type dépressif notamment) ont été évaluées. Nous présentons ainsi un modèle d'hypo-réponses des glucocorticoïdes au stress associé à un phénotype de type dépressif.

Cette première partie nous a conduit à formuler l'hypothèse qu'une déficience totale ou partielle de CBG plasmatique ne permet pas aux centres supérieurs cérébraux de produire la réponse comportementale adaptative et que la CBG joue un rôle majeure dans la régulation de la quantité de glucocorticoïdes accédant au cerveau en situation de stress. Dans une deuxième partie, nous avons ainsi mesuré par microdialyse la concentration de corticostérone intrahippocampique des souris mutantes suite à l'application d'un stress. Puis, par diffusion intrahippocampique de corticostérone, nous avons pu mimer la réponse comportementale au stress dans une tâche comportementale bien connue pour être sensible aux effets du stress et

ainsi, restaurer le phénotype de sensibilité au stress de ces souris déficientes en CBG.

Une troisième partie de cette thèse a été consacrée à l'étude du modèle k.o. Cbg chez la femelle en situation de stress intense puisque, comme nous l'avons vu à plusieurs reprises dans l'introduction, l'axe corticotrope présente un dimorphisme sexuel bien connu. Comme pour les mâles, nous avons évalué la réactivité de l'axe corticotrope à un stress aigu, ainsi que la réactivité émotionnelle. Nos résultats montrent que la CBG joue un rôle critique dans le dimorphisme sexuel de l'axe HPA mais aussi dans les différences liées au sexe des comportements de type dépressifs.

Enfin, nous avons choisi de placer nos souris dans un contexte mimant des conditions environnementales de vie occidentale, à savoir une situation de stress chronique modéré et imprévisible, associée à une alimentation riche en gras. Nous avons alors évalué le rôle de la CBG et l'impact de ce traitement sur la prise de poids et les conséquences sur la réactivité émotionnelle.

CHAPITRE 1 :

***Impact de la déficience en CBG sur la réactivité
de l'axe corticotrope et sur la réponse
comportementale émotionnelle face à un stress
aigu de valence modérée à intense.
Etude des mâles***

Chapitre 1 : Impact de la déficience en CBG en réponse au stress sur la réactivité de l'axe HPA et impact émotionnel, chez le mâle

I. Introduction

Les réponses adaptatives au stress sont essentielles à la survie. Elles impliquent l'activation en concert de différents systèmes biologiques centraux et périphériques tels que le système nerveux autonome, avec la libération d'adrénaline et de noradrénaline, et l'axe corticotrope, dont les produits finaux libérés par les corticosurrénales dans la circulation générale sont les glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme, corticostérone chez le rongeur de laboratoire). Les réponses adaptatives impliquent également la mise en place de réponses comportementales (*fight or flight*) permettant à l'individu d'agir directement sur son environnement. Ces ajustements physiologiques et comportementaux s'ajustent les uns aux autres afin de permettre à l'organisme de lui fournir l'énergie nécessaire pour lutter contre ce stress et de rétablir son homéostasie (McEwen and Wingfield, 2010). Cependant, des réponses physiologiques inadaptées, dans le sens d'une hyperactivité ou d'une hypoactivité des systèmes de stress notamment de la réponse des glucocorticoïdes au stress, peuvent conduire au développement de troubles affectifs et/ou cognitifs, de maladies psychiatriques (anxiété, dépression), ou encore une vulnérabilité face aux drogues d'abus (Chrousos, 2009).

Les individus ne sont pas égaux face au stress. Il existe en effet une très grande variabilité individuelle dans les réponses de stress, influencée par des facteurs environnementaux, génétiques ou encore épigénétiques (Feder et al., 2009; Mormede et al., 2011). Au laboratoire, des études de génétique inverse ont été menées afin de rechercher un ou plusieurs gènes impliqués dans la variabilité génétique de cette vulnérabilité au stress. Une recherche de QTL, étude conduite sans hypothèse de départ, a alors été menée dans une population de porc issue d'un croisement entre deux races ségrégeantes dans leurs réponses comportementales et endocriniennes au stress. C'est ainsi que l'équipe a mis en évidence que la variabilité des niveaux de glucocorticoïdes en réponse au stress implique pour 20%

un locus situé sur le chromosome 7 (Desautels et al., 2002). De manière intéressante, il a été observé que le gène codant pour la CBG se trouvait dans ce locus. Le gène de la CBG est alors devenu un très bon gène candidat fonctionnel de la variabilité génétique des réponses au stress. Les études qui ont suivies ont accumulées des résultats en faveur de l'implication du gène de la *Cbg* dans ce QTL de cortisolémie (Ousova et al., 2004; Guyonnet-Duperat et al., 2006). Cette liaison génétique faite à partir d'une analyse sans hypothèse de départ a également été montrée par une équipe indépendante et dans un autre modèle animal : le rat (Solberg et al., 2006).

Ainsi, ces résultats ont conduit l'équipe à **développer un modèle de souris déficiente spécifiquement pour le gène *Cbg* afin d'achever la démonstration de l'importance du gène *Cbg* dans la réponse glucocorticoïde au stress. Les objectifs étaient d'étudier l'influence de ce gène sur les régulations basales et après stress de l'axe corticotrope et sur les réponses comportementales émotionnelles.**

Cette première étude a débuté avant mon arrivée au laboratoire. En effet, le modèle souris d'inactivation totale de la *Cbg*, jamais réalisé à l'époque, a été développé dans le cadre de la thèse d'Elodie Richard (2006), dirigée par Marie-Pierre Moisan. Dans cette étude, mon travail a consisté à compléter les données déjà obtenues sur les réponses comportementales d'ordre émotionnel et les réponses biologiques face au stress sur les mâles de ce modèle de souris partiellement (*Cbg*^{+/-}) ou totalement (*Cbg*^{-/-}) déficientes en CBG.

II. Résumé des principaux résultats

1) Construction de la lignée knock-out *Cbg* :

Par recombinaison homologue dans des cellules souches, l'exon 2 du gène *Cbg* a été flanqué de 2 sites loxP. Ces souris ainsi « floxées » sont très intéressantes car elles permettent d'obtenir un k.o. total ou tissu spécifique du gène *Cbg*. Par croisements avec une souris CMV-Cre un k.o. total du gène *Cbg* a été obtenu et rétrocroisé sur plusieurs générations afin d'obtenir un fond génétique C57BL/6J homogène à 95%. Par croisements de mâles et de femelles *Cbg*^{+/-} entre elles, des

souris *Cbg*^{-/-} (déficience totale), *Cbg*^{+/-} (déficience partielle) et *Cbg*^{+/+} (animaux contrôles) de mêmes portées ont ainsi été obtenues et étudiées.

La déficience partielle (50%) ou totale de la *Cbg* a été confirmée par PCR quantitative en temps réel, réalisée à partir d'extraction d'ARN de foie, ainsi que par la mesure de la capacité maximale de liaison de la CBG (*B*_{max}) dans le plasma par technique de radio-liaison avec courbe de saturation. J'ai complété et renforcé ces résultats par western blot réalisé sur les protéines plasmatiques avec un anticorps anti-CBG de souris et par la mesure, par ultrafiltration, de la distribution plasmatique des fractions de corticostérone libre et liée soit à la CBG, soit à l'albumine. Nous observons ainsi que les souris de type sauvage *Cbg*^{+/+} ont une fraction de corticostérone plasmatique libre de ~9%, ~77% est liée à la CBG, protéine thermosensible majoritaire et enfin ~14% est liée à l'albumine. Les souris *Cbg*^{-/-}, quant à elles présentent une fraction libre de la corticostérone augmentée à ~27% et une fraction liée à l'albumine à ~45%. Enfin, nous trouvons une fraction de ~28% correspondant à la corticostérone certainement liées à d'autre protéines plasmatiques thermosensibles et aspécifiques de la corticostérone. Enfin, les souris hétérozygotes présentent des fractions intermédiaires.

2) *Impact de la déficience en CBG sur l'activité et la réactivité au stress de l'axe HPA :*

Des mesures des concentrations plasmatiques de corticostérone totale et libre ainsi que de l'ACTH ont été réalisées en situation basale ou après un stress de contrainte. En situation basale, nous observons que la déficience en CBG altère la concentration de corticostérone totale au pic circadien, le soir. Cette concentration diminuée de corticostérone totale n'est pas due à un défaut de sécrétion mais plutôt à une clairance de la corticostérone augmentée dans le plasma chez les souris mutantes. Pour autant, la concentration de corticostérone libre lors de ce pic est similaire entre les trois génotypes. Ceci s'explique par un phénomène de compensation entre une fraction de l'hormone libre élevée et une concentration de l'hormone totale faible chez les animaux *Cbg*^{-/-} par rapport aux *Cbg*^{+/+}, les *Cbg*^{+/-} étant intermédiaires. Comme la forme libre de l'hormone est la forme active, ce résultat témoigne d'un bon fonctionnement de l'axe corticotrope en situation basale

malgré une réserve plasmatique de corticostérone diminuée. En effet, les concentrations d'ACTH plasmatique sont similaires entre les trois génotypes. De plus, en accord avec la concentration de corticostérone libre inchangée, les souris déficientes en CBG ne montrent pas de phénotype particulier en condition basale.

C'est en situation de stress par contre, que la déficience en CBG a un impact fonctionnel. En effet, les niveaux de la corticostérone libre plasmatique après un stress de contrainte sont augmentés mais sont significativement plus bas chez les Cbg^{-/-} par rapport aux souris de type sauvage. La concentration d'ACTH a été mesurée dans ces mêmes conditions et montre une tendance ($p = 0.07$) à être plus élevée chez les souris Cbg^{-/-}.

Enfin, l'expression des gènes des récepteurs MR et GR a été mesurée dans l'hippocampe des souris Cbg^{+/+}, Cbg^{+/-} et Cbg^{-/-} en situation basale et après stress et dans les deux situations, les trois génotypes ne sont pas différents.

3) Réactivité comportementale au stress

Nous avons observé que les animaux des trois génotypes ne présentent pas de différence comportementale dans les tests évaluant le trait de type anxieux (open field, elevated plus maze). De même, l'activité locomotrice, évaluée dans des cages d'activité pendant 72H est similaire.

C'est dans le cadre de l'évaluation du phénotype émotionnel, et plus particulièrement du trait de type « dépressif » ou de résignation, que nous avons observé un impact important de la déficience en CBG. Les tests comportementaux utilisés dans cette étude sont le test de la résignation apprise ou *learned helplessness* et le test de la nage forcée ou *forced swim test* (j'ai participé à la mise en place de ce dernier test). Ces deux tests ont le point commun d'évaluer le comportement de l'animal dans un contexte de stress de type intense (chocs électriques imprévisibles pour le premier et nage forcée pour le second test). Nous observons dans ces deux tests bien différents que les comportements de résignation (évalués par le nombre d'évitement des chocs électriques dans le premier et le temps d'immobilité dans le deuxième) sont augmentés chez les animaux Cbg^{-/-} par rapport aux Cbg^{+/+} et, qu'encore une fois, les souris Cbg^{+/-} ont un comportement

intermédiaire. Une corrélation positive a d'ailleurs été trouvée entre le nombre d'évitement mesurés dans le test de la résignation apprise et la concentration de corticostérone libre en réponse au stress ($r = 0.43$; $p < 0.05$). De même, une corrélation négative a été trouvée entre le nombre d'immobilité mesurée dans le test de la nage forcée et la concentration de corticostérone libre ($r = -0.57$; $p < 0.05$). De plus, ce comportement de type « dépressif » ou de résignation, est associé à une expression diminuée du gène *Egr-1* (encore appelé Zif268) dans l'hippocampe des souris *Cbg*^{-/-} et *Cbg*^{+/-}, lequel gène a un rôle important dans la voie MAP kinase et dans les comportements influencés par les glucocorticoïdes.

Enfin, le défaut de tonus glucocorticoïde chez les souris déficientes en CBG est aussi révélé par une expérience de sensibilisation à la cocaïne, phénomène clairement décrit comme étant cortico-dépendant. Les souris *Cbg*^{+/-} montrent une faible sensibilisation et les souris *Cbg*^{-/-} ne sensibilisent pas du tout à des injections répétées de cocaïne.

III. Conclusion

En résumé, nous présentons dans cette étude un modèle original de souris déficiente pour le gène de la *Cbg*. Ce modèle nous a permis d'observer l'importance du rôle de la CBG en situation de stress.

En effet, nous avons observé qu'en situation basale au cours du cycle nyctéméral, les niveaux de corticostérone plasmatique totale sont effondrés chez les souris *Cbg*^{-/-}, notamment au pic circadien, par rapport aux souris de type sauvage, les animaux *Cbg*^{+/-} étant intermédiaires. Ceci suggère un rôle majeur de la CBG dans la constitution d'une réserve plasmatique et la biodisponibilité de la corticostérone. Cependant, les concentrations de corticostérone libre plasmatique sont similaires entre les trois génotypes de souris. Ainsi, comme la fraction libre est la forme active des glucocorticoïdes (Mendel, 1989), nous faisons la conclusion que, en situation basale, la déficience en CBG n'a pas d'impact fonctionnel sur l'activité de l'axe corticotrope.

C'est en situation de stress que la déficience en CBG est critique. En effet, la réponse à un stress intense nécessite une forte augmentation de corticostérone libre. Or, la déficience en CBG, partielle et surtout totale, conduit à un défaut de glucocorticoïdes (hypo-signaling) après stress, associé à des comportements de résignation ou de type « dépressif ». Cette réponse des glucocorticoïdes au stress est insuffisante pour permettre aux cibles de ces hormones, notamment aux centres supérieurs, d'initier la réponse comportementale optimale permettant une bonne adaptation à la situation stressante.

Cette étude a fait l'objet d'une publication présentée dans la partie V. de ce chapitre 1 (Richard et al., 2010).

IV. Résultats supplémentaires

Dans cette étude, les stress utilisés sont de type aigu. Or dans la nature le stress n'est pas un évènement isolé mais fait partie de notre quotidien. Ainsi **l'étude de notre modèle dans une situation de stress chronique** nous a semblé importante. Les résultats présentés ici ont été réalisés au cours de ma thèse mais ne font, pour le moment, pas l'objet d'un projet de publication. Cependant ils ont été présentés lors d'un congrès scientifique.

Nous avons ainsi voulu étudier la réponse comportementale d'ordre émotionnel et les réponses biologiques face à un stress chronique. Le protocole utilisé est inspiré des travaux d'Olivier Berton. Il s'agit de la **défaite sociale chronique**, éthologiquement validée comme un modèle de dépression et du syndrome de stress post traumatique (PTSD) et qui induit des altérations physiologiques et comportementales à long terme (Koolhaas et al., 1997; Berton et al., 2006; Krishnan and Nestler, 2008). Il a été observé que des souris exposées à des agressions répétées développent un évitement du contact social, des symptômes de type anxieux et de type dépressifs, réversibles par un traitement chronique aux antidépresseurs (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007). Le protocole de défaite sociale consiste à exposer pendant 10 jours une souris à un agresseur (plus gros), chaque jour différent. Ainsi l'animal en défaite sociale répétée ne peut pas s'habituer

à son agresseur ce qui entraîne, chaque jour à chaque rencontre, une plus forte libération de corticostérone (Keeney et al., 2001).

1) *Méthode*

Durant 10 jours consécutifs, deux groupes de mâles Cbg+/+ et Cbg-/- (~30g, 2 souris du même génotype par cage) ont été confrontés pendant 5 minutes à une souris agresseur de plus grosse taille (ancien mâle reproducteur CD1, ~50g, non manipulé par l'expérimentateur, en cage isolée pour augmenter son agressivité et hébergé dans un autre box d'élevage). C'est le **stress social**, où les souris Cbg+/+ et Cbg-/- sont attaquées dès leur entrée dans la cage de la souris CD1 (latence de la première attaque inférieure à 30 secondes) et tout le long des 5 minutes. Les souris Cbg+/+ et Cbg-/- qui ont ainsi subi les violentes attaques de leur agresseur restent, lors des trois heures qui suivent, dans la cage et le box d'élevage de leur agresseur du jour. Un séparateur transparent et percé de petits trous est placé dans cette cage afin de séparer physiquement les deux souris tout en laissant passer l'odeur et en gardant la vision de l'agresseur. Il s'agit de l'**interaction sensorielle**. Durant ces trois heures, l'eau et la nourriture sont retirées de la cage.

L'eau et la nourriture de deux autres groupes de souris Cbg+/+ et Cbg-/- ont été retirées de leur cage durant les 3 heures d'interaction sensorielle des souris du groupe stress. Ces souris servent de groupe contrôle et restent dans leur cage et dans leur box d'hébergement.

A l'issue des 10 jours de **défaite sociale**, les 4 groupes de souris vont être testés dans le test d'**interaction sociale**. Brièvement, ce test se passe en 2 parties et dure 10 minutes dans des conditions environnementales peu aversives (intensité de la lumière faible). Dans les cinq premières minutes, les souris sont placées au centre d'une plateforme (40cm x 40cm) recouverte de sciure provenant de leur propre cage et dans laquelle elles sont libres de se déplacer. Un cube transparent (10cm x 10cm x 10cm) est placé dans un coin de la plateforme (cette première configuration est notée « Pas de cible » dans la **Figure 18**). Après 5 minutes et pendant les 5 dernières minutes du test, une souris agresseur CD1, inconnue de la souris Cbg+/+ ou Cbg-/- testée, est ensuite placée à l'intérieur du cube transparent (noté « Cible

agresseur » dans la **Figure 18**). L'analyse de ce test est faite par le logiciel SMART (Panlab, Espagne), grâce à un système de suivi de vidéo (*videotracking*). Le temps passé dans la zone d'interaction (située autour de la cible) et dans la zone d'évitement (située à l'opposée de la cible) est mesuré. Il a été montré que le temps passé dans la zone d'interaction sociale diminue lorsqu'un individu a subi au préalable un protocole de stress social, et est utilisé comme un index du trait de type « dépressif » (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007). Trois jours après ce test, une autre évaluation de ce type de comportement est faite dans le test de la nage forcée. Le protocole est décrit dans la publication n°1 qui suit (Richard et al., 2010).

Enfin, le matin du jour 18 du protocole, les animaux ont été rapidement anesthésiés à l'isoflurane. Puis le sang a été prélevé par ponction cardiaque et récolté dans un tube contenant de l'EDTA 10% afin de récolter le plasma. Seule la corticostérone totale a été mesurée dans ces échantillons de plasma par RIA (protocole décrit dans la publication). Enfin, les souris ont été sacrifiées par décapitation. Le protocole expérimental est illustré **Figure 18**.

- **Animaux:** Souris **Cbg+/+** et **Cbg-/-** (mâles adultes). 2 par cage
- **Groupes:** contrôle et defeat
- n = 6 par groupe

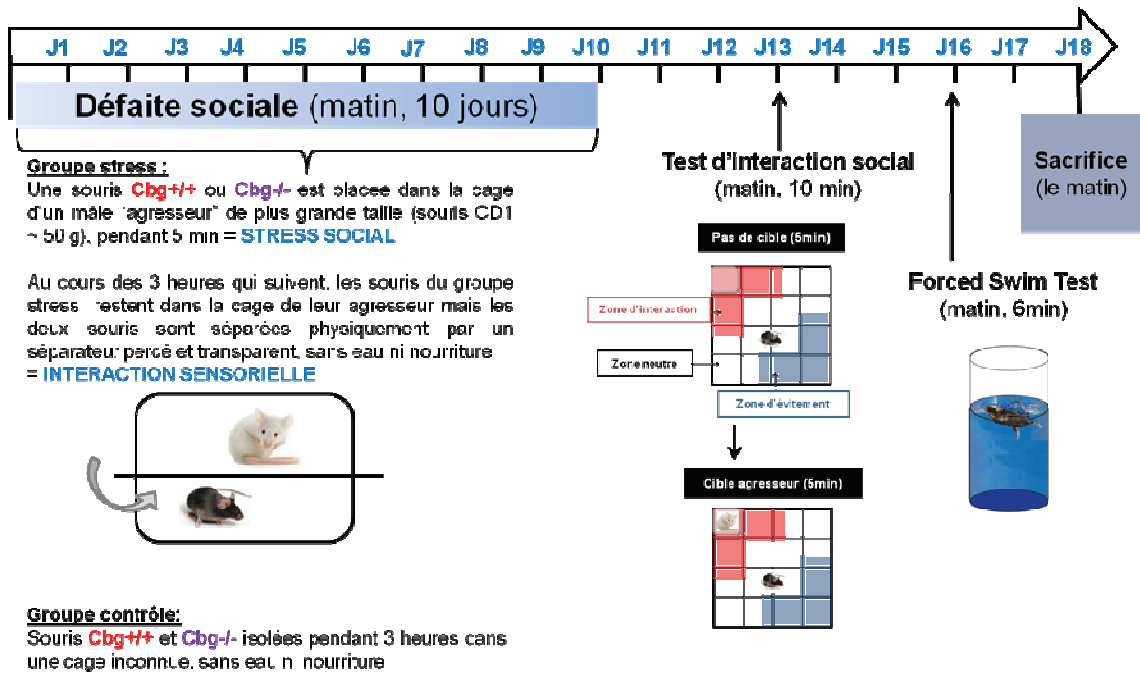


Figure 18 : Protocole expérimental du stress chronique de type défaite sociale et des tests comportementaux réalisés

2) Résultats

Les résultats comportementaux et de mesure de corticostérone totale plasmatique sont présentés **Figure 19**.

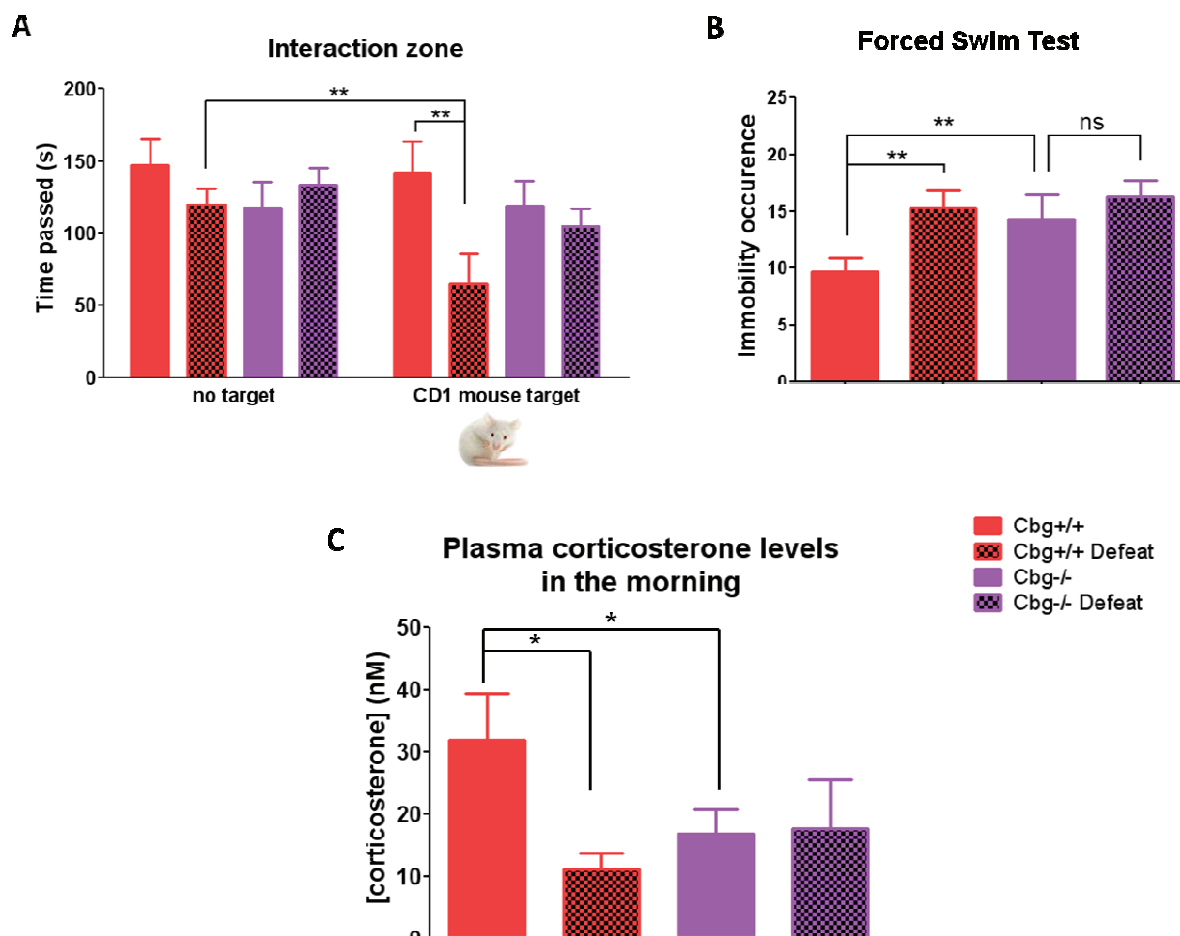


Figure 19 : Effets du stress chronique de défaite sociale sur les réponses comportementales mesurées dans le test d'interaction sociale (A) et de forced swim test (B) et concentration plasmatique de la corticostérone plasmatique totale, mesurée le matin, au repos (C).

La mesure du temps passé dans la zone d'interaction a été faite pour les 4 groupes de souris en présence ou non de l'agresseur (*no target vs. mouse CD1 target*). Par analyse statistique ANOVA à deux voies (effets génotype et stress), mesure répétée (pas d'agresseur / agresseur), nous observons un effet statistique du stress ($F_{(1;20)} = 17.7$; $p < 0.001$), un effet de l'agresseur ($F_{(1;20)} = 6.9$; $p = 0.02$), une interaction génotype x stress ($F_{(1;20)} = 7.1$; $p = 0.01$) et une interaction agresseur x stress ($F_{(1;20)} = 5.9$; $p = 0.02$). Les analyses post-test LSD de Fisher indiquent que le temps passé dans la zone d'interaction est significativement diminué par le stress social lorsque les souris Cbg+/+ sont en présence de l'agresseur (dans le groupe Cbg+/+ Defeat, $p < 0.01$ entre les situations pas d'agresseur et agresseur ; en présence de l'agresseur $p < 0.01$ entre les Cbg+/+ contrôle et Cbg+/+ Defeat). Ainsi, les mâles Cbg+/+ soumis au stress social « reconnaissent » la souche de souris

agresseur, puisqu'en leur présence le temps passé dans la zone d'interaction est significativement diminué pour les mâles Cbg+/+ Defeat. Ceci suggère que le stress chronique social a un effet sur les mâles Cbg+/+ : le comportement de type anxieux est augmenté (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007). Cependant, le comportement des mâles Cbg-/- n'est pas affecté par la présence de leur agresseur CD1. Ainsi le stress chronique social auquel ils ont été exposés n'a pas d'effet chez ces animaux.

L'analyse du test de la nage forcée par ANOVA à deux voies (génotype et stress) met en évidence un effet statistique du génotype ($F_{(1;18)} = 7.7$; $p < 0.01$), un effet du stress ($F_{(1;18)} = 6.1$; $p = 0.02$) et une interaction génotype x stress ($F_{(1;18)} = 4.4$; $p = 0.05$). Les analyses post-hocs indiquent, chez les mâles Cbg+/+, une augmentation significative du nombre d'immobilité par le protocole de stress chronique de défaite sociale ($p < 0.01$). Par contre, les souris Cbg-/- ne sont pas affectées par ce stress (Cbg-/- vs. Cbg-/- Defeat, $p = 0.81$). Cependant, leur comportement d'immobilité reste significativement plus important que les mâles Cbg+/+ en condition contrôle, comme observé dans la publication n°1 (Cbg+/+ vs. Cbg-/-, $p < 0.01$).

Enfin, l'analyse statistique ANOVA faite sur la mesure de corticostérone totale plasmatique mesurée en condition de repos et le matin, indique une interaction significative génotype x stress ($F_{(1;18)} = 4.7$; $p < 0.04$). En effet, alors que le stress chronique diminue la concentration plasmatique de l'hormone chez les Cbg+/+ ($p < 0.05$), ce traitement n'a pas d'effet chez les Cbg-/- ($p = 0.68$) qui présentent, comme observé précédemment, des niveaux faibles de l'hormone totale (Cbg+/+ vs. Cbg-/- $p < 0.05$). La mesure de corticostérone libre aurait été intéressante, cependant elle n'a pas pu être faite à ce jour.

3) Conclusion

Ces résultats supplémentaires confortent nos premières conclusions puisque nous retrouvons chez les souris Cbg-/- un niveau de corticostérone totale faible et un comportement de type dépressif endogène mesuré dans le test de la nage forcée. Cependant nous n'observons aucun effet du stress chronique chez ces animaux

mutants. En effet, alors que le comportement d'immobilité est augmenté par le stress chronique chez les Cbg^{+/+}, celui des Cbg^{-/-} n'est pas modifié par ce même stress et reste élevé.

De plus, nous confirmons que les souris Cbg^{+/+} sont affectées par le stress chronique de défaite sociale au niveau comportemental et physiologique. En effet, celles-ci semblent « reconnaître » leur agresseur, comme en témoigne la diminution du temps passé dans la zone d'interaction sociale. Cet effet s'accompagne d'une diminution des niveaux de corticostérone, phénomène classiquement observé après un stress chronique et souvent lié à une désensibilisation de la réponse de stress (Raison and Miller, 2003; Ulrich-Lai and Herman, 2009). Chez les mâles Cbg^{-/-}, l'absence d'effet du stress chronique sur les réponses comportementales et sur la mesure de corticostérone suggère fortement que ce modèle d'hyporéactivité au stress est insensible à l'effet de ce type de stress chronique.

Ainsi, nous présentons un modèle de souris original d'hyporéactivité au stress associé à une altération de la réponse comportementale au stress mesurée dans différents tests. Cette réponse comportementale au stress altérée peut être qualifiée de « *coping* passif » dans le cadre du stress aigu tel que la nage forcée et d'insensibilité dans le cas de la défaite sociale.

V. Publication n°1 :

***Plasma transcortin influences endocrine and
behavioral stress responses in mice***

Richard E.M.; Helbling J.C.; Tridon C.; Desmedt A.; Minni A.M.; Cador M.; Pourtau L.; Konsman J.P.; Mormede P.; Moisan M.P.

Endocrinology. 2010 Feb; 151(2):649-59

Plasma Transcortin Influences Endocrine and Behavioral Stress Responses in Mice

Elodie M. Richard, Jean-Christophe Helbling, Claudine Tridon, Aline Desmedt, Amandine M. Minni, Martine Cadot, Line Pourtau, Jan-Pieter Kopsman, Pierre Mommède, and Marie-Pierre Moisan

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (E.M.R., J.-C.H., C.T., A.M.M., L.P., P.M., M.-P.M.), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1286 PsyNuGen, and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (J.-P.K.), UMR 5226, Université de Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France; CNRS (A.D.), UMR 5228, Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives, Université Bordeaux I, F-33405 Talence, France; and CNRS (M.C.), UMR 5227 Psychobiologie des Désadaptations, Université de Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France

Glucocorticoids are released after hypothalamus-pituitary-adrenal axis stimulation by stress and act both in the periphery and in the brain to bring about adaptive responses that are essential for life. Dysregulation of the stress response can precipitate psychiatric diseases, in particular depression. Recent genetic studies have suggested that the glucocorticoid carrier transcortin, also called corticosteroid-binding globulin (CBG), may have an important role in stress response. We have investigated the effect of partial or total transcortin deficiency using transcortin knockout mice on hypothalamus-pituitary-adrenal axis functioning and regulation as well as on behaviors linked to anxiety and depression traits in animals. We show that CBG deficiency in mice results in markedly reduced total circulating corticosterone at rest and in response to stress. Interestingly, free corticosterone concentrations are normal at rest but present a reduced surge after stress in transcortin-deficient mice. No differences were detected between transcortin-deficient mice for anxiety-related traits. However, transcortin-deficient mice display increased immobility in the forced-swimming test and markedly enhanced learned helplessness after prolonged uncontrollable stress. The latter is associated with an approximately 30% decrease in circulating levels of free corticosterone as well as reduced Egr-1 mRNA expression in hippocampus in CBG-deficient mice. Additionally, transcortin-deficient mice show no sensitization to cocaine-induced locomotor responses, a well described corticosterone-dependent test. Thus, transcortin deficiency leads to insufficient glucocorticoid signaling and altered behavioral responses after stress. These findings uncover the critical role of plasma transcortin in providing an adequate endocrine and behavioral response to stress. (*Endocrinology* 151: 649–659, 2010)

Adaptive responses to stress are essential for life and involve activation of a complex repertoire of autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses, originating both from the brain and the periphery, that work in concert to reinstate homeostasis. If these adaptive systems are overactive or fail to respond appropriately, psychiatric diseases, such as affective disorders, cognitive impairment, or vulnerability to drug addiction, may develop in vulnerable individuals (1–4). Important individual differences are observed in the ability of an individual to cope

with stressful events. This variability depends on genetic, environmental (in particular during the perinatal period), and epigenetic factors (5, 6).

A major system involved in adaptive stress responses is the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis (3, 7). Under normal physiological conditions, glucocorticoid (cortisol in humans, corticosterone in laboratory rodents) secretion follows a circadian rhythm entrained by light and food intake that stimulate the secretion of the hypothalamic peptide corticotrophin-releasing hormone

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7120
Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/en.2009-0862 Received July 22, 2009. Accepted November 11, 2009.
First Published Online December 18, 2009

Abbreviations: Bmax, CBG maximal binding capacity; CBG, corticosteroid-binding globulin; CRH, corticotrophin-releasing hormone; GR, glucocorticoid receptor; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; MR, mineralocorticoid receptor.

(CRH), which, in turn, triggers pituitary secretion of ACTH that acts on adrenal glands to stimulate glucocorticoid release in the blood. In plasma, glucocorticoids bind with a high affinity but low capacity to transcortin, also called corticosteroid-binding globulin (CBG), and to albumin with a high capacity but low affinity. The free fraction of circulating glucocorticoids thus constitutes around 5% of the total glucocorticoid pool. Free glucocorticoids regulate negatively their own secretion by inhibiting CRH and ACTH release, and act on target tissues by binding to two nuclear receptors, the mineralocorticoid (MR) and the glucocorticoid receptors (GRs). Under stressful conditions, the rise in CRH levels results in transiently increased glucocorticoid secretion. The free fraction of circulating glucocorticoids is then more than proportionally increased because stress-induced glucocorticoid secretion overshoots transcortin binding capacity (8).

We have shown by genetic linkage analysis in pig models that the variability in stress-induced glucocorticoid levels depends strongly on a genomic locus containing the *Cbg* gene encoding transcortin (9). On further investigations, we have accumulated data favoring the hypothesis that *Cbg* gene polymorphism is indeed responsible for variability in stress-induced glucocorticoid levels in our pig models (10, 11). This genetic association between glucocorticoid stress levels and the genomic locus of *Cbg* gene has been replicated by an independent group in rat models (12). Thus, this set of data prompted us to create a rodent model of *Cbg* gene deficiency, in which *Cbg* gene expression is specifically modified, and to study, in more details than could be done in humans, its influence on HPA axis regulation and stress-induced behavioral responses. In this report, we present data showing the importance of CBG in defining glucocorticoid pool size as well as free glucocorticoid concentrations. Additionally, we show that these endocrinological alterations are associated with behavioral deficits.

Materials and Methods

Generation of *Cbg*-deficient mice

Cbg floxed mice were constructed at the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France). Exon 2 of the mouse *Serpina6* gene encoding CBG was flanked by loxP sites using homologous recombination in embryonic stem cells to obtain *Cbg* floxed mice. The *Cbg* floxed mice were then sent to our laboratory in Bordeaux and backcrossed with C57BL/6J mice from Charles River (L'Arbresle, France). For the inactivation of CBG in all cells, we crossed CMV-Cre transgenic mice (13) with *Cbg* floxed mice. *Cbg*^{+/+}, *Cbg*^{+/-}, and *Cbg*^{-/-} mice were obtained by breeding *Cbg*^{+/-} males and females. All mice used in the present work are males and have a C57BL/6J genetic background above 90%. Animals were maintained in an animal room (23°C) with a 12-h light-dark cycle (lights on at 0700 h) and with *ad libitum* access

to food and water. All the experiments were conducted in strict compliance with current European Conventions and approved by Institutional Committee. The numbers of animals tested in each experiment were dependent on the availability of female mice of approximately the same age for each genotype.

Neuroendocrinological experiments

Mice were housed individually for a week before the experiments.

Circadian experiments

Blood samples were collected by tail nick every 4 h. Time from first handling to completion of this procedure did not exceed 2 min to obtain basal levels of corticosterone and CBG. A preliminary experiment done on eight C57BL/6J male mice confirmed that this procedure allowed us to obtain basal levels because we got the same values as others who used different groups of animals at each time point. Blood was collected in EDTA solution (0.1% final concentration), and plasma, recovered after 10 min centrifugation of blood samples, was kept at -80°C. To measure free corticosterone, mice were anesthetized with a rapid isoflurane exposure (Aerane, Baxter SA, Maurepas, France) and blood collected by cardiac puncture in less than 20 sec either between 0900 h and 1000 h for morning concentrations or between 1900 h and 2000 h for evening concentrations.

Restraint stress

The animals were placed in a 50-ml conical tube (with holes allowing breathing) for 20 min, blood was collected by tail nick, and then the animals were returned to their home cage.

Behavioral experiments

All the tests were conducted between 0900 h and 1300 h. The same groups of mice, 3–5 months of age, were used successively for activity cages, elevated-plus-maze, and open field with at least 1-wk interval between tests. Naive 4-month-old male mice were used for learned helplessness and locomotor response to cocaine experiments. The learned helplessness test was replicated on a second independent group of 3–3.5 months of age with blood samples collected before, during (just before putting the animal in the shuttle box), and right after the test for corticosterone measurements. An independent group of naive 3-month-old mice was used for the forced-swimming tests.

Details of the tests procedures and materials are provided in the supplemental data published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>.

Corticosterone and ACTH measurements

Total corticosterone in plasma was measured with an in-house RIA using a highly specific antibody provided by H. Vaudry (University of Rouen, France). Cross reactivity with related compound such as cortisol was less than 3%. Intraassay and interassay variations were less than 10% and less than 15%, respectively. Plasma free corticosterone was estimated by isotopic dilution and plasma ultrafiltration as described (14) with some modifications detailed in supplemental data. The distribution of ³H corticosterone between the different serum components (CBG and albumin) was calculated from measurements of the percentage of nonprotein bound corticosterone in treated and heat-treated serum (60°C for 1 h) to eliminate CBG binding

activity) as described previously (15). Variations for the entire assay was of 13% in intraassays and less than 15% interassays. All animals from an experiment were measured in the same assay to avoid intersassay variation. ACTH levels were measured using a commercial kit (ACTH^{1–23}IRIA Kit, ref 24130; DiaSorin, Antony, France).

CBG binding capacity assay

CBG maximal binding capacity (B_{max}) was obtained by a saturation binding experiment as described (16) with some modifications detailed in supplemental data. Intraassay and interassay variations were less than 10% and less than 20%, respectively. All animals from an experiment were measured in the same assay to avoid intersassay variation.

Western blot analysis of serum CBG and albumin

A total of 5 µg of protein from mice plasma was subjected to 10% SDS-PAGE (Ready gel; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and electroblotted on a nitrocellulose membrane (Millipore, Molsheim, France). After 24 h of saturation at 4°C, membranes were incubated 1 h at room temperature with rabbit antimouse CBG antiserum diluted 1:1000 (gift from G. L. Hammond, University of British Columbia, Vancouver, Canada). After stripping of the bound CBG antiserum, the same membrane was incubated with rabbit antimouse albumin CLA3140 antiserum diluted 1:10 000 (Cedarlane, Ontario, Canada). Specific antibody-antigen complexes were identified using a horseradish peroxidase-labeled anti rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA) and ECL+ detection reagents (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Chemiluminescence was captured by a Syngene detection system and quantified by Gene Tools software (Syngene, Cambridge, UK).

Gene expression by real-time PCR

Gene expression was evaluated by real-time PCR from reverse-transcribed total RNA. Detailed procedure and sequence of primers used are provided in supplemental Materials and Methods (see also supplemental Table S1). Total RNA was extracted from mice killed at 1900 h at the beginning of the dark phase for basal levels and from mice killed at the end of the learned helplessness test for stress levels. Relative quantification of target mRNA levels, normalized with 18S, was calculated with the SDS2.1 software (PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

Statistics

Statistics were calculated with the software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA). Data are presented as mean ± SEM. One-way ANOVA with Tukey post-hoc test was used for gene expression, CBG binding capacity, total and free corticosterone. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test was used for circadian variation of corticosterone in plasma and for kinetics of stress reactivity. Corticosterone data were log-transformed before analysis, and repeated measures parameter was used when appropriate. Nonparametric Kruskal-Wallis test was used for behavioral tests except for cocaine sensitization analyzed by two-way genotype × day ANOVA of repeated measures followed by paired *t* test within genotype. On graphs, one symbol (* or #) indicates a *P* < 0.05, two symbols *P* < 0.01, and three symbols *P* < 0.001.

Results

Generation of transcortin-deficient mice

Cre/loxP system was used to obtain Cbg floxed mice that were bred with the previously described CMV-Cre transgenic mice (13) to obtain Cbg knockout animals. Cbg^{+/+}, Cbg^{+/-}, and Cbg^{-/-} mice were littermates obtained by breeding Cbg^{+/-} males and females. Successful knockout of CBG gene was confirmed by several experiments (Fig. 1). Quantitative real-time PCR showed no expression of Cbg gene in liver of Cbg^{-/-} mice and 50% of mRNA levels in Cbg^{+/-} compared with wild type (ANOVA *F* = 21.5, *P* < 0.0001) (Fig. 1A). This was confirmed by Western blot analysis on plasma of three animals of each genotype using a specific mouse CBG antiserum (Fig. 1B). Albumin was revealed on the same membrane using a specific mouse albumin antiserum. No quantitative differences were found between genotype for albumin levels. Finally, CBG maximal binding capacity was assessed in each genotype. In wild-type males, values were found close to those previously reported: 136 ± 49 vs. 144 ± 21 (nM) in Cole *et al.* (17) for example. As expected, maximal binding capacity was found to be markedly decreased in Cbg^{-/-} mice, and Cbg^{+/-} animals show intermediate levels between wild type and Cbg^{-/-} (ANOVA *F* = 33.6, *P* < 0.0001) (Fig. 1C). The distribution of corticosterone bound to either CBG or albumin was estimated as described (15), considering that albumin binding is resistant to a 60°C heating treatment of plasma, whereas CBG binding is inactivated at this temperature (Fig. 1D). The percentage of corticosterone bound to albumin as well as the free fraction rose dramatically in Cbg^{-/-} and very moderately in Cbg^{+/-} compared with Cbg^{+/+}. In Cbg^{-/-} mice, we found residual “CBG” binding (Fig. 1, C and D) that probably relates to unspecific binding to heat labile proteins in plasma.

HPA axis basal activity

The consequences of CBG deficiency on basal HPA activity were addressed by measuring total corticosterone during the diurnal cycle in animals fed *ad libitum* (Fig. 2A). By two-way analysis on log-transformed total corticosterone data, we found a genotype × time interaction not quite significant (*F*_{8,71} = 2.0, *P* = 0.06), a very significant genotype effect (*F*_{2,71} = 18.4, *P* < 0.0001) and time effect (*F*_{4,71} = 26.8, *P* = 0.0001). By using Bonferroni post-tests, no difference in total plasma corticosterone was detected between wild-type and heterozygous Cbg^{+/-} mice at any time. However, Cbg^{-/-} animals showed markedly reduced levels of plasma corticosterone at the end of the light and beginning of the dark phase compared with Cbg^{+/+} and Cbg^{+/-} (*P* < 0.01). Total and free corticosterone levels were estimated in the plasma of new groups of mice

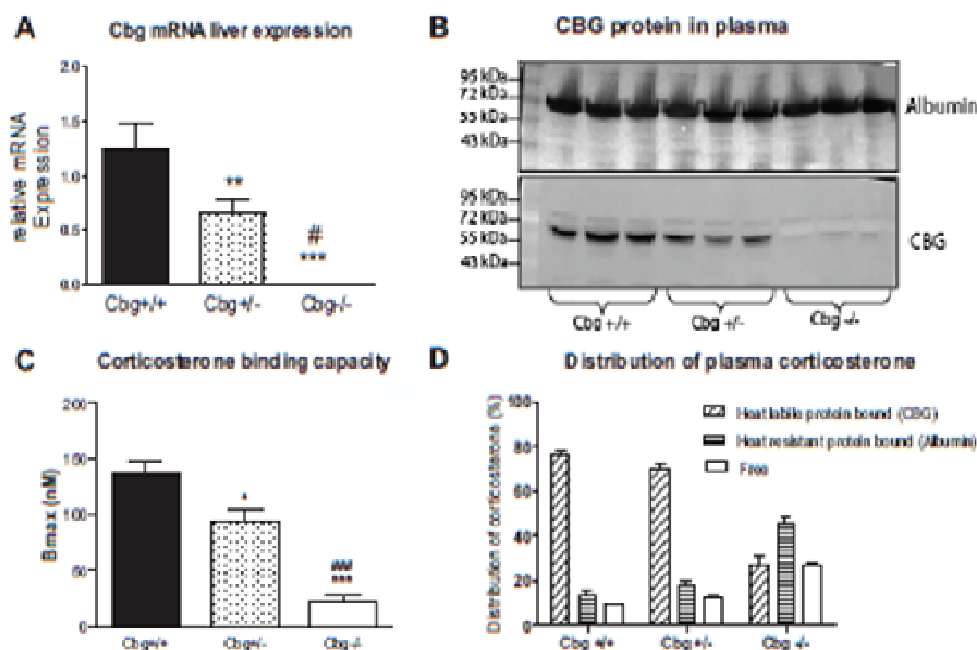


FIG. 1. Generation of mice deficient in transcortin. **A**, Cbga mRNA expression in liver of Cbga^{+/+}, Cbga^{+/-}, and Cbga^{-/-} mice measured by real-time PCR ($n = 6$ per group). **B**, Western blots on plasma from each genotype using mouse albumin and Cbga antisera. **C**, B_{max} to corticosterone estimated by saturation curve in plasma ($n = 6$ per genotype). **D**, Distribution of corticosterone binding in plasma estimated by isotopic dilution and ultrafiltration ($n = 6$ per genotype). Tukey post-hoc tests: *, P values of Cbga^{-/-} or Cbga^{+/-} vs. Cbga^{+/+}; #, P values of Cbga^{-/-} vs. Cbga^{+/-}. One symbol indicates a $P < 0.05$, two symbols $P < 0.01$, and three symbols $P < 0.001$.

killed either in the morning (0900 h) or in the evening at the beginning of the dark phase (1900 h). Total corticosterone levels were similar to those reported in Fig. 2A. The free fraction of corticosterone, measured by isotopic dilution and plasma ultrafiltration, was $7.1 \pm 0.4\%$ in Cbga^{+/+}, $8.7 \pm 0.8\%$ in Cbga^{+/-}, and $20.5 \pm 0.3\%$ in Cbga^{-/-} mice in the morning and $9.4 \pm 0.6\%$ in Cbga^{+/+}, $12.3 \pm 0.9\%$ in Cbga^{+/-}, and $26.0 \pm 1.3\%$ in Cbga^{-/-} in the evening. Morning concentrations of free corticosterone, derived from the free fraction and the total corticosterone concentrations, were significantly higher in Cbga^{-/-} compared with wildtype and Cbga^{+/-} (2.7 ± 0.1

nM vs. 1.1 ± 0.1 nM and 0.8 ± 0.1 nM, respectively, $F = 108.0$; $P < 0.0001$) as expected because there were no differences in total corticosterone levels. Conversely, in the evening, corresponding to the active phase of nocturnal animals such as mice, no variation in free corticosterone concentrations was detected between groups ($F = 0.15$, $P = 0.85$) (Fig. 2B). No significant differences were detected between groups for ACTH levels neither in the morning ($P = 0.09$) nor in the evening ($P = 0.70$) (Fig. 2C). The mRNA expression of some corticosteroid target genes [phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), tyrosine amino transferase (TAT), angiotensinogen, GR in liver]

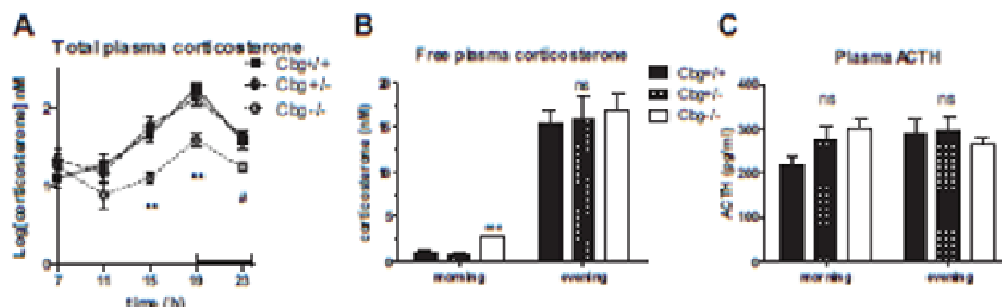


FIG. 2. Plasma corticosterone and ACTH levels at rest in transcortin-deficient mice. **A**, Total plasma corticosterone levels across the circadian cycle ($n = 5-7$ per group). Thicker line on x-axis indicates time when lights were off. **B**, Free plasma corticosterone levels in the morning ($n = 5-6$ per group) and in the evening ($n = 7-8$ per group) from mice of each genotype. **C**, Plasma ACTH levels ($n = 8-10$ per group). *, Post hoc P values of Cbga^{-/-} or Cbga^{+/-} vs. Cbga^{+/+}; #, P values of Cbga^{-/-} vs. Cbga^{+/-} only. One symbol indicates a $P < 0.05$, two symbols $P < 0.01$. ns, Not significant.

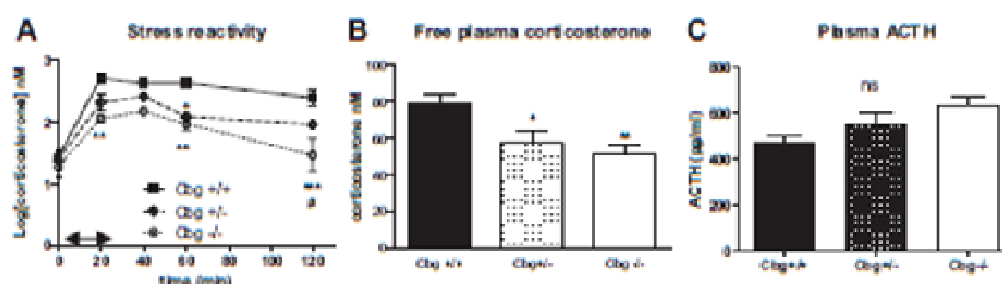


FIG. 3. Plasma corticosterone and ACTH levels after stress in transcortin-deficient mice. **A**, Total corticosterone levels at different time points ($n = 5$ per genotype and time point) after 20-min restraint stress. **B**, Free corticosterone levels after 20-min restraint stress ($n = 7-8$ per genotype). **C**, ACTH levels after stress ($n = 5-6$ per group). *, *Post hoc* P values of $Cbg^{-/-}$ or $Cbg^{+/-}$ vs. $Cbg^{+/+}$; #, P values of $Cbg^{-/-}$ vs. $Cbg^{+/-}$ only. One symbol indicates a $P < 0.05$, two symbols $P < 0.01$, and three symbols $P < 0.001$. ns, Not significant.

and/or genes involved in the HPA axis regulation [CRH receptor 1 (CRHR1), proopiomelanocortin (POMC), GR in pituitary; CRH, GR in hypothalamus, CRHR1, GR, MR in hippocampus] was estimated by real-time PCR in tissues dissected from animals killed in the evening (supplemental Table S2). No significant difference was found between genotypes for any genes in any tissues tested.

HPA axis reactivity to stress

After a 20-min restraint stress, there was no significant genotype \times time interaction by two-way ANOVA analysis on log-transformed data of total corticosterone values ($F_{8,55} = 1.6$; $P = 0.14$) (Fig. 3A). However, there were significant genotype ($F_{2,55} = 27.5$; $P < 0.0001$) and time ($F_{4,55} = 40.4$; $P < 0.0001$) effects. $Cbg^{-/-}$ and $Cbg^{+/-}$ mice showed altered levels of corticosterone response after stress with reduced peak levels compared with $Cbg^{+/+}$ (115.9 ± 15.6 nM in $Cbg^{-/-}$, 229.6 ± 54.6 nM in $Cbg^{+/-}$, and 508.7 ± 67.4 nM in $Cbg^{+/+}$ at $t = 20$ min). After 20-min stress, significant differences in free corticosterone levels were detected between genotypes: $Cbg^{+/+} = 78.4 \pm 5.5$ nM, $Cbg^{+/-} = 57.5 \pm 6.9$ nM, and $Cbg^{-/-} = 50.9 \pm 5.4$ nM (ANOVA, $F = 6.75$, $P = 0.006$, Fig. 3B).

Thus, free corticosterone levels increase after stress in all groups compared with basal levels ($\sim 15-18$ nM for each group at rest; Fig. 2) but to a lesser extent in transcortin-deficient mice. ACTH levels showed a tendency for higher levels in Cbg -deficient mice as expected although the difference was not significant ($P = 0.07$) between groups (Fig. 3C).

Behavioral reactivity to mild stress

To evaluate the impact of CBG deficiency on behavioral reactivity, groups of mice from each genotype were submitted to a battery of moderately stressful behavioral tests. $Cbg^{+/-}$ and $Cbg^{-/-}$ mice exhibited behaviors indistinguishable from their wild-type littermates in the activity cage and open field tests that provide measures of locomotion and exploration under moderate stress (Fig. 4 and supplemental Fig. S1). In addition, mice from all genotypes showed similar anxiety-related behaviors as measured in the time spent in the center of the open field (supplemental Fig. S1) and the time or frequency of entries in the open arms of the elevated-plus-maze test (supplemental Fig. S2).

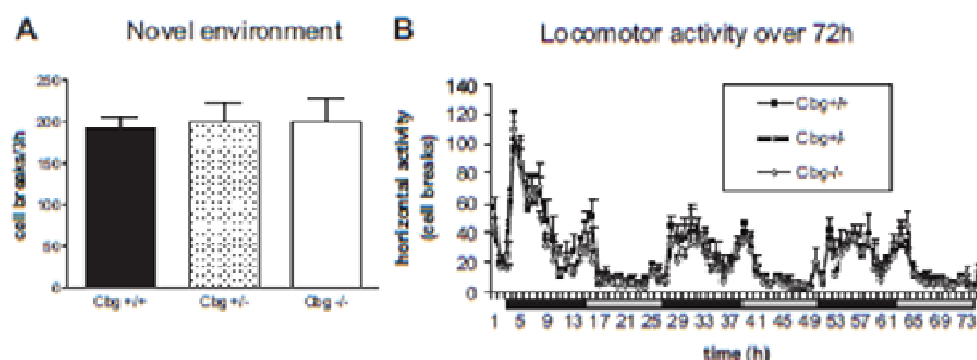


FIG. 4. Locomotor activity of transcortin-deficient mice. **A**, Locomotor activity in a novel environment was evaluated after the first exposure to activity cages during 3 h. **B**, Basal locomotor activity was measured during 3 d in activity cages after 3 h of habituation to the cages. $n = 10-12$ per group.

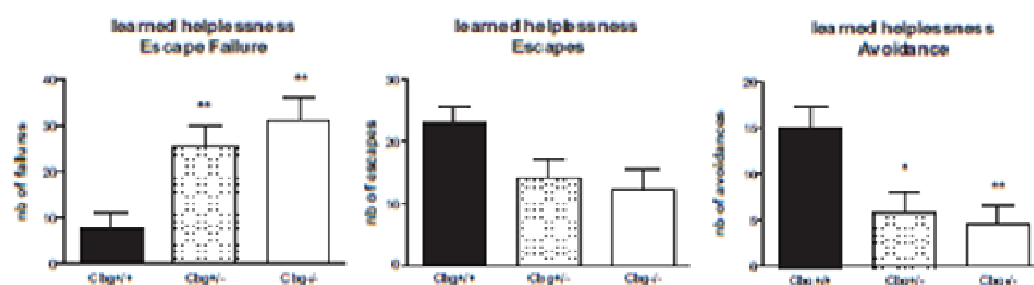


FIG. 5. Learned helplessness behavior in transcortin-deficient mice. Learned helplessness was evaluated in a shuttle box after exposure to two sessions of inescapable footshocks. The combined results of two independent groups are presented ($n = 15$ – 18 per genotype). *, Post hoc P values of Cbg+/- or Cbg-/- vs. Cbg+/+. One symbol indicates a $P < 0.05$, two symbols $P < 0.01$. nb, Number.

Depression-like behavior after intense and uncontrollable stress

We used the learned helplessness paradigm to evaluate despair-like behavior after an intense and uncontrollable stress. This paradigm is reported to show very good face validity and to have a good predictive validity for depressive states with both benzodiazepines and lithium being effective in reversing helplessness (18). After two sessions of unpredictable and uncontrollable footshocks performed on 2 consecutive days, learned helplessness behavior was assessed by the number of escape failures, escapes in reaction to the footshock, and avoidances in a shuttle box. The test was duplicated in two independent groups of mice and showed a similar pattern of responses. Thus, the data were combined for final analysis (Fig. 5). Compared with wild-type mice, Cbg mutant mice displayed a significantly increased number of escape failures (Kruskal-Wallis test, $P = 0.002$). In addition, there was a tendency for a lower number of escapes in reaction to the footshocks in both Cbg mutant mice ($P = 0.07$). Finally, the number of avoidances was significantly decreased in both Cbg+/- and Cbg-/- compared with wild types ($P = 0.0015$). On the second group of mice tested for learned helplessness, we have collected blood samples to evaluate corticosterone levels in the mice. Blood samples were collected by tail nick first just before the test for basal values, then the morning after the footshock sessions, *i.e.* just before the mice were submitted to the shuttle box, and finally by cardiac puncture at the end of the experiment when ani-

mals were killed. Free corticosterone and CBG were evaluated only at killing time because high plasma volume is required for the assays, and tissues were collected for gene expression analysis. The results are summarized in Table 1. Total corticosterone values before the test are in accordance with expected basal corticosterone morning levels. In the morning after the 2 d of footshocks, total corticosterone values were elevated in all groups. Just after the shuttle box test at the end of the whole experiment, total corticosterone levels were greatly elevated for all groups with lower levels for Cbg-deficient mice ($F = 31.3$, $P < 0.0001$) as expected from Fig. 3. The free fraction of corticosterone was greatly increased in Cbg+/+ and Cbg+/- but moderately in Cbg-/- animals compared with the values observed in unstressed animals. In terms of concentrations, free corticosterone was found significantly reduced in Cbg-deficient mice compared with wild type ($F = 3.5$, $P < 0.05$), 22% decrease for Cbg+/-, and 31% for Cbg-/. Additionally, we found a positive correlation between the number of avoidances observed in the learned helplessness test and the free corticosterone concentration ($r = 0.43$, $P < 0.05$; see supplemental Fig. S3). To evaluate whether this reduced free corticosterone in plasma translates into reduced glucocorticoid gene activation in the brain, we evaluated the expression of various genes in brain tissues of the mice dissected after the learned helplessness test (Table 1 and supplemental Fig. S3). Significant differences between genotypes were detected for Egr-1 mRNA in hippocampus with an approximately 40% decrease in transcortin-deficient mice compared with controls.

TABLE 1. Corticosterone, CBG during the learned helplessness test

	CBG+/+ $n = 7$	CBG+/- $n = 8$	CBG-/- $n = 9$	P (ANOVA)
Total [B] before LH test (d 1) (nm)	12.0 \pm 2.3	9.2 \pm 1.4	13.6 \pm 1.1	NS
Total [B] before LH shuttle test (d 2) (nm)	25.2 \pm 4.9	31.2 \pm 7.9	19.6 \pm 3.0	NS
Total [B] after LH test (d 3) (nm)	363.5 \pm 20.2	253 \pm 19.7	179.5 \pm 9.1	$P = 0.0001$
% free B after LH test (d 3)	19.9 \pm 0.7	22.2 \pm 3.3	27.5 \pm 2.0	$P = 0.09$
Free [B] after LH test (d 3) (nm)	72.0 \pm 3.6	55.6 \pm 8.5	49.7 \pm 4.6	$P = 0.03$
CBG Bmax after LH test (d 3) (nm)	133.8 \pm 9.1	91.5 \pm 15.4	36.7 \pm 2.3	$P = 0.004$
Egr-1 mRNA expression in hippocampus (relative mRNA abundance)	1.21 \pm 0.16	1.06 \pm 0.13	0.73 \pm 0.11	$P = 0.04$

LH, Learned helplessness; NS, not significant.

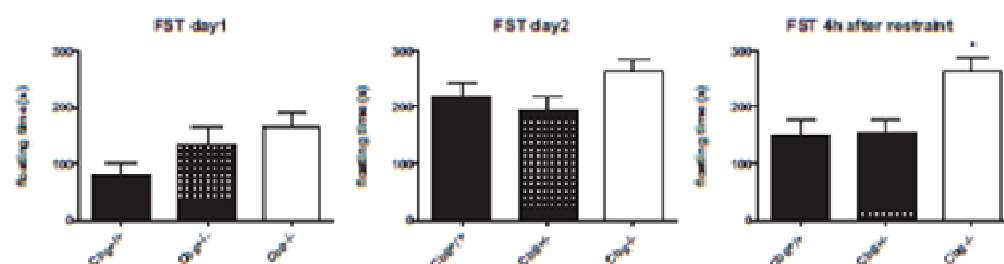


FIG. 6. Passive coping behavior of translocator-deficient mice in the Porsolt forced-swimming test. Floating behavior was evaluated for 6 min in 25°C water ($n = 7$ –10 per genotype) on two consecutive days and on d 4 after exposure to restraint stress. *, Post hoc P values of Cbg^{-/-} vs. Cbg^{+/-} +. One symbol indicates a $P < 0.05$. FST, Forced swimming test.

To evaluate the helplessness behavior in a different paradigm, we have submitted new groups of mice to the forced-swimming test (Fig. 6). On the first day of test, there was no significant difference between groups by Kruskal-Wallis test, although a clear tendency for increased immobility of the Cbg^{-/-} mice is observed. This nonsignificant result can be explained by a great dispersion of Cbg^{+/-} mice scores as Cbg^{-/-} immobility time is significantly different from Cbg^{+/+} by t test ($P < 0.05$). The second day of test, Cbg^{+/+} and Cbg^{+/-} mice increased their levels of immobility to reach those of the Cbg^{-/-} mice. Forty-eight hours later, all mice were submitted to a 1-h restraint stress, then left undisturbed for 3 h before submitting them to the forced-swimming test. This procedure had been used by others (19) to stimulate the CRF system before the behavioral test. In these conditions, a significant effect of genotype was found by Kruskal-Wallis test ($P = 0.02$), both the Cbg^{+/+} and Cbg^{+/-} showed an active behavior with decreased immobility time, whereas the Cbg^{-/-} remained with high levels of immobility time.

Cocaine-induced sensitization

Locomotor response to cocaine-induced sensitization is a phenomenon known to be corticosterone-dependent in

rodents (4). Because our previous results suggested that CBG deficiency induces a glucocorticoid hyposignaling after stimulation of the HPA axis, we thought that cocaine-induced sensitization would be a good functional test of glucocorticoid signaling efficiency in the translocator-deficient mice. To evaluate the role of CBG levels on cocaine sensitization, the locomotor response of mice after administration of saline or cocaine ip was measured in activity cages. Acute 20 mg/kg of cocaine administration produced a significant increase in locomotion in all groups with no difference between genotypes (Fig. 7A). However, sensitization to cocaine revealed differences between groups (two-way ANOVA, genotype \times day interaction: $F_{1,12} = 7.7$, $P = 0.017$). After repeated administration of 20 mg/kg of cocaine over 5 d, locomotion increased progressively in wild-type and Cbg^{+/-} mice, and a challenge given on d 14 produced a significant increase in locomotor activity in wild-type and a moderate rise in Cbg^{+/-} animals (paired t test d 14 vs. d 1 within a genotype, $P = 0.005$ and $P = 0.038$, respectively). However, this sensitization to cocaine in terms of locomotor response was found totally suppressed in Cbg^{-/-} mice ($P = 0.51$) (Fig. 7B).

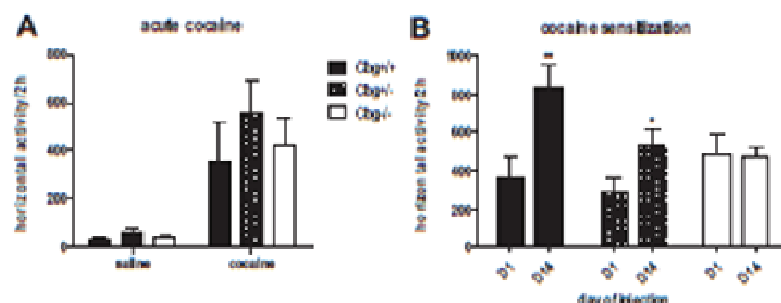


FIG. 7. Locomotor response to cocaine administration in translocator-deficient mice. A, Locomotor response to a single 20 mg/kg injection of cocaine was evaluated in activity cages for 2 h in mice of each genotype ($n = 6$ –7 per group). B, Sensitization of locomotor response to cocaine was evaluated in mice of each genotype after repeated injections for 5 d of 20 mg/kg of cocaine and a challenge with the same dose at d 14 ($n = 6$ –9 per group). *, t test P values comparing d 14 to d 1 within a genotype. One symbol indicates a $P < 0.05$.

Discussion

In the present work, we produced a model of genetic translocator variability with animals displaying 100, 50, or 0% of liver Cbg mRNA and plasma CBG protein. Our exploration of the HPA axis regulation under basal conditions showed data similar to those obtained in the few human patients described with heterozygous or homozygous null mutation in the Serpina 6 gene encoding translocator. Indeed, both in mice and human, absence of CBG leads to markedly decreased total glucocorticoid levels across the circadian cycle, elevated free

fraction of glucocorticoids (~20–30%), elevated albumin bound fraction (~40%), and no apparent change in free glucocorticoid peak concentrations (*i.e.* morning in human and evening in mice) (20, 21). For mutant mice with only one Cbg-deficient allele like in human patients with 50% CBG levels, the free fraction of corticosterone is slightly increased (12.3 vs. 9.4% in Cbg+/+), but total glucocorticoid levels are comparable to controls in resting conditions. This absence of effect may be explained by the fact that CBG levels are in excess in resting conditions [68% of CBG is reported to circulate unbound in many species (8)]; thus, a 50% deficiency in CBG is still enough for normal basal glucocorticoid binding. As in human CBG-deficient patients, basal HPA axis regulation was not impaired in any mice groups. Indeed, free corticosterone levels at the beginning of the active phase were similar across genotypes. Second, no significant differences were found in the expression of glucocorticoid target genes or in genes involved in the regulation of the HPA axis in resting conditions. Third, the pattern of secretion of corticosterone over the circadian cycle was similar between genotypes. Thus, these data confirm that the basal corticosterone tone and the regulation of the HPA axis are driven by free and not total corticosterone. Contrary to interpretations by others, we therefore believe that Cbg^{-/-} mice are a good model for the human condition of CBG deficiency (22). In their study of another mouse model of transcortin deficiency, Petersen *et al.* (23) defend the idea that their CBG knockout mice are unable to “sense” appropriately free corticosterone levels, based on their observation of elevated free corticosterone concentrations in Cbg^{-/-} mice together with elevated ACTH levels. However, we have several concerns from the measures done in this study: blood was collected only in the morning, *i.e.* at the nadir of the circadian peak of corticosterone; the total corticosterone and ACTH values presented correspond to stress levels, and the free fractions of corticosterone are very low (~0.7% for Cbg+/+ and ~1.5% for Cbg^{-/-}). In our hands, ACTH levels are on the high end compared with previous work that found concentrations around 100 pg/ml at rest in the morning, but we found no statistical difference between genotypes. Furthermore, we did not find differences between genotypes in CRH mRNA expression in hypothalamus.

After stress, the CBG-deficient mice showed a pattern of corticosterone secretion similar to the wild-type controls, *i.e.* a marked increase of total corticosterone levels followed by a progressive return to basal levels. However, the elevation of total corticosterone levels in CBG-deficient mice is moderate for Cbg^{+/-} and weak for Cbg^{-/-} compared with Cbg+/+. In these stress conditions, CBG levels are saturated with corticosterone binding and in a

quicker way in Cbg^{+/-} than Cbg+/+, explaining the difference in total corticosterone values. Furthermore, again in contrast to rest levels, the greater free fraction of corticosterone in transcortin-deficient mice does not compensate the smaller corticosterone rise after the 20-min stress. Consequently, free corticosterone levels are subnormal in the mutant mice. These results indicate the important role of CBG in determining glucocorticoid pool size (*i.e.* the mass of cortisol/corticosterone circulating) and are in agreement with previous data obtained in human subjects where CBG was shown to influence cortisol half-life, pool size, and volume distribution (24). Precise evaluation of corticosterone clearance is difficult to assess in small animals such as mice because it is very rapid. In their study, Petersen *et al.* (23) found that 5 min after injection of tritiated corticosterone, there was 10% left of the radioactive steroid in the plasma of Cbg+/+ vs. 2.5% in Cbg^{-/-}, suggesting a 4-fold higher clearance in mutant mice. This higher clearance may explain our finding of similar kinetics of plasma corticosterone after stress despite subnormal free corticosterone concentrations in transcortin-deficient mice.

These results of altered rise in free corticosterone after stress in our Cbg-deficient mice prompted us to evaluate its possible impact on behavior in Cbg-deficient mice. Our behavioral data show that in situations of low or moderate stress Cbg^{-/-}, Cbg^{+/-}, and Cbg+/+ mice are indistinguishable with respect to exploration and anxiety-related traits. Petersen *et al.* (23) found diminished activity scores in Cbg^{-/-} mice that they attribute to fatigue syndrome. It may be that they did their measures in the habituation phase and/or in more stressful conditions. Our results on 72 h of activity recording do not support the hypothesis of increased fatigue in our mutant mice, and anyway, we believe that fatigue syndrome cannot be recapitulated simply by a measure of locomotor activity. Similar observations of equivalent exploration and anxiety were made in mice with altered levels of GRs. Indeed, GR^{+/-} mice showing 50% reduction in GR expression and YGR mice that have twice the amount of GR compared with wild-type animals, all display equivalent behavior in basal- or mild-stress situations (25). In addition, no differences in general activity or time spent in the center of the open field were observed in mice models with brain-specific GR or MR genetic manipulation (knockout or overexpression) (26–29). Collectively, these data suggest that variation in glucocorticoid signaling has no or little impact on exploratory and anxiety-related behaviors after a mild stress.

However, in paradigms of intense and uncontrollable stress, transcortin-deficient mice displayed clear altered behavior compared with wild-type mice. First, transcortin-deficient mice showed markedly increased learned

helplessness with a higher number of escape failures and decreased number of avoided footshocks. Furthermore, we demonstrated that these behavioral responses are associated with decreased levels of free corticosterone in Cbg-deficient mice in plasma and decreased expression of Egr-1 gene in hippocampus. Recently, Egr-1 was shown to mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids in hippocampus (30). Its decreased expression is in accordance with reduced glucocorticoid signaling in the brain of our mutant mice, because the rapid (within 30 min) modification in Egr-1 expression is strictly regulated by glucocorticoid levels in brain independently from MAPK pathway signaling (30). There was no difference in the expression of the other genes tested. Because we killed the animals just after the test, it is not surprising that only immediate early genes such as Egr-1 were found affected. Basal levels of total corticosterone were altered in each group on d 2, showing that the mice had not recovered a normal HPA tone after 24 h. Whether CBG levels were suppressed in Cbg^{+/+} and Cbg^{+/-} 24 h after the footshocks as reported in rat (31) could not be assessed because the blood volume collected at the tail of the animals was not sufficient.

Overall, our data are in good agreement with the literature, because low glucocorticoid levels have been associated with increased learned helplessness in rats. Indeed, both adrenalectomy and treatment with the glucocorticoid antagonist RU38486 enhance the development of learned helplessness in Sprague Dawley rats, an effect that is reversed by corticosterone (32). Additionally, the congenital learned helplessness rat, genetically selected for susceptibility to learned helplessness behavior, has basal corticosterone levels similar to control animals, but exhibits corticosterone hyporesponsiveness to major stressors, similarly to our Cbg^{+/-} mice (33). Finally, the GR^{+/-} mice show increased learned helplessness, no differences in basal and slightly higher corticosterone levels after stress (25). The latter finding is not contradictory with our data because elevated corticosterone levels will not be effective in the brain of GR^{+/-} mice. This higher despair-like behavior found in Cbg-deficient mice was confirmed in the forced-swimming test where Cbg^{-/-} in particular showed a higher immobility time compared with Cbg^{+/+}, especially if 1-h restraint is performed before the forced-swimming test. Second, our results on cocaine sensitization are in accordance with decreased brain glucocorticoid signaling in transcortin-deficient mice. Indeed, we found that sensitization of the locomotor response to cocaine is clearly suppressed in Cbg^{-/-} mice and only a moderate sensitization is seen in Cbg^{+/-} mice. Glucocorticoid facilitation of drug sensitization is a phenomenon described 20 yr ago in rats. Adrenalectomy

resulting in depletion of glucocorticoids was shown to suppress amphetamine sensitization in rat but can be restored by dexamethasone replacement (34). More recently, cocaine sensitization was found suppressed in mice deleted for brain GR (35) and increased in mice overexpressing the GR in the central nervous system (28).

Therefore, our endocrine as well as behavioral results all converge to the finding of decreased glucocorticoid levels and signaling in Cbg-deficient mice after strong stress. Overall, our data are not contradictory with the findings reported in the study of Petersen *et al.* (23). The main difference between the two studies is the free glucocorticoid response after stress that we found reduced, whereas Petersen *et al.* (23) found it increased or equivalent compared with wild-type animals. Therefore, we conclude that Cbg deficiency leads to an insufficient glucocorticoid response to stress but normal resting levels, whereas Petersen *et al.* (23) believe that transcortin deficiency results in increased ACTH activity and hyporesponsiveness to glucocorticoids even in resting conditions. We cannot rule out that the apparent discrepancy in free corticosterone levels stem from the models themselves, for example the influence of the genetic background, but we favor the idea of methodological differences. To our benefit, our results fit better to the human condition of transcortin deficiency than Petersen *et al.* (23) data.

Both hypercortisolemia and hypocortisolemia have been reported to be associated with depressive states in human subjects (36–38). The hypocortisolism usually resulting from exhaustion of the HPA axis as a result of chronic stress is often associated with depression in fibromyalgia, burnout, and chronic fatigue syndromes (1, 39). Down-regulation of the HPA axis is also reported in atypical depression linked with fatigue and hyperphagia leading to increased body mass index (38). The increased learned helplessness associated with low corticosterone levels observed in our deficient mice is congruent with these depression subtypes. The role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders has been reviewed recently (40). According to the authors, both hypocortisolism and decreased glucocorticoids responsiveness are found associated with stress-related pathologies. As predicted by these authors, alteration in binding protein such as transcortin may lead to hypocortisolism and to decreased glucocorticoids signaling that will then influence the development of stress-related disorders. Thus, the data obtained on our transcortin-deficient mice fit with this hypothesis. Interestingly, most of the patients genetically deficient in CBG display a depressed mood, fatigue, and have a high body mass index (20, 21, 22). Such severe CBG mutations are rare, but variations in plasma transcortin levels are very frequent in

human (41) and animal populations (11, 42). This variability may be genetic or secondary to intake of estrogen-containing contraceptives stimulating CBG production, or due to variations in insulin or IL-6 levels that inhibit transcortin (43–45).

In conclusion, we show that partial or total deficiency of plasma transcortin in mice does not affect the HPA axis functioning in resting conditions but leads to glucocorticoid hyposignaling after an intense stress and increased depression-like behaviors. The putative role of corticosterone-CBG complexes on membrane receptors proposed by some authors (46, 47) has not been studied and therefore cannot be excluded. Thus, transcortin plays a subtle but critical role in endocrine and behavioral stress responses that may explain the vulnerability to fatigue and depressive symptoms in transcortin-deficient patients. For more information, see the supplemental data published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>.

Acknowledgments

We thank Dr. H. Vaudry (University of Rouen, France) for providing the anticorticosterone antibody, Prof. G. L. Hammond (University of British Columbia, Vancouver, Canada) for the gift of mouse CBG antiserum, A. Fayoux for her technical help, and A. Fouey, J. B. Corcuff, P. Barar, and Geoff Hammond for helpful discussions. Real-time PCR experiments presented in the present publication were performed at the Genotyping and Sequencing facility of Bordeaux.

Address all correspondence and requests for reprints to: Marie-Pierre Moisan, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche 1286 PyNuGen, Centre National de la Recherche Scientifique 5226, Université de Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France. E-mail: mpmoisan@bordeaux.inra.fr.

A.M.M. is the recipient of a PhD grant cofunded by the Conseil Régional d'Aquitaine (20081301032) and INRA Animal Genetics department. The genotyping and sequencing facility is supported by Conseil Régional d'Aquitaine Grants 20030304002FA and 20040305003FA and by the European Union Grant FEDER 2003227.

Disclosure Summary: E.R., J.-C.H., C.T., A.D., A.M.M., M.C., L.P., J.-P.K. have nothing to declare. P.M. and M.-P.M. are inventors of French patent no. FR2831890 (A1).

References

- McEwen BS 1998 Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann NY Acad Sci* 840:33–44
- Chrousos GP 1998 Stress as a medical and scientific idea and its implications. *Adv Pharmacol* 42:552–556
- de Kloet ER 2003 Hormones, brain and stress. *Endocr Regul* 37:51–68
- Piazza PV, Le Moal M 1998 The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* 19:67–74
- Momède P, Courvoisier H, Ramos A, Marissal-Arvy N, Ousova O, Désautés C, Ducks M, Chaouloff F, Moisan MP 2002 Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology* 27:563–583
- Colvis CM, Pollock JD, Goodman RH, Impey S, Dunn J, Mandel G, Champagne FA, Mayford M, Korzus E, Kumar A, Renthal W, Theobald DE, Nestler EJ 2005 Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J Neurosci* 25:10379–10389
- Dallman MF, Pecoraro NC, La Fleur SE, Wame JP, Ginsberg AB, Akana SF, Laugero KC, Houshyar H, Strack AM, Bhatnagar S, Bell ME 2006 Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. *Prog Brain Res* 153:75–105
- Gayraud V, Alsinerie M, Tourain PL 1996 Inter species variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domest Anim Endocrinol* 13:35–45
- Désautés C, Bidanel JP, Milan D, Iannacelli N, Amigues Y, Bourgeois F, Caritez JC, Renard C, Chevalet C, Momède P 2002 Genetic linkage mapping of quantitative trait loci for behavioral and neuroendocrine stress response traits in pigs. *J Anim Sci* 80:2276–2285
- Ousova O, Guyonnet-Dupérat V, Iannacelli N, Bidanel JP, Milan D, Genet C, Llanas B, Yerle M, Gellin J, Chardon P, Emptoz-Bonneton A, Pugeat M, Momède P, Moisan MP 2004 Corticosteroid binding globulin: a new target for cortisol-driven obesity. *Mol Endocrinol* 18:1687–1696
- Guyonnet-Dupérat V, Gevenink N, Plustow GS, Evans G, Ousova O, Croisnière C, Foury A, Richard E, Momède P, Moisan MP 2006 Functional implication of an Arg307Gly substitution in corticosteroid-binding globulin, a candidate gene for a quantitative trait locus associated with cortisol variability and obesity in pig. *Genetics* 173:2143–2149
- Solberg LC, Baum AE, Ahmad yeh N, Shimomura K, Li R, Turek FW, Takahashi JS, Churchill GA, Redei EE 2006 Genetic analysis of the stress-responsive adrenocortical axis. *Physiol Genomics* 27:362–369
- Dupé V, Duvenne M, Brocard J, Dollé P, Mark M, Dierich A, Chambon P, Rühl FM 1997 In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124:399–410
- D'Elia M, Patenaude J, Hamelin C, Garrel DR, Bernier J 2005 Corticosterone binding globulin regulation and thymus changes after thermal injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E852–E860
- Hammond GL, Lähdesmäki PL, Lähdesmäki P, Luukkainen T 1982 Distribution and percentages of non-protein bound contraceptive steroids in human serum. *J Steroid Biochem* 17:375–380
- Hammond GL, Lähdesmäki PL 1983 A versatile method for the determination of serum cortisol binding globulin and sex hormone binding globulin binding capacities. *Clin Chim Acta* 132:101–110
- Cole TJ, Harris HJ, Hoang I, Solomon N, Smith R, Krozowski Z, Fullerton MJ 1999 The glucocorticoid receptor is essential for maintaining basal and dexamethasone-induced repression of the murine corticosteroid-binding globulin gene. *Mol Cell Endocrinol* 154:29–36
- Henn FA, Vollmayr B 2005 Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci Biobehav Rev* 29:799–804
- Lu A, Steiner MA, Whittle N, Vogl AM, Walser SM, Ableimer M, Refojo D, Ecker M, Ribenstein JL, Stalla GK, Singewald N, Holboer F, Wozjak CT, Wurst W, Deussing JM 2008 Conditional CRH overexpressing mice: an animal model for stress-related pathologies and treatments that target the central CRH system. *Mol Psychiatry* 13:989
- Emptoz-Bonneton A, Cousin P, Seguchi K, Avvakumov GV, Bully C, Hammond GL, Pugeat M 2000 Novel human corticosteroid-binding globulin variant with low cortisol-binding affinity. *J Clin Endocrinol Metab* 85:361–367
- Torpy DJ, Bachmann AW, Grice JE, Fitzgemi SP, Phillips PJ, Whirworth JA, Jackson RV 2001 Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3692–3700

22. Torpy DJ, Ho JT 2007 Corticosteroid-binding globulin gene polymorphisms: clinical implications and links to idiopathic chronic fatigue disorders. *Clin Endocrinol* 67:161–167
23. Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, Bräsen JH, Schulz H, Gross V, Gröne HJ, Nykjaer A, Willnow TE 2006 Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin. *Mol Cell Biol* 26:7236–7245
24. Bright GM 1995 Corticosteroid-binding globulin influences kinetic parameters of plasma cortisol transport and clearance. *J Clin Endocrinol Metab* 80:770–775
25. Rüdler S, Chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hörtnagl H, Flor H, Henna FA, Schütz G, Gass P 2005 Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci* 25:6243–6250
26. Boyle MP, Kolber BJ, Vogt SK, Worniak DF, Muglia LJ 2006 Forebrain glucocorticoid receptors modulate anxiety-associated locomotor activation and adrenal responsiveness. *J Neurosci* 26:1971–1978
27. Berger S, Wolfer DP, Selbach O, Altar H, Erdmann G, Reichardt HM, Chepkova AN, Wold H, Haas HL, Jipp HP, Schütz G 2006 Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:195–200
28. Wei Q, Lu XY, Liu L, Schafer G, Shi ds KR, Burke S, Robinson TE, Watson SJ, Seasholtz AF, Akil H 2004 Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: a mouse model of increased emotional lability. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11851–11856
29. Rozebon AM, Akil H, Seasholtz AF 2007 Mineralocorticoid receptor overexpression in forebrain decreases anxiety-like behavior and alters the stress response in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4688–4693
30. Revest JM, Di Biasi F, Kitchener P, Rougé-Pont F, Desmedt A, Tuiault M, Tronche F, Piazza PV 2005 The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. *Nat Neurosci* 8:664–672
31. Heshner M, Daik T, Spencer RL, Laudenslager ML, Watkins LR, Maier SF 1995 A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stress or exposure. *Endocrinology* 136:5336–5342
32. Greenberg L, Edwards E, Henna FA 1989 Dexamethasone suppression test in helpless rats. *Biol Psychiatry* 26:530–532
33. King JA, Abend S, Edwards E 2001 Genetic predisposition and the development of posttraumatic stress disorder in an animal model. *Biol Psychiatry* 50:231–237
34. Rivet JM, Simeus L, LeMoal M, Mormède P 1989 Behavioral sensitization to amphetamine is dependent on corticosteroid receptor activation. *Brain Res* 498:149–153
35. Deroche-Gamonet V, Sillaber I, Aouizerate B, Izawa R, Jaber M, Glozinski S, Kelendonk C, Le Moal M, Spanagel R, Schütz G, Tronche F, Piazza PV 2003 The glucocorticoid receptor as a potential target to reduce cocaine abuse. *J Neurosci* 23:4785–4790
36. Heim C, Ehlert U, Hellhammer DH 2000 The potential role of hypocortisolemia in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* 25:1–35
37. Bremner MA, Deeg DJ, Beckman AT, Penninx BW, Lips P, Hoogendijk WJ 2007 Major depression in late life is associated with both hypo- and hypercortisolemia. *Biol Psychiatry* 62:479–486
38. Gold PW, Chrousos GP 2002 Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry* 7:254–275
39. McEwen BS 2007 Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873–904
40. Raisz CL, Miller AH 2003 When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry* 160:1554–1565
41. Fernandez-Roa J JM, Pugeat M, Grasa M, Broch M, Vendrell J, Brun J, Ricart W 2002 Serum corticosteroid-binding globulin concentration and insulin resistance syndrome: a population study. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4686–4690
42. Geverink NA, Foury A, Plastow GS, Gil M, Gispert M, Hortós M, Burnols M, Gort G, Moisan MP, Mormède P 2006 Cortisol-binding globulin and meat quality in five European lines of pigs. *J Anim Sci* 84:204–211
43. Crave JC, Lejeune H, Brébant C, Baret C, Pugeat M 1995 Differential effects of insulin and insulin-like growth factor I on the production of plasma steroid-binding globulins by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1283–1289
44. Emptoz-Bonneton A, Crave JC, Lejeune H, Brébant C, Pugeat M 1997 Corticosteroid-binding globulin synthesis regulation by cytokines and glucocorticoids in human hepatoblastoma-derived (HepG2) cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3758–3762
45. Tsigos C, Kyrou I, Chrousos GP, Papanicolaou DA 1998 Prolonged suppression of corticosteroid-binding globulin by recombinant human interleukin-6 in man. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3379
46. Maitra US, Khan MS, Romer W 1993 Corticosteroid-binding globulin receptor of the rat hepatic membrane: solubilization, partial characterization, and the effect of steroids on binding. *Endocrinology* 133:1817–1822
47. Busch L, Wegmann S, Caldwell JD, Jirikowski GF 2009 Expression of corticosteroid-binding globulin in human astrocytoma cell line. *Cell Mol Neurobiol* 29:583–588

Supplementary Material and Methods

Behavioral studies:

Activity cages: Activity was tested in 16 individual cages. The door, floor, and ceiling of each cage are made of wire mesh and the side walls are made of 10mm thick transparent Plexiglas (Imetronic, Pessac, France). Ambulation (crossover between the inferior beams) and rearing activity (breaks of beams placed at the top of the cage) were quantified in 5-min bins with a computer program (Imetronic, Pessac, France).

Open field: The apparatus made of white coated plywood was a square area (40 x 40 cm) with 16-cm high walls. The floor was divided into 16 squares (10 x 10 cm). Mice were placed in the central area and allowed to explore freely for 10 min. In order to allow the observer to remain outside the experimental room, behavioral sessions were recorded with a ceiling-mounted video camera and analyzed using specific software (The Observer, Noldus, Wageningen, The Netherlands). The total number of squares crossed named "distance travelled" was recorded as an index of locomotor activity. The percentage of time spent in the center (four inner squares) and the percentage of time in locomotion (versus immobility) were recorded as index inversely associated with anxiety. Between animals, the open field was cleaned with 70% ethanol and dried with paper towels to remove olfactory cues.

Elevated-plus-maze: the apparatus consisted of two opposing open arms (30 x 8 cm) and two opposing closed arms (30 x 8 x 15 cm) extending from an 8 x 8 cm central platform and elevated 1 m from the ground. The floor of the maze was made of plywood with a white adhesive tape coating and the walls were made of black-painted steel. Grip on the open arms was facilitated by inclusion of a small edge (1 cm high) around their perimeter, made of transparent Plexiglas. Each mouse was placed onto the central platform facing an open arm to initiate the session and left to explore freely for 5 min. Parameters recorded were number of open and closed arm entries and time spent on the various sections of the maze. The mouse

was considered to be on the central platform whenever two paws were on it and in one of the arms when all four paws were inside. As before, behavioral sessions were recorded with a ceiling-mounted video camera and analyzed using specific software (The Observer, Noldus, Wageningen, The Netherlands). Between animals, the maze was cleaned with 70% ethanol and dried with paper towels to remove olfactory cues.

Cocaine sensitization: the effect of cocaine injection in mice was estimated by their locomotor response in activity cages following a protocol similar to Wei et al (2004). For acute locomotor response to cocaine mice were first habituated to the activity cages for 30 min, then given an ip injection of either saline or cocaine (20 mg/kg) and immediately placed back in the activity cage for 2 h. For cocaine-induced behavioral sensitization, mice received daily injections of 20mg/kg cocaine for 5 consecutive days and their activity was recorded as before. They were left undisturbed for 8 days and then given a challenge with the same dose of cocaine (day 14).

Learned helplessness: Animals were first exposed to a transparent Plexiglas chamber (30 x 24 x 22 cm high) given access to the different visual-spatial cues in the experimental room. The floor of this conditioning chamber consisted of stainless steel rods (2 mm diameter), spaced 5 mm apart and connected to a shock generator (Imetronic, Pessac, France). The four sides of the chamber and the rods of the floor were cleaned with 70 % ethanol before each trial. Animals received 264 inescapable footshocks (0.150 mA) on two consecutive days, respectively. The footshocks applied were unpredictable with varying shock episodes (1-3s) and interval episodes (1-15 s), amounting to a total session duration of ~42 min. Twenty four hours after the second shock procedure, learned helplessness was assessed by testing shuttle box performance (Imetronic, Pessac, France). The shuttle box consisted of two equal-sized compartments (30 x 24 x 22 cm high), which were separated by a small open gate (4 x 4.5 cm high). The shuttle box contained a grid floor as previously described, through which current

could be applied. After two first minutes, a trial started with the presentation of a tone (70 dB, 1,5kHz) for 5 s duration, announcing a subsequent footshock of maximum 5 s duration. The intertrial interval was 30 s and performance was analyzed during 50 shuttle escape trials. The following behavioral reactions were recorded: "avoidance" as adequate reaction to the tone by changing to the other compartment immediately; "escape" as shuttling to the other compartment in reaction to the footshock, and "failures" when no attempt to escape was made during the entire trial duration. Total time of testing for learned helplessness was 27 min.

Forced swimming test: each mouse was placed in a plastic cylinder (height, 32.5 cm; diameter, 15 cm) containing 3 liters of water (16 cm) at $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Three mice were tested at the same time (one from each genotype). The water was changed between subjects. A mouse was judged floating (immobile) when it stopped any movements. As before, behavioral sessions were recorded with a ceiling-mounted video camera and analyzed using specific software (The Observer, Noldus, Wageningen, The Netherlands).

Endocrinology:

Free Corticosterone measurements: Briefly, 10 μl of diluted [^3H]-corticosterone tracer (70 Ci/mmol, Perkin Elmer, France, 25 $\mu\text{Ci/ml}$) were added to 100 μl of plasma and incubated at 37°C for 1 h. Then 10 μl of the mixture was spared and the rest loaded on a Centrifree filter device (YM membranes 30K, Millipore, France) and spun at 2000g for 30 min; 10 μl of the filtrate was removed and counted in scintillation vials into 2.5 ml OptiPhase "HiSafe" 2 (Perkin Elmer, The Netherlands) as well as the 10 μl of total corticosterone spared (retentate). Free corticosterone percentage was calculated as the ratio of cpm filtrate (free corticosterone) / cpm retentate (bound corticosterone). Free corticosterone concentration was obtained as percentage free corticosterone multiplied by total corticosterone concentration measured by prior RIA.

CBG binding capacity assay: 10 µl of plasma was incubated with 500 µl of dextran-coated charcoal suspension (DCC) (0.5% Charcoal activated (Sigma, France), 0.05% dextran (Sigma, France) in 0.05M sodium phosphate buffer pH=7.4 containing 1g/l of gelatin (Merck, VWR, France) abbreviated PBSG buffer) 30 min at room temperature under continuous shaking to remove endogenous steroids. DCC was removed by centrifugation (10 000g for 15 min at room temperature) and further diluted (1:5) in PBSG buffer. 150 µl of diluted plasma (final dilution 1:500) was incubated with 50 µl of increasing concentrations (0.5 to 16 nM final concentrations) of [³H]-corticosterone (70 Ci/mmol, Perkin Elmer, France) and 50 µl of PBSG buffer in duplicates, 20 min at 37°C and then placed for >2h on ice. For measurement of non-specific binding 150 µl diluted plasma was incubated with 50 µl of cold corticosterone (Sigma, France) (8 µM) and 50 µl of 16 nM [³H]-corticosterone (70 Ci/mmol, Perkin Elmer, France). Cold DCC suspension was added (250 µl) to each tube, incubated for 10 min and then centrifuged for 15 min at 3500 rpm. The supernatant was decanted and placed in scintillation vials with 2.5 ml of Optiphase "hisafe" 2 (Perkin Elmer, The Netherlands) and counted. Calculation of CBG Bmax was made as described (Hammond and Lahteenmaki, 1983).

Gene expression: Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, France) according to the manufacturer's protocol. RNA quality was evaluated with RNA Nano chips onto a Bioanalyser 2100 (Agilent, Germany). Two µg of total RNA was reverse-transcribed with Superscript III (Invitrogen, France) and random hexamers according to the manufacturer's protocol. Five µl of cDNA diluted 1:20 was PCR amplified using 10 µl of Mesagreen QPCR master mix (Eurogentec, Seraing, Belgium) and 5 µl of primer mix at 300 nM (900nM for CRH gene) in a total volume of 20 µl onto an ABI7500 thermocycler. PCR program consisted of 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 min. All primers were

designed using the Primer Express software (PE Applied Biosystems) with one primer overlapping two exons except for CRH gene. Sequences of primers used are provided in Table S1. Specificity of the PCR reaction was validated by melt curve analysis and evaluation of PCR efficiency using five dilutions points of the calibrator sample. mRNA levels of target genes were normalized using 18S RNA expression for each sample (cDNA diluted 1:2000) as 18S proved to be the best internal control compared to cyclophilin and $\beta 2$ microglobulin genes in our experiments. Relative quantification of normalized mRNA levels was calculated with the SDS2.1 software (PE Applied Biosystems).

Supplementary Figures and Table

Figure S1: Emotional reactivity of transcortin deficient mice in the open field test

Time in the center and total distance traveled were measured for 10 min. (n=10-12 per group)

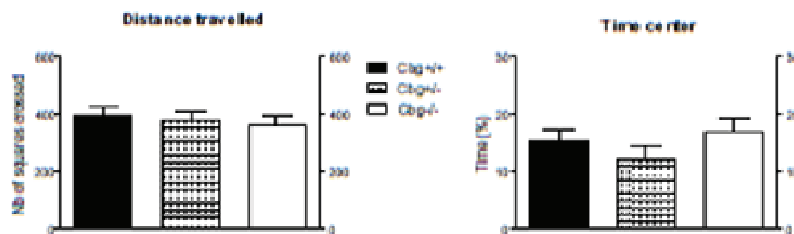


Figure S2: Emotional reactivity of transcortin deficient mice in the elevated plus maze test

Percentage of entries and percentage of time spent in closed or open arms of the maze were measured for 5 min. (n=10-12 per group)

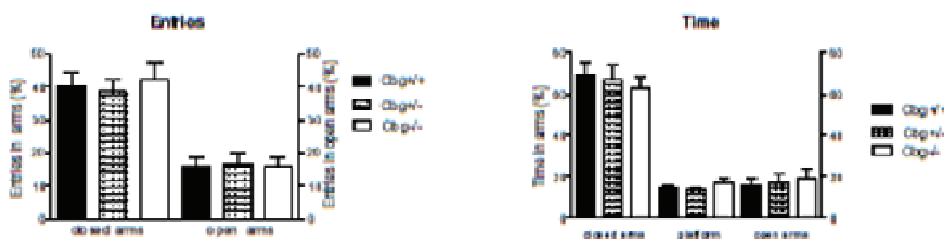


Figure S3: Correlation between number of avoidance in the learned helplessness test and free corticosterone concentration. $r=0.43$, $p<0.05$; red symbols=Cbg+/+, green symbols=Cbg+/-, purple symbol=Cbg-/-

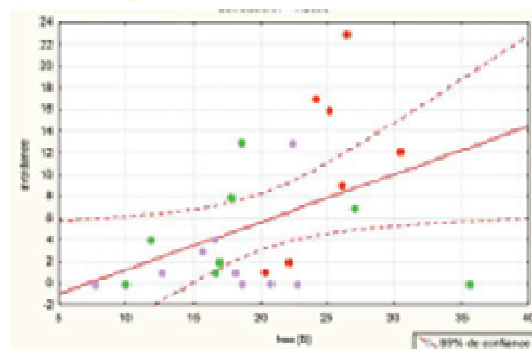


Table S1: Sequence of primers used in real-time PCR

Genes	Primers	Sequence 5' → 3'
18S RNA	Forward	ACC GC AGCTAGGAATAATGGA
	Reverse	GC CTCAGTTCCGAAAACCAA
Cbg (Serpina6)	Forward	AGCAGACGACCTGGTCAACC
	Reverse	GACAGGTATACAGGGCAAGCG
GR (Nr3c1)	Forward	GTGGAAGGACAGCACATTACCT
	Reverse	GCGGCATGCTGGACAGTT
Agt (Serpina8)	Forward	GGGAGAGGTTCTCAATAGCATCC
	Reverse	TGTTCCCTCTCTCTGCTTTG
Pepck	Forward	GTGTCATCCGCAAGCTGAAG
	Reverse	CAGTGAGAGCCAGCCAAACAGT
Tat	Forward	TAGGTTTGCTCTGTTGGAGAC
	Reverse	TCACAAAGCCTTCCTCGTCC
Pomc1	Forward	ACGGAGAGCAACCTGGTGG
	Reverse	GCGAGAGGTCGAGTTTGCA
Crh	Forward	AAAGCAGATGGGAGTCATCCA
	Reverse	TCTTCCACTGCAGCTCCAAA
MR (Nr3c2)	Forward	GCCGTGG AAGGACAACACA
	Reverse	CCTAAGTTCATGCCGGCTTG
Crhr1	Forward	GGAGCATCCGGTGCCTG
	Reverse	AAAGCCGAGATGAGGTTCCA
BDNF	Forward	AACCATAGGACGCCGACTTG
	Reverse	TTGACTGCTGAGCATCACCC
Egr-1	Forward	AGCCGAGCGAACCAACC
	Reverse	TGTCAGAAAAGGACTCTGTGGTCA

Table S2 : Relative mRNA levels in target genes in resting conditions

	Cbg ^{+/+} (n=5-6)	Cbg ^{+/-} (n=9)	Cbg ^{-/-} (n=7-9)	P value
Liver				
GR (Nr3c1)	0.71±0.11	0.58±0.16	0.64±0.12	0.81
PEPCK (Pck-1)	1.06±0.14	0.90±0.26	1.13±0.22	0.75
TAT (Tat)	1.37±0.12	1.06±0.25	1.62±0.33	0.32
AGT (Serpina8)	0.93±0.15	0.72±0.13	0.95±0.18	0.51
Cbg (Serpina6)	1.25±0.22	0.65±0.12	UD	p<0.001
Pituitary				
GR (Nr3c1)	0.92±0.09	1.04±0.24	0.93±0.20	0.60
Pomc	1.17±0.26	1.29±0.30	0.77±0.20	0.29
Crhr1	1.02±0.08	0.93±0.18	0.70±0.12	0.38
Hypothalamus				
GR (Nr3c1)	0.65±0.15	0.63±0.12	0.65±0.12	0.99

Crh	0.66±0.14	1.31±0.25	1.03±0.17	0.16
Hippocampus				
GR (Nr3c1)	0.64±0.09	0.46±0.09	0.52±0.07	0.38
MR (Nr3c2)	0.69±0.15	0.79±0.08	0.76±0.10	0.81
Crhr1	0.77±0.13	0.60±0.13	0.75±0.12	0.59
Egr-1	0.52±0.18	0.66±0.15	0.72±0.16	0.74

UD= undetected

Table S3: Relative mRNA levels in target genes after the learned helplessness test.

	Cbg+/+ (n=6)	Cbg+/- (n=7)	Cbg-/- (n=8)	P value
Pituitary				
Crhr1	0.67±0.16	0.51±0.06	0.42±0.04	0.20
Pomc	1.12±0.18	1.63±0.21	1.43±0.11	0.15
Hypothalamus				
Crh	1.73±0.28	2.07±0.30	2.44±0.43	0.50
Hippocampus				
GR (Nr3c1)	1.12±0.08	1.09±0.06	1.11±0.06	0.96
MR (Nr3c2)	1.39±0.20	2.30±0.18	2.07±0.32	0.10
Crhr1	1.86±0.60	1.87±0.39	2.28±0.79	0.86
Egr-1	1.21±0.16	1.06±0.13	0.73±0.11	0.04*
BDNF	1.57±0.22	2.00±0.12	1.84±.24	0.45

CHAPITRE 2 :

***Rôle critique de la CBG dans l'accès des
glucocorticoïdes au cerveau lors
d'un stress aigu***

Chapitre 2 : Rôle critique de la CBG dans l'accès des glucocorticoïdes au cerveau lors d'un stress aigu

I. Introduction

Nous l'avons vu dans l'introduction générale, une réponse au stress inappropriée, notamment due à une dérégulation de l'axe HPA devenu hyper ou hypo-actif et réactif, peut favoriser le développement d'une vulnérabilité au stress et modifier considérablement les fonctions cérébrales (de Kloet et al., 2005; Herbert et al., 2006b; Holsboer and Ising, 2010). Ainsi, l'accès au cerveau des glucocorticoïdes (libres) semble être critique dans la sensibilité individuelle au stress. Nous avons vu que notre modèle de souris k.o. *Cbg* présente une hypo-réponse des glucocorticoïdes libres au stress, associée à une réponse comportementale altérée (comportement de résignation augmenté, pas de sensibilisation à la cocaïne, insensibilité au stress chronique de type défaite sociale). Ainsi, ces résultats suggèrent fortement que la déficience en CBG ne permet pas l'accès d'une quantité suffisante de corticostérone libre au cerveau, expliquant alors ces maladaptations comportementales.

Dans cette deuxième étude, **nous avons voulu démontrer que la CBG joue un rôle critique dans la régulation de l'accès au cerveau des glucocorticoïdes libres en situation stressante.**

II. Résumé des principaux résultats

1) Evaluation de la mémoire de rappel en situation basale et après stress : test de l'alternance séquentielle spontanée

Pour tester notre hypothèse, nous avons tout d'abord comparé la réponse des souris adultes *Cbg*^{-/-} et *Cbg*^{+/+} dans un test de mémoire de rappel, en condition

basale et après stress, impliquant fortement l'hippocampe dorsal et démontré comme étant corticostérone dépendant : le **test de l'alternance séquentielle spontanée**.

L'alternance est un comportement spontané du rongeur lié à sa motivation innée d'explorer tout nouvel environnement (Beracochea and Jaffard, 1987). Ce test se déroule dans un labyrinthe en forme de T (35cm de long, 10cm de large et 25cm de haut), ne nécessite pas de renforcement alimentaire et est basé sur cette aptitude à explorer de l'animal. L'alternance se définit par le changement de bras d'entrée entre deux essais successifs. En effet, pour alterner, la souris doit se rappeler du bras visité à l'essai précédent. La capacité à alterner est affectée par la place de l'essai dans la série et par l'intervalle de temps entre les essais. Les performances d'alternance reflètent donc la mémoire de travail des animaux (Lalonde, 2002). Le protocole de ce test comportemental utilisé dans cette étude est illustré **figure 20**.

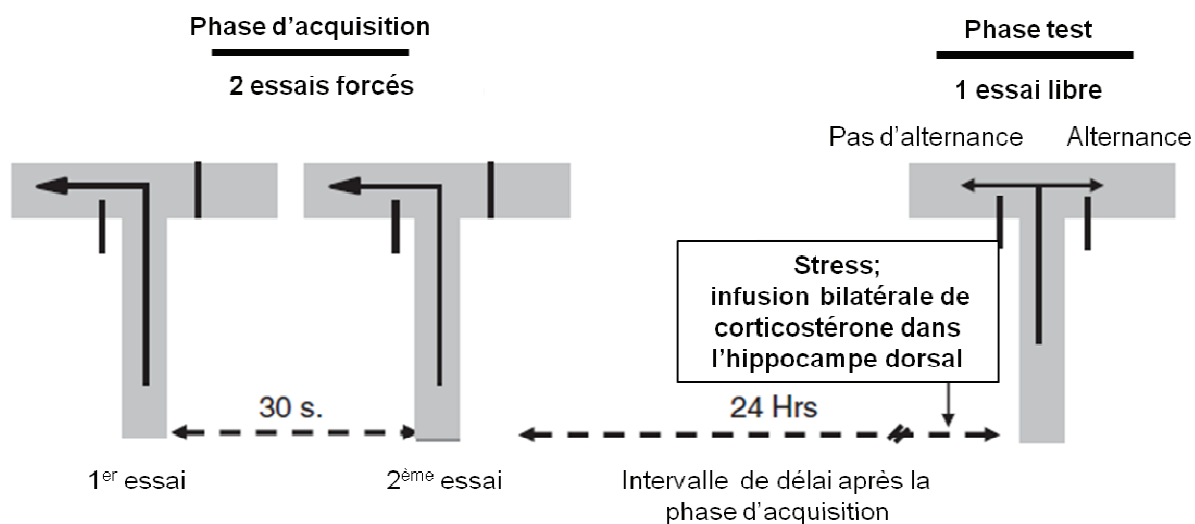


Figure 20 : Protocole expérimental du test d'alternance spontanée utilisé dans cette étude.

Tiré de (Dorey et al., 2011)

La souris subit d'abord une phase d'acquisition : elle est forcée d'entrer deux fois de suite dans le même bras, l'entrée dans l'autre bras étant fermée par une porte (intervalle inter-essai de 30 secondes). Puis, 24 heures après cette phase d'acquisition, la souris passe dans la phase test dans laquelle elle est libre d'entrer dans le bras de son choix.

Ce test se déroule en 2 sessions espacées de 48 heures. La souris est effectivement de nouveau soumise au même protocole, mais dans la phase d'acquisition de la session 2, elle est forcée d'entrer dans le bras opposé de la phase d'acquisition de la session 1.

Une alternance est comptée lorsque la souris entre dans le bras opposé à celui qu'elle a visité lors de la phase d'acquisition.

Les traitements stress ou infusion bilatérale de corticostérone dans l'hippocampe dorsal (1mg/mL) sont effectués 15 minutes avant la phase test.

Les travaux menés à Bordeaux par l'équipe de Daniel Béracochéa, avec qui nous avons collaboré pour cette étude, ont montré que cette tâche de mémoire de rappel est dépendante des niveaux de glucocorticoïdes. En effet, ils ont montré qu'un stress (chocs électriques) effectué avant de tester la mémoire de rappel, entraîne une augmentation des niveaux de corticostérone intrahippocampique. La restitution d'informations contextuelles est, en conséquence perturbée, en modulant l'activité de l'hippocampe dorsal par l'activation de récepteurs MR membranaires (Chauveau et al., 2009; Tronche et al., 2010; Dorey et al., 2011).

Les résultats nous montrent qu'en situation non stressante, les souris Cbg+/+ et Cbg-/- ont une performance d'alternance comparable (83% vs. 75% respectivement ; $p > 0.05$).

Lorsque les souris sont testées 15 minutes après un stress de type chocs électriques les souris Cbg+/+ voient leurs performance d'alternance diminuer (33%), témoignant ainsi d'une sensibilité à l'effet du stress. Cependant, nous n'observons pas cet effet du stress sur les souris Cbg-/- qui présentent toujours une bonne performance d'alternance (71%, Cbg+/+ vs. Cbg-/- : $p < 0.01$).

2) *Mesure de la corticostérone intrahippocampique par microdialyse in vivo*

Par microdialyse, nous avons ensuite mesuré et comparé la cinétique de la réponse à un stress aigu (chocs électriques) de la corticostérone, dans l'hippocampe dorsal chez les souris Cbg+/+ et Cbg-/-.

Chez les souris de type sauvage, nous observons une augmentation progressive des concentrations de corticostérone libre intrahippocampique jusqu'à atteindre un pic 75 minutes après le stress. De façon intéressante, cette augmentation des niveaux de l'hormone dans l'hippocampe dorsal après le même stress n'est pas retrouvée chez les souris Cbg-/-.

3) Effet d'une infusion intrahippocampique de corticostérone chez les souris Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-}

Enfin, des canules ont été bilatéralement implantées dans l'hippocampe dorsal des souris Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-} dans le but d'infuser une solution saline ou de corticostérone afin de mimer pharmacologiquement l'effet du stress et précisément l'élévation hippocampique de corticostérone. Quinze minutes après l'infusion, la mémoire de rappel des deux génotypes de souris a été testée dans le test de l'alternance spontanée.

Nous observons que l'infusion de solution saline dans l'hippocampe dorsal mime la condition basale observée dans l'expérience de la partie 1). Les souris Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-} présentent une bonne mémoire de rappel (86% d'alternance chez les Cbg^{+/+} et 90% chez les Cbg^{-/-}, $p > 0.05$). De façon très intéressante, l'infusion de corticostérone intrahippocampique entraîne une diminution significative des performances d'alternance chez les Cbg^{+/+} comme chez les Cbg^{-/-} (45% vs. 41%, $p < 0.05$).

III. Conclusion

Ainsi nous montrons, avec un test supplémentaire, que les animaux déficients en CBG n'ont pas de perturbation comportementale en condition basale. Par contre, ils sont insensibles à l'effet d'un stress effectué juste avant la mémoire de rappel. L'expérience de microdialyse nous a offert l'opportunité de mesurer la concentration de corticostérone qui arrive à sa cible, en l'occurrence hippocampique, et ainsi de confirmer notre hypothèse. Nos données montrent qu'en situation stressante, la déficience en CBG conduit à une réponse suboptimale des glucocorticoïdes dans le plasma et dans les tissus cibles tels que l'hippocampe. Ceci a pour effet d'altérer les réponses comportementales au stress. En effet, en mimant l'élévation de corticostérone après stress dans l'hippocampe des souris déficientes en CBG, nous avons ainsi pu restaurer un phénotype de sensibilité comportementale au stress.

Ainsi nous démontrons que la CBG, glycoprotéine plasmatique produite et sécrétée par le foie, est cruciale dans le transport des glucocorticoïdes et leur accès

à l'hippocampe et plus largement au cerveau. Ainsi, la CBG influence indirectement, mais de façon critique, les fonctions cérébrales qui pilotent les réponses de stress notamment. Plus largement, nous proposons que le niveau de CBG dans le plasma permet de définir la taille du « réservoir plasmatique » de glucocorticoïdes et plus spécifiquement la fraction de corticostérone libre, ce niveau de CBG étant alors déterminant dans la réponse adaptative au stress.

Cette étude est présentée dans la partie suivante sous forme d'article scientifique que nous avons récemment soumis à un journal scientifique pour publication.

IV. Publication n°2

Critical role of plasma Corticosteroid-Binding-Globulin to deliver glucocorticoids to the brain during stress: impact on memory retrieval

Abbreviated title: Cbg major role in brain corticosterone delivery

Minni A.M. ^(1,2) *, Dorey R. ^(3,4) *, Piérard C. ⁽⁴⁾, Dominguez G. ⁽³⁾, Helbling J.C. ^(1,2), Foury, A. ^(1,2), Béracochéa D. ⁽³⁾ & Moisan M.P. ^(1,2)

* The first two authors contributed equally

⁽¹⁾ INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France

⁽²⁾ Univ Bordeaux, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France

⁽³⁾ CNRS, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA) UMR 5287, Universités de Bordeaux, Talence, France

⁽⁴⁾ Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Département Environnements Opérationnels, Brétigny sur Orge-, France

Corresponding author: Marie-Pierre Moisan

INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, Université de Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076, Bordeaux, France

Tel : +33 557 579214

Fax : +33 557571227

Email: mpmoisan@bordeaux.inra.fr

Keywords: glucocorticoids, stress, transcortin, memory retrieval, hippocampus, microdialysis

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgements: this work was funded by INRA, department of Animal Genetics and Conseil Regional d'Aquitaine.

Abstract

We aimed to demonstrate that corticosteroid binding globulin (CBG), a plasma glycoprotein binding glucocorticoids with high affinity in blood, has a major role in regulating free glucocorticoid access to the brain during stress. For this, we compared CBG deficient mice (Cbg^{-/-}) and their controls (Cbg^{+/+}) in a memory task, the delayed alternation behavior. This task requiring memory retrieval in stress and no stress conditions was previously shown to be dependent on hippocampal glucocorticoid levels. Then, plasma and brain corticosterone levels were measured in the basal and stress conditions by RIA and brain microdialysis respectively, for each genotype. Finally, intra-hippocampal infusion of corticosterone through implanted cannulae was used to mimic stress corticosterone rise.

Our results show that Cbg^{-/-} mice, unlike controls, are insensitive to the stress applied before memory retrieval. In the same conditions, we observed a blunted surge of corticosterone in plasma and no free corticosterone rise in brain in Cbg^{-/-} mice. However, infusion of corticosterone directly in the dorsal hippocampus restored memory retrieval impairment after stress in Cbg^{-/-} as in Cbg^{+/+} controls. Therefore, this work demonstrates that Cbg^{-/-} insensitivity in memory retrieval after stress is due to the blunted rise in corticosterone. More generally, these data strongly suggest that the impact of CBG deficiency in various behaviors reported previously stems from a smaller corticosterone reservoir in blood. Because CBG shows inter-individual variations and is strongly regulated by environmental factors, it should be taken in account when studying stress-induced glucocorticoid action in brain.

Introduction

Corticosteroid-binding-globulin (CBG) or transcortin is a circulating glycoprotein synthesized in liver and secreted in blood where it binds ~80% of circulating glucocorticoids with a high affinity. The role of CBG is mostly seen as acting as a buffer of glucocorticoids by limiting the amount of circulating free hormones. Its role of glucocorticoid reservoir and carrier is well described at sites of inflammation where circulating CBG-glucocorticoid complexes are disrupted specifically by the serine protease elastase allowing a massive and local release of glucocorticoids (Gagliardi et al., 2010; Moisan, 2010). Except inflammation, CBG role in regulating glucocorticoid access to target tissues is often neglected assuming that CBG variation does not occur between individuals and conditions. We previously reported that CBG deficiency in male mice led to an insufficient glucocorticoid signalling in stressful condition impacting on several behavioral responses (Richard et al., 2010). Low levels of free corticosterone after stress were associated with increased “despair-like” behavior in the forced swim and the learned helplessness tests. Accordingly, Egr-1 gene expression in hippocampus was less induced immediately after stress compared to Cbg^{+/+} controls. However, hippocampal mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid receptors (GR) genes expression were unchanged by CBG deficiency. Therefore, we hypothesized a crucial role of plasma CBG in determining the free corticosterone level that can gain access to brain during stress.

In addition to the emotional component, stress and glucocorticoids also affect learning and memory phases i.e. encoding, consolidation and retrieval (de Kloet et al., 1999; Schwabe et al., 2010a). For example, rodents stressed by footshocks

before memory testing in the Morris water maze, showed an impairment of spatial memory retrieval. Systemic injections of glucocorticoids produced the same memory impairments (de Quervain et al., 1998). Similarly in healthy humans, a cortisone administration impaired the recall of words learned 24h earlier (de Quervain et al., 2000). Recently, the involvement of the MR membrane receptors of the dorsal hippocampus was demonstrated in the mediation of the rapid deleterious effects of stress-induced glucocorticoids on memory retrieval in mice (Chauveau et al., 2010; Tronche et al., 2010; Dorey et al., 2011).

In the present study, we aim to demonstrate the critical role of plasma CBG in the delivery of free corticosterone that can gain access to brain during stress. Thus, we studied the implication of plasma CBG level in memory retrieval impairment associated with stress-induced corticosterone rise in hippocampus. Memory retrieval was evaluated in CBG deficient mice (Cbg^{-/-}) and controls using delayed alternation task (Beracochea and Jaffard, 1985; Dorey et al., 2011). Then, the time-course evolution of intra-hippocampus corticosterone concentration after stress was assessed by microdialysis in Cbg^{-/-} and controls. Finally, to restore stress corticosterone levels in CBG-deficient mice, corticosterone was bilaterally infused into the dorsal hippocampus before evaluating mice in the same memory task.

Materials and methods

Animals

Knock-out Cbg^{-/-} mice (MGI ID : 4833641, Serpina6^{tm1.1Mmp}) were produced in our laboratory in Bordeaux (Richard et al., 2010). Cbg^{-/-} and Cbg^{+/+} control mice were littermates obtained by breeding Cbg^{+/-} males and females. Mice used in the present study were 4 – 5 month-old naïve male mice, 26 – 32 g body weight and have a C57BL/6J genetic background above 95%. Animals were individually housed 2 weeks before experiments and maintained in an animal room (23°C) with a 12 hr light/dark cycle (lights on at 0700h), with *ad libitum* access to food and water. Tests were conducted during the light phase between 0800 to 1100 hours. All the experiments were conducted in strict compliance with current European Conventions and approved by Institutional Committee.

Behavioral task

Mice were submitted to a delayed alternation task with a forced-trial procedure, performed in a T-maze (Dorey et al., 2011). Briefly, 3 days before behavioral testing, mice were first allowed to freely explore the maze (one session per day, 10 min per session) to familiarize with the apparatus. The test started the 4th day by an acquisition phase during which mice were forced to enter twice the same goal arm of the maze. The test phase was performed 24h after the acquisition phase. Mice remained 30 s in the start box. The door was then opened and animals were free to enter each goal arm within the maze and remained for 30 s in the chosen arm. The alternation behavior is to enter the arm opposite to that entered the day before. Mice were subjected to two sessions per conditions (stress versus non stress) separated

by 4 days interval, the blocked arm of the second session being opposite to the first one.

All animals were also tested for short-term memory. Thus, immediately after the 24 h test session was done, animals were placed again in the start-box for 30 sec for a new free choice trial.

Surgery and histology

As described by (Dorey et al., 2011), two stainless-steel guide cannulae (26-G, 8mm length) were implanted bilaterally 1 mm above the surface of the dorsal hippocampus (AP = - 2 mm, L = \pm 1.4 mm, V = - 0.9 mm; relative to bregma) on mice previously anesthetized with a ketamine/xylazine (1:10 mg/kg body weight, Rompun; i.p.) solution and placed on a stereotaxic frame. Mice were then allowed to recover in their home cage for at least 1 week before behavioral experiments. Mice were sacrificed by decapitation to collect brains and to check the exact probe location in dorsal hippocampus. Figure 1A shows the anterograde extent and the localization of the cannulae tips in the dorsal hippocampus. Figure 1B shows a representative photomicrograph of coronal brain section stained with cresyl violet from a typical mouse. The cannulae tips were precisely located in the dorsal hippocampus, between CA1 and DG areas. After histological analysis, 5 animals were excluded from analysis

Pharmacological administration

Artificial cerebro-spinal-fluid (aCSF: 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 12 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 3 mM Na₂HPO₄; pH 7.4) for control group or corticosterone (Sigma, France) diluted at 1mg/ml in aCSF solution were bilaterally

injected (0.8 μ l per side) into the dorsal hippocampus using a constant flow rate pump (0.4 μ l/min) with a 32-G stainless-steel cannulae (9 mm length)..

Corticosterone measurement

Total plasma corticosterone was measured by an in-house RIA (see (Richard et al., 2010) for details). Anti-corticosterone antibody was provided by Dr. H. Vaudry (University of Rouen, France). Blood samples were obtained by tail nick and collected in tubes containing 10% EDTA in basal condition (animal room) and after footshocks stress. After 10 min of centrifugation at 10 000 rpm, plasma samples were obtained and kept at -80°C. Intra-hippocampal corticosterone was measured by an enzyme immunoassay commercial kit (Correlate-EIA, Assay Designs, Ann Arbor, MI) in the microdialysates (see (Dorey et al., 2011) for detailed method). The sensibility of this assay is higher (18.6 pg/ml) than the RIA (5 ng/ml). Results are expressed in percentage of variation of baseline.

Statistical Analysis

Statistics were calculated with the software Staview v.5. All results were expressed as mean \pm S.E.M. Genotype and/or treatment effects on corticosterone levels and alternation behavior were analyzed by one- or two-way factorial analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher LSD post-hoc tests or by repeated measures ANOVA when appropriate. The level of statistical significance was set as p values < 0.05 in all tests. On graphs, one symbol indicated a $p < 0.05$, two symbols $p < 0.01$ and three symbols $p < 0.001$, ns: not significant.

Results

To evaluate memory performance in stressful condition, Cbg^{+/+} (n=12) and Cbg^{-/-} (n=12) male mice were tested in the delayed alternation task in no stress condition and 15 min after an acute stress induced by footshocks (Figure 2). Repeated measures ANOVA showed a significant genotype effect ($F_{(1,22)} = 8.04$; $p < 0.01$), a significant stress effect ($F_{(1,22)} = 6.2$; $p < 0.05$) and a significant genotype x stress interaction ($F_{(1,22)} = 4.45$; $p < 0.05$). Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} presented similar alternation performance in no stress condition (respectively 83.3 % \pm 7.1 and 75 % \pm 7.5; ns) in contrast to performance observed in stress condition (33.3 % \pm 9.4 in Cbg^{+/+} and 70.8 % \pm 9.7 in Cbg^{-/-}; $p < 0.01$). Whereas stress dramatically and significantly decreased alternation rates in Cbg^{+/+} mice ($p < 0.01$), such a deleterious effect was not observed in Cbg^{-/-} animals.

There was no exploratory activity difference between Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} since no significant difference was observed between genotypes in the mean choice latency to enter the chosen arm at the 24 hrs test session, both in the no stress and in the stress condition. Stress significantly increased choice latency as compared to the no stress condition ($F_{(1,22)} = 67.5$; $p < 0.0001$) but the interaction between genotypes and conditions was not significant. Similarly, the short-term memory trial revealed no significant difference among genotypes, or conditions (stress versus no stress) and no significant interaction was detected.

To study the implication of glucocorticoids in the stress insensibility of Cbg^{-/-} mice, plasma total corticosterone was measured in both no stress and footshocks stress conditions (Figure 3A). Two-way ANOVA analysis showed a genotype ($F_{(1,29)} = 19.96$; $p < 0.001$), a stress ($F_{(1,29)} = 4.73$; $p < 0.05$) and a genotype x stress interaction

($F_{(1,29)} = 8.64$; $p < 0.01$) effects. Whereas no difference between Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} was observed in no stress condition ($p = 0.31$), stress condition induced a strong difference between genotype ($p < 0.001$). Furthermore, stress condition led to a significant corticosterone level increase in Cbg^{+/+} mice (+ 96 %, $p < 0.001$), whereas this condition changed only moderately the level of corticosterone of Cbg^{-/-} mice (+ 33 %, $p = 0.61$).

Then, we determined how this reduced plasma corticosterone rise after stress in Cbg^{-/-} mice translates to brain corticosterone levels. For this, intra-hippocampus corticosterone rise was measured in Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice by microdialysis after footshocks stress (Figure 3B). One-way repeated-measure ANOVA performed on time-course corticosterone evolution in hippocampus evidenced significant genotype ($F_{(1,210)} = 17.87$; $p < 0.001$) and time ($F_{(14,210)} = 2.75$; $p < 0.001$) effects with a significant genotype x time interaction ($F_{(14,210)} = 3.44$; $p < 0.001$). In Cbg^{+/+} mice, as expected, the acute stress induced a progressive and significant corticosterone levels increase from 15 min to 90 min compared to $t=0$ with a peak measured at 75 min (+207.3%; $p < 0.001$). However, this stress-induced corticosterone rise was not observed in Cbg^{-/-} mice that presented significant differences with Cbg^{+/+} mice around the corticosterone peak ($p < 0.05$ at 30, 60 and 90 min, $p < 0.001$ at 75 min).

Finally, to demonstrate that the absence of hippocampal corticosterone rise was responsible of the stress insensitivity of Cbg^{-/-} in the memory task, intra-hippocampus corticosterone injections were performed before the delayed alternation task (Figure 4). Corticosterone was infused bilaterally in dorsal hippocampus 15 minutes before testing in order to mimic the stress corticosterone rise observed in stressed Cbg^{+/+} mice, that is absent in stressed Cbg^{-/-}. As observed previously in no

stress group, a similar alternation rate was revealed between Cbg+/+ (n=14; 85.7% ± 6.3) and Cbg-/- mice (n=10; 90.0% ± 6.7) with a control aCSF injection. However, corticosterone injection decreased significantly the alternation rate whatever the genotype (45.5% ± 12.5 for Cbg+/+, n=8; and 40.9% ± 11.3 for Cbg-/-, n=11). Accordingly, two-way ANOVA detected significant injection effect ($F_{(1,39)} = 14.8$; $p < 0.001$) but no genotype effect ($F_{(1,39)} < 1.0$) and no genotype x injection interaction ($F_{(1,39)} < 1.0$).

As above there was no difference in exploratory activity and in short-term memory between Cbg+/+ and Cbg-/-.

Discussion

An inappropriate stress response embodied by a HPA axis dysregulation (hyper as well as hypoactivity) can lead to the development of stress vulnerability that greatly alters brain functions (de Kloet et al., 2005; Herbert et al., 2006b; Holsboer and Ising, 2010). Thus, access of glucocorticoids to the brain as well as intracerebral glucocorticoid signalling appears to be critical in stress sensitivity. In the present study, Cbg-/- mice were used in a memory task to investigate the implication of plasma CBG levels in glucocorticoid access to the brain. This memory task, previously shown to be hippocampal and glucocorticoid-dependent, permitted to reveal the impact of impaired glucocorticoid access to the brain on a cerebral function.

Our data confirmed that in Cbg+/+ control mice, acute stress delivered 15 minutes before the test session resulted in an impairment of memory retrieval associated with a plasma and brain corticosterone increase. These results are in agreement with previous studies using the same behavioral task (Dorey et al., 2011),

or the contextual serial spatial discrimination task measuring also memory retrieval (Chauveau et al., 2009). In *Cbg*^{-/-} mice, the lack of memory retrieval deficit occurring after stress cannot be ascribed to impaired motivation to alternate, nor to sensory-motor alteration since stressed *Cbg*^{-/-} mice exhibited accurate and normal short-term memory, and the choice latency at the 24h test session was similar to that of stressed *Cbg*^{+/+}. Interestingly, this lack of stress effect on memory retrieval in *Cbg*^{-/-} mice was associated with a markedly reduced rise in plasma corticosterone levels. Thus, these data are congruent with our previous study (Richard et al., 2010) reporting that *Cbg*^{-/-} mice are unable to promote the behavioral adaptive stress response because of a suboptimal corticosterone surge after stress. Also, these results reinforced our hypothesis that CBG deficiency results in lower levels of glucocorticoids reaching target tissues such as brain.

To check that reduced plasma corticosterone translates into reduced brain levels in *Cbg*^{-/-} mice, we measured free corticosterone directly in hippocampus by *in vivo* microdialysis. In control mice, we observed a rapid intra-hippocampal corticosterone rise. However, in *Cbg*^{-/-} mice no corticosterone elevation after stress was detected in hippocampus. As free corticosterone represent less than 5% of total plasma corticosterone, it is not surprising that the small corticosterone surge observed in *Cbg*^{-/-} plasma after stress does not translate into a detectable rise in hippocampus. Importantly, the plasma differences found between *Cbg*^{+/+} and *Cbg*^{-/-} mice was confirmed in hippocampus. Besides, this observation in *Cbg*^{-/-} mice is similar to the effect of metyrapone, a corticosterone synthesis inhibitor, which canceled-out the intra-hippocampal corticosterone rise that also abolished consequently the stress-induced impairment of retrieval memory (Rooszendaal et al., 2001b; Tronche et al., 2010; Dorey et al., 2011). Correlations between plasma and

intra-hippocampal corticosterone dynamics in response to stress were demonstrated in recent studies. In hippocampus as in blood, the free corticosterone rise after a stress engendered by a forced swim is similar but delayed by 20-30 min as compared with total corticosterone response in the blood of mice (Thoeringer et al., 2007) or rats (Droste et al., 2008). In our study, we obtained a peak of free corticosterone at 75 min after the footshock stress confirming this delayed response in hippocampus of wild-type animals. Furthermore, an *in vivo* microdialysis study conducted on mice lines selectively bred for high (HR), intermediate (IR) and low (LR) stress corticosterone reactivity showed good correlations between plasma and hippocampal corticosterone levels although differences between lines were attenuated in the hippocampus (Heinzmann et al., 2010).

Finally, to demonstrate the importance of plasma CBG in brain corticosterone delivery, corticosterone was injected directly in hippocampus with the aim to mimic the corticosterone surge after stress that is absent in *Cbg*^{-/-} mice. In *Cbg*^{+/+} as in *Cbg*^{-/-}, aCSF bilateral intra-hippocampal injections did not disturb the alternation behavior as in no stress condition. However, the intra-hippocampal corticosterone injection resulted, in both *Cbg*^{+/+} and *Cbg*^{-/-} mice, in a significant impairment of memory retrieval that is similar to the footshocks stress condition. Thus, *Cbg*^{-/-} mice became sensitive to “stress” mimicked by intra-hippocampal corticosterone infusion.

Thus, by providing corticosterone in a brain structure, we reversed the phenotype of stress insensitivity on memory retrieval caused by CBG deficiency. This study demonstrated that CBG, a glycoprotein produced and secreted in blood by liver cells, is crucial for glucocorticoid transport and access into the brain, and impacts indirectly on a cerebral function such as the rapid effect of stress on memory retrieval. We have demonstrated recently that the rapid effect of stress is mediated

by a membrane MR receptor in dorsal hippocampus (Dorey et al., 2011). Because in basal conditions, the free corticosterone levels are similar in Cbg^{-/-} and Cbg^{+/+} controls, hippocampal GR and MR mRNA expression is not affected by CBG deficiency (Richard et al., 2010). It is thus likely that the same non genomic process occurred in both Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} in condition of memory retrieval after stress but the membrane MR were not, or not enough, activated in Cbg^{-/-} hippocampus (because of blunted corticosterone rise) to respond as the wild-type mice.

Our demonstration was done in dorsal hippocampus only and for a specific memory task. However, because Cbg^{-/-} mice have deficits in other phenotypes related to brain function such as behavioral response to forced swim and learned helplessness tests or sensitization to cocaine (Richard et al., 2010), we believe that reduced corticosterone pool size in Cbg^{-/-} will result in reduced free corticosterone after stress in whole brain. CBG was shown before to have a major role in the composition of the plasma corticosterone pool size that constitutes a reservoir of corticosterone (Bright, 1995; Richard et al., 2010). In blood, free corticosterone is in dynamic equilibrium with CBG-bound corticosterone that is influenced by environmental factors such as temperature rise that will increase the free fraction able to bind MR and GR in peripheral as well as in brain tissues and exert their physiological functions (Cameron et al., 2010). Thus, an optimal corticosterone pool will provide optimal free corticosterone concentrations. In Cbg^{-/-} mice this pool is very much reduced because CBG is not there to capture and retain corticosterone in the plasma. Consequently, although an acute drop in CBG levels will increase free corticosterone levels in blood, chronic or innate CBG deficiency (as in Cbg^{-/-} mice) will, at the opposite, result in suboptimal free corticosterone levels during stress.

CBG does not cross the blood brain barrier but was detected in hypothalamus as well as other brain regions (Jirikowski et al., 2007) but at very low levels. The role of intra-cerebral CBG is still unclear as functional studies are lacking but would rather relates to the fine-tuning of corticosterone access to target cells or the action of corticosterone in cells devoid of MR or GR (Jirikowski et al., 2007). Our data suggest that CBG major role, including for brain functions, is in glucocorticoid delivery by its action in plasma.

In conclusion, the work presented here provide strong evidence that CBG in plasma, by determining the glucocorticoid reservoir size, has a critical role in glucocorticoid access to dorsal hippocampus and consequently influences the stress effect on memory retrieval. We propose that these data illustrate a more general process in which plasma CBG levels are crucial in the adaptive stress response as they determine the reservoir size as well as the free fraction of glucocorticoid hormones. Not surprisingly, CBG gene was identified as the most probable causal gene in two independent non-hypothesis driven genetic studies searching for genes involved glucocorticoid stress responses variability (Ousova et al., 2004; Solberg et al., 2006; Moisan, 2010).

CBG has received little attention in neurobiological and stress studies because of its role taking place mainly in plasma and because its levels were thought to be relatively constant after stress. However, recent analyses have demonstrated that CBG is thermosensitive and its affinity for cortisol drops in case of fever (Cameron et al., 2010). CBG is also strongly regulated by cytokines (such as interleukin-6 or $\text{TNF}\alpha$), insulin and thyroxin (Gagliardi et al., 2010). Furthermore, CBG levels are highly variable between individuals, both animal and humans, up to ten-fold differences (Guyonnet-Duperat et al., 2006; Lewis et al., 2010). Therefore, this work

should stimulate stress studies taking in account CBG variations and free glucocorticoid levels, for example in stress-related psychiatric disorders in which both hypo and hyperactivity of the HPA axis may be involved.

References

- Beracochea D, Jaffard R (1985) Memory deficits subsequent to chronic consumption of alcohol in mice: an analysis based on spontaneous alternation behavior. *Behav Brain Res* 15:15-25.
- Bright GM (1995) Corticosteroid-binding globulin influences kinetic parameters of plasma cortisol transport and clearance. *J Clin Endocrinol Metab* 80:770-775.
- Cameron A, Henley D, Carrell R, Zhou A, Clarke A, Lightman S (2010) Temperature-responsive release of cortisol from its binding globulin: a protein thermocouple. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4689-4695.
- Chauveau F, Pierard C, Tronche C, Coutan M, Drouet I, Liscia P, Beracochea D (2009) The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress conditions. *Neurobiol Learn Mem* 91:447-455.
- Chauveau F, Tronche C, Pierard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M, Beracochea D (2010) Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* 20:196-207.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M (1999) Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22:422-426.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.
- de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL (1998) Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394:787-790.
- de Quervain DJ, Roozendaal B, Nitsch RM, McGaugh JL, Hock C (2000) Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nat Neurosci* 3:313-314.
- Dorey R, Pierard C, Shinkaruk S, Tronche C, Chauveau F, Baudonnat M, Beracochea D (2011) Membrane Mineralocorticoid but not Glucocorticoid Receptors of the Dorsal Hippocampus Mediate the Rapid Effects of Corticosterone on Memory Retrieval. *Neuropsychopharmacology*.
- Droste SK, de Groot L, Atkinson HC, Lightman SL, Reul JM, Linthorst AC (2008) Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. *Endocrinology* 149:3244-3253.
- Gagliardi L, Ho JT, Torpy DJ (2010) Corticosteroid-binding globulin: the clinical significance of altered levels and heritable mutations. *Mol Cell Endocrinol* 316:24-34.
- Guyonnet-Duperat V, Geverink N, Plastow GS, Evans G, Ousova O, Croisette C, Foury A, Richard E, Mormede P, Moisan MP (2006) Functional implication of an Arg307Gly substitution in corticosteroid-binding globulin, a candidate gene for a quantitative trait locus associated with cortisol variability and obesity in pig. *Genetics* 173:2143-2149.
- Heinzmann JM, Thoeringer CK, Knapman A, Palme R, Holsboer F, Uhr M, Landgraf R, Touma C (2010) Intrahippocampal corticosterone response in mice selectively bred for extremes in stress reactivity: a microdialysis study. *J Neuroendocrinol* 22:1187-1197.

- Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR (2006) Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol* 18:393-411.
- Holsboer F, Ising M (2010) Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol* 61:81-109, C101-111.
- Jirikowski GF, Pusch L, Mopert B, Herbert Z, Caldwell JD (2007) Expression of corticosteroid binding globulin in the rat central nervous system. *JChemNeuroanat* 34:22-28.
- Lewis JG, Borowski KK, Shand BI, George PM, Scott RS (2010) Plasma sex hormone-binding globulin, corticosteroid-binding globulin, cortisol, and free cortisol levels in outpatients attending a lipid disorders clinic: a cross-sectional study of 1137 subjects. *Horm Metab Res* 42:274-279.
- Moisan MP (2010) Genotype-phenotype associations in understanding the role of corticosteroid-binding globulin in health and disease animal models. *Mol Cell Endocrinol* 316:35-41.
- Ousova O, Guyonnet-Duperat V, Iannuccelli N, Bidanel JP, Milan D, Genet C, Llamas B, Yerle M, Gellin J, Chardon P, Emptoz-Bonneton A, Pugeat M, Mormede P, Moisan MP (2004) Corticosteroid binding globulin: a new target for cortisol-driven obesity. *MolEndocrinol* 18:1687-1696.
- Richard EM, Helbling JC, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, Pourtau L, Konsman JP, Mormede P, Moisan MP (2010) Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151:649-659.
- Roozendaal B, Phillips RG, Power AE, Brooke SM, Sapolsky RM, McGaugh JL (2001) Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression. *Nat Neurosci* 4:1169-1171.
- Schwabe L, Wolf OT, Oitzl MS (2010) Memory formation under stress: quantity and quality. *NeurosciBiobehavRev* 34:584-591.
- Solberg LC, Baum AE, Ahmadiyah N, Shimomura K, Li R, Turek FW, Takahashi JS, Churchill GA, Redei EE (2006) Genetic analysis of the stress-responsive adrenocortical axis. *Physiol Genomics* 27:362-369.
- Thoeringer CK, Sillaber I, Roedel A, Erhardt A, Mueller MB, Ohl F, Holsboer F, Keck ME (2007) The temporal dynamics of intrahippocampal corticosterone in response to stress-related stimuli with different emotional and physical load: an in vivo microdialysis study in C57BL/6 and DBA/2 inbred mice. *Psychoneuroendocrinology* 32:746-757.
- Tronche C, Pierard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Beracochea D (2010) Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem* 93:343-351.

Figure Legends

Figure 1

Representative localization of the sites of corticosterone injections into the dorsal hippocampus

A: Reconstruction of the main sites of corticosterone injections (dotted black) and anteroposterior extent of the sites of injections (grey hashed areas). Stereotaxic coordinates are mentioned in mm from bregma. **B:** Histological controls of intra-hippocampus microdialysis probe implantation. Photomicrographs (20X) of coronal brain section stained with cresyl violet.

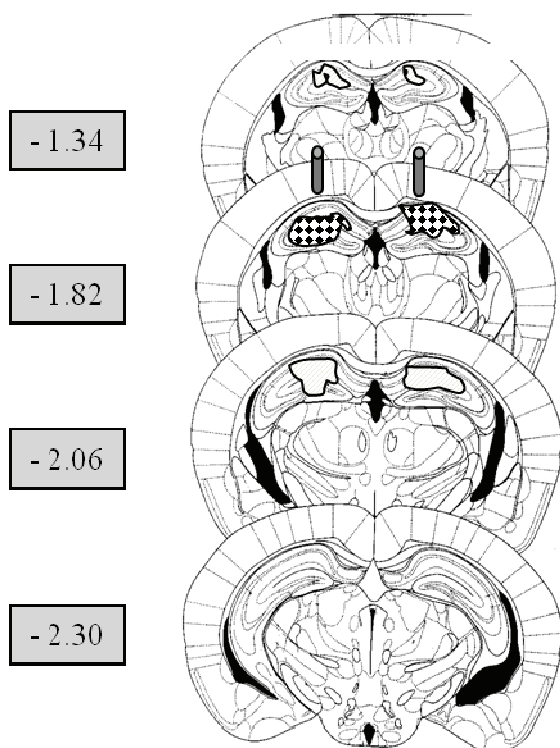
A**B**

Figure 2

Effects of stress (footshocks 15 min before test session) on delayed alternation performance on Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice; chance level: 50%.

* Genotype effect; # vs. Cbg^{+/+} not stressed

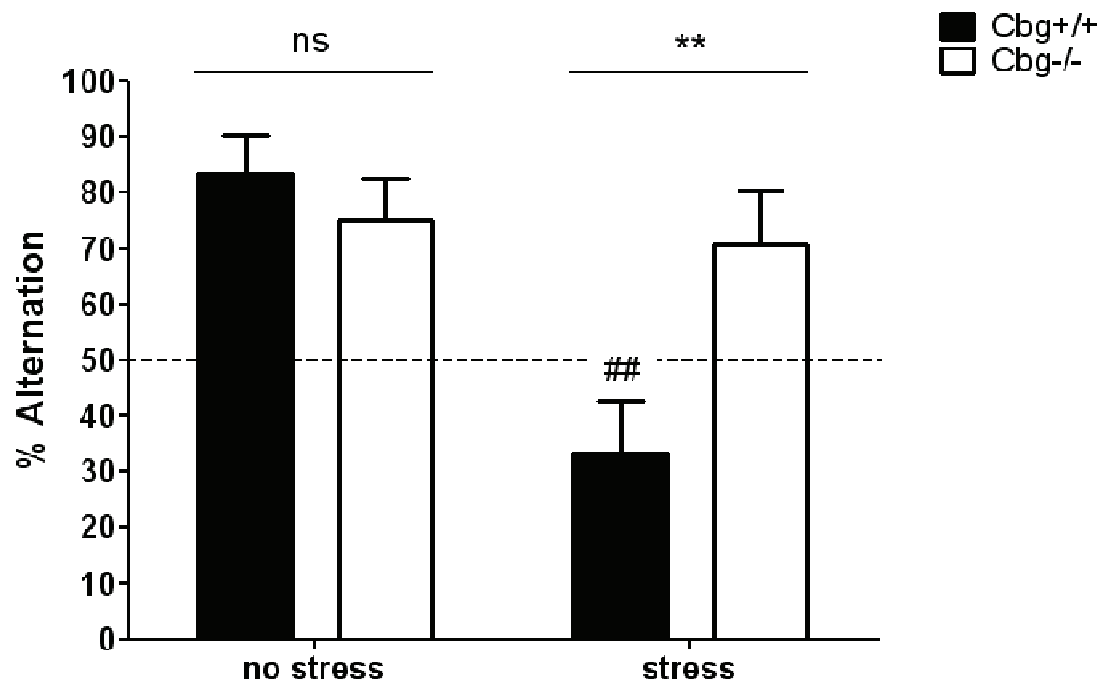


Figure 3

A: Plasma corticosterone (nM) in both not stress and stressed (footshocks 15 min before) Cbg+/+ and Cbg-/- mice. * Genotype effect; # vs. Cbg+/+ no stressed.

B: Time-course evolution of corticosterone in the dorsal hippocampus measured by microdialysis in stressed (footshocks) Cbg+/+ and Cbg-/- mice (n=8 Cbg+/+ and n=9 Cbg-/-). * vs. Cbg+/+ at time = 0; # vs. Cbg+/+ at the same time. Values are expressed as percentage of basal values obtained before the footshocks for each genotype.

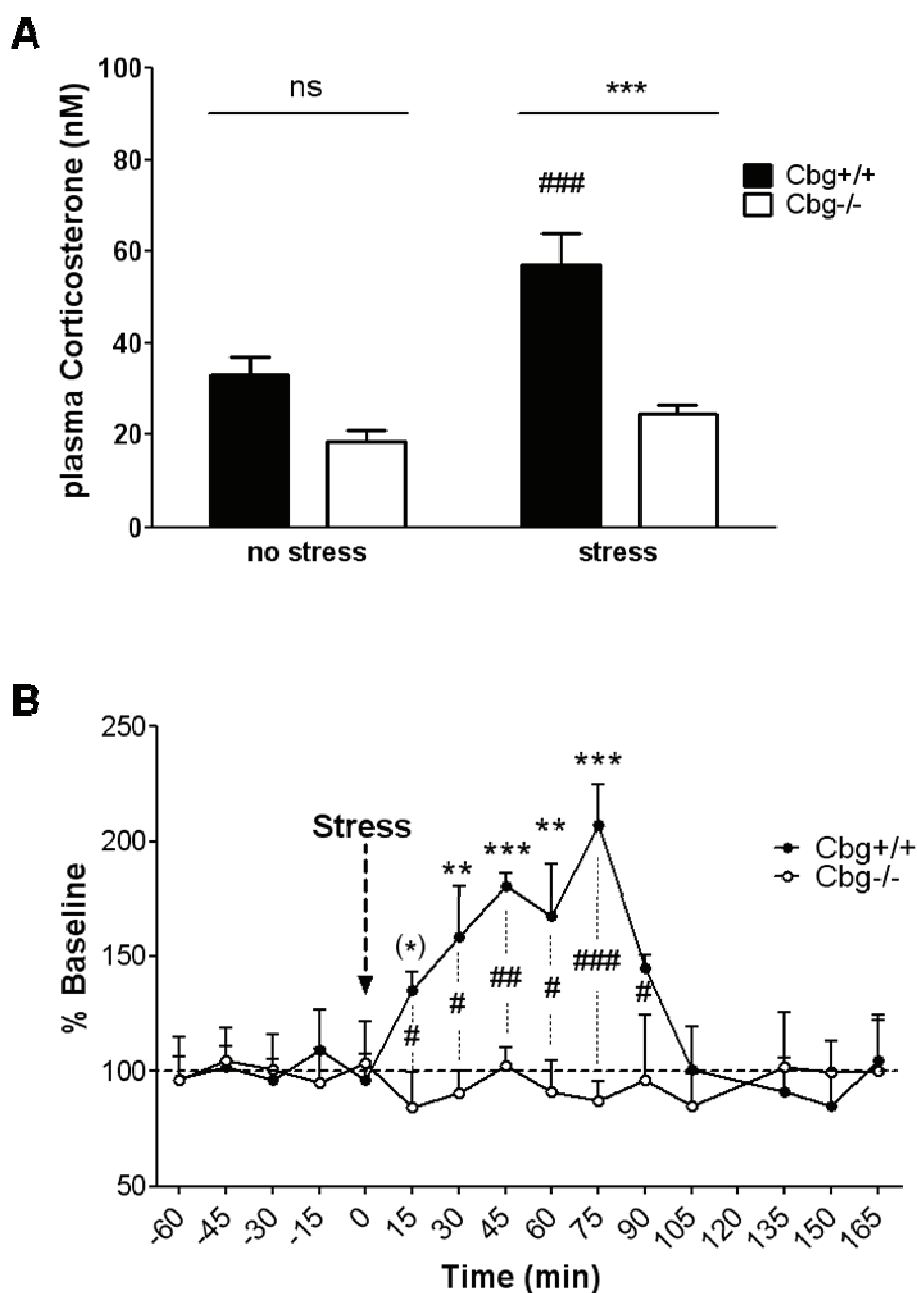
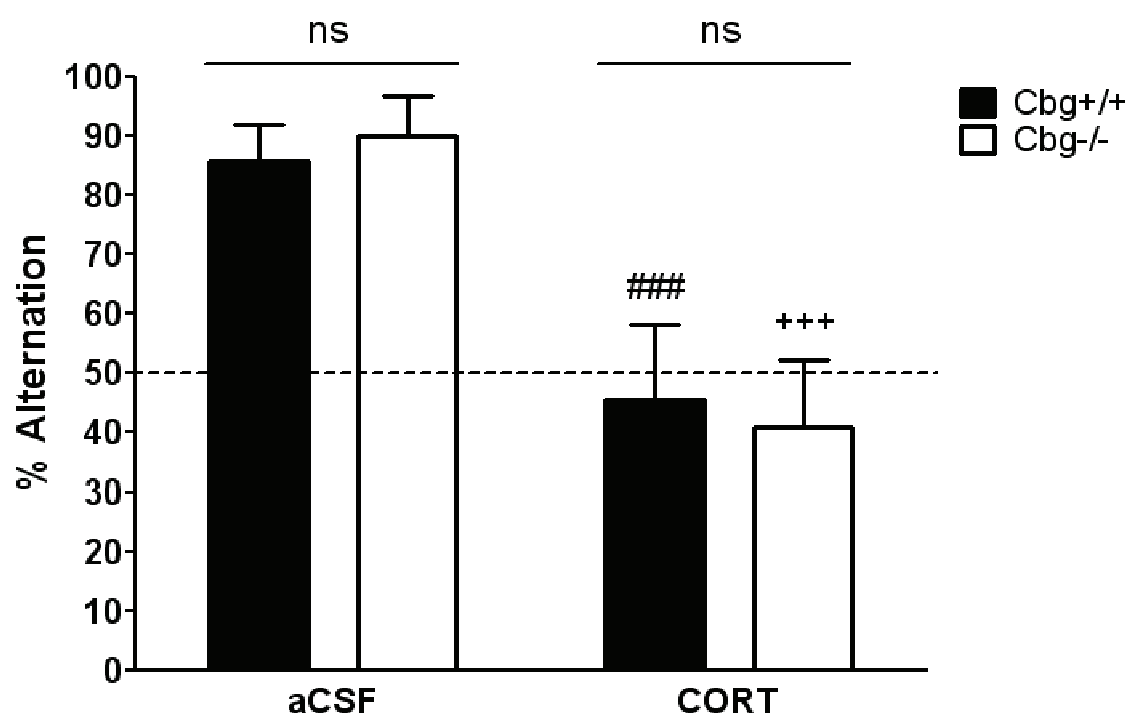


Figure 4

Effects of aCSF or 1mg/mL corticosterone (CORT) infused bilaterally in the dorsal hippocampus 15 min before test session on delayed alternation performance on Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice (n=14 Cbg^{+/+} aCSF; 11 Cbg^{+/+} CORT; 10 Cbg^{-/-} aCSF; 11 Cbg^{-/-} CORT); chance level: 50%.

* Genotype effect; # vs. Cbg^{+/+} aCSF; + vs. Cbg^{-/-} aCSF



CHAPITRE 3 :

***La CBG influence fortement le dimorphisme
sexuel de la sensibilité au stress***

Etude des femelles

Chapitre 3 : La CBG influence fortement le dimorphisme sexuel de la sensibilité au stress.

Etude des femelles

I. Introduction

La réactivité au stress de l'homme et de la femme est différente. Ce dimorphisme sexuel bien connu est influencé par des facteurs sociaux, des différences morphologiques et des différences physiologiques. L'axe corticotrope, notamment, est connu pour présenter des différences liées au sexe de l'individu dans sa régulation. De nombreuses études menées chez l'Homme et chez l'animal en font état (cf. partie II. D. 1) de l'introduction générale de la thèse). En effet, lorsque des différences sont observées, elles vont généralement dans le sens de niveaux de base et après stress des glucocorticoïdes plus élevées chez les femmes/femelles (Rhodes and Rubin, 1999). Les œstrogènes ont largement été incriminés pour expliquer ce dimorphisme de l'axe HPA. Par ailleurs, ces hormones stimulent positivement les niveaux plasmatiques de CBG (Nader et al., 2006). Il a été observé chez le rat qu'en effet, les œstrogènes diminuent l'action du rétrocontrôle de l'axe HPA par les glucocorticoïdes par un mécanisme dépendant des récepteurs α des œstrogènes du PVN de l'hypothalamus (Weiser and Handa, 2009). Cette action a pour effet d'augmenter les niveaux de corticostérone. Il a d'ailleurs été observé chez le rongeur que l'ovariectomie diminue les concentrations de corticostérone des femelles, alors comparable à celles des mâles dans les mêmes conditions de base et après stress (Seale et al., 2004b).

La dépression est une pathologie impliquant, bien souvent, une dérégulation de l'axe corticotrope. En effet, les patients dépressifs présentent généralement une hyperactivité de l'axe avec des niveaux de cortisol augmentés (classiquement en raison d'une altération du rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes). On parle de dépression majeure à symptômes mélancoliques. Une hypoactivité de l'axe corticotrope conduisant à des taux de cortisol trop faibles a aussi été observée chez certains patients dépressifs, mais est beaucoup moins étudiée. Cette fois, on évoque

une dépression majeure à symptômes atypiques (Bremmer et al., 2007). Il est intéressant d'observer que le risque de développer une dépression est deux fois plus important pour la femme que pour l'homme (Wittchen et al., 2011).

Aux vues de cette riche littérature autour du dimorphisme sexuel, il nous a alors semblé intéressant d'étudier, dans notre modèle d'hyporéactivité corticotrope au stress conduisant au développement de comportement de résignation ou de type « dépressif », **quelle est la réactivité de l'axe HPA et quelle est la réactivité comportementale à un stress aigu des femelles Cbg+/+ et Cbg/-**. Cette étude des femelles nous permet également de nous interroger sur **l'impact d'une déficience en CBG sur le dimorphisme sexuel**.

II. Résumé des principaux résultats

1) *Evaluation du trait de type « dépressif » chez les mâles et les femelles Cbg+/+ et Cbg/-*

Des mâles et des femelles Cbg+/+ et Cbg/- ont été soumis à deux tests comportementaux : le test de suspension par la queue ou *tail suspension test* (TST) et le test de la nage forcée ou *forced swim test* (FST). Ceux-ci sont classiquement utilisés pour mettre en évidence un comportement de résignation (dit comportement de type « dépressif ») et sont décrits dans la partie II.C. de l'introduction générale.

La comparaison des mâles et des femelles Cbg+/+ indique que les femelles sont plus immobiles dans ces deux tests. Ceci suggère ainsi que les femelles de type sauvage présentent un trait de type dépressif plus prononcé que les mâles. A l'inverse, la comparaison des mâles et des femelles Cbg/- ne révèle aucune différence dans les comportements d'immobilité, qui sont élevés suggérant ainsi un phénotype de type « dépressif ».

De manière intéressante, alors que nous observons une différence statistique entre les génotypes des mâles, aucune différence n'est observée entre les deux génotypes des femelles. Les femelles Cbg+/+ et Cbg/- présentent un comportement

d'immobilité comparable à celui des mâles Cbg^{-/-} et supérieur à celui des mâles Cbg^{+/+}, c'est-à-dire que tous présentent un comportement de type « dépressif ».

2) Le dimorphisme sexuel de la régulation de l'axe HPA est dépendant des niveaux de CBG

Nous avons mesuré les concentrations de corticostérone totale dans le plasma, au cours du cycle nycthéral, chez les mâles et les femelles Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-}.

Nous observons, notamment au pic circadien, que les niveaux de corticostérone sont effondrés chez les souris Cbg^{-/-}. Ils sont d'ailleurs similaires entre les mâles et les femelles Cbg^{-/-}. Concernant les animaux de type sauvage, nous observons que les niveaux de l'hormone au pic d'activité sont plus élevés chez les femelles que chez les mâles.

Nous avons ensuite évalué la production de corticostérone en mesurant la concentration de corticostérone libre urinaire au cours du cycle nycthéral (mesure de l'aire sous la courbe). De manière intéressante, nous n'observons pas de différence de production de corticostérone entre les mâles Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-}. Ceci nous indique que la déficience en CBG, chez les mâles ne perturbe pas la production de l'hormone. Une fois l'hormone produite, elle est libérée dans le sang mais est rapidement éliminée dans les urines du fait de l'absence de CBG. Ceci résulte en un effondrement du niveau de corticostérone totale plasmatique (Richard et al., 2010).

Concernant les femelles, la comparaison statistique des génotypes chez les femelles met en évidence, pour les Cbg^{+/+}, une production de corticostérone supérieure à celle des femelles Cbg^{-/-}. De plus, nous observons que les mâles Cbg^{-/-}, les femelles Cbg^{-/-} et les mâles Cbg^{+/+} présentent une production de corticostérone comparable et inférieure à celle des femelles Cbg^{+/+}.

Enfin, la mesure de la CBG dans le plasma chez les mâles et les femelles de type sauvage met en évidence une concentration plus élevée chez les femelles.

Ainsi selon la concentration plasmatique de CBG, nous observons deux profils :

- Chez les animaux de type sauvage, nous mettons en évidence un dimorphisme sexuel : les femelles ont des taux de CBG supérieurs aux mâles et semblent présenter un profil hypercorticostéronémique, associé à un trait de type dépressif
- Chez les animaux déficients en CBG nous n'observons pas de dimorphisme sexuel : les mâles comme les femelles présentent un profil hypocorticostéronémique, également associé à un trait de type dépressif.

3) Les œstrogènes favorisent le dimorphisme sexuel seulement si la CBG est exprimée

Les œstrogènes participent fortement au dimorphisme sexuel de la régulation de l'axe HPA et modulent les réponses comportementales. De plus ils sont connus pour stimuler les niveaux de corticostérone et de CBG. Ainsi nous avons ovariectomisé des femelles Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-} et sur la moitié de chacun des groupes nous avons placé un implant sous cutané délivrant en continu une concentration de 17- β -œstradiol mimant celle des mâles. Deux groupes de souris contrôles Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-}, ainsi que ces quatre groupes de femelles ainsi opérées ont été évalués dans le TST et le FST. Puis nous avons mesuré la corticostérone totale et la CBG dans le plasma, 5 heures après le stress imposé par le test du FST.

Brièvement, nous observons que la modulation des niveaux d'œstrogènes chez les femelles Cbg^{-/-} n'a aucun effet statistique sur les réponses comportementales et les mesures de corticostérone totale et de CBG dans le plasma. Chez les femelles de type sauvage par contre, nous observons que la baisse des niveaux d'œstrogènes induite par l'ovariectomie entraîne une diminution significative des niveaux d'immobilité (donc du comportement de type « dépressif ») dans le TST et dans le FST, et également des niveaux de corticostérone et de CBG plasmatique. De manière intéressante, l'ajout de l'implant œstrogénique rétablit ces paramètres.

III. Conclusion

En conclusion, nos données mettent en évidence que la CBG influence fortement le dimorphisme sexuel de la réactivité au stress. De façon intéressante, notre modèle de souris k.o. Cbg a permis de montrer que ce dimorphisme sexuel est dépendent du niveau plasmatique de CBG. En effet avons observé qu'une concentration trop élevée de CBG, positivement régulée par les œstrogènes, favorise une hypercorticotéronémie tandis qu'une concentration trop faible favorise plutôt une hypocorticotéronémie. Ces deux sens de dérégulations conduisent à une augmentation des comportements de type « dépressifs ». Enfin, nous observons que l'influence positive des œstrogènes sur les niveaux de corticostérone nécessite un intermédiaire indispensable : la CBG. En effet, sans cette glycoprotéine, le dimorphisme sexuel n'est plus observé.

Notre modèle Cbg^{-/-} peut ainsi être considéré comme un modèle intéressant dans l'étude de la dépression majeure, les deux volets symptomatiques mélancolique et atypique pouvant être modélisés, du moins par rapport à la dérégulation de la réactivité corticotrope.

Dans cette étude, l'absence de comparaison directe des concentrations de corticostérone libre après le stress entre les mâles et les femelles fait défaut. Ainsi nous avons programmé une expérience visant à soumettre des mâles et des femelles adultes Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-} à un test de nage forcée, le soir. Nous prévoyons de les sacrifier immédiatement après le test afin de récolter le sang par ponction cardiaque et de mesurer la concentration de l'hormone libre dans le plasma en condition de stress, induit par ce test comportemental.

De plus, les échantillons de plasmas collectés après l'expérience d'ovariectomie ont été envoyés au Pr. Anne Duittoz (laboratoire Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France) afin de doser les concentrations plasmatiques de 17- β -œstradiol (E2) dans nos 6 groupes de femelles et de confirmer que les concentrations d'E2 sont effectivement diminuées par l'ovariectomie puis augmentées par l'implant d'E2. D'autre part, nous souhaitons confirmer que les femelles contrôles Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-} présentent des concentrations similaires d'E2 au

cours du cycle et ainsi que l'absence de CBG ne perturbe pas le cycle œstral de ces souris Cbg^{-/-}. Par ailleurs, nous avons réalisés des frottis vaginaux sur des femelles Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-} sur 1 semaine (soient 2 cycles œstral, un cycle durant 4,5 jours chez la souris) que nous avons observé au microscope après coloration à l'Hémalun de Mayer 5 % et à l'éosine 5 ‰. En effet, une modification histologique de la muqueuse vaginale s'opère au cours du cycle œstral (d'une durée de 4.5 jours chez la souris). Trois types cellulaires sont observés (cellules épithéliales nucléées de Malpighi avec ou sans filaments de mucus, cellules kératinisées, leucocytes) et selon leur proportion il est possible d'établir à quel stade du cycle œstral se situe la souris (Hubscher et al., 2005). La **Figure 21** schématise les modifications histologiques de la muqueuse vaginale au cours du cycle œstral chez la souris.

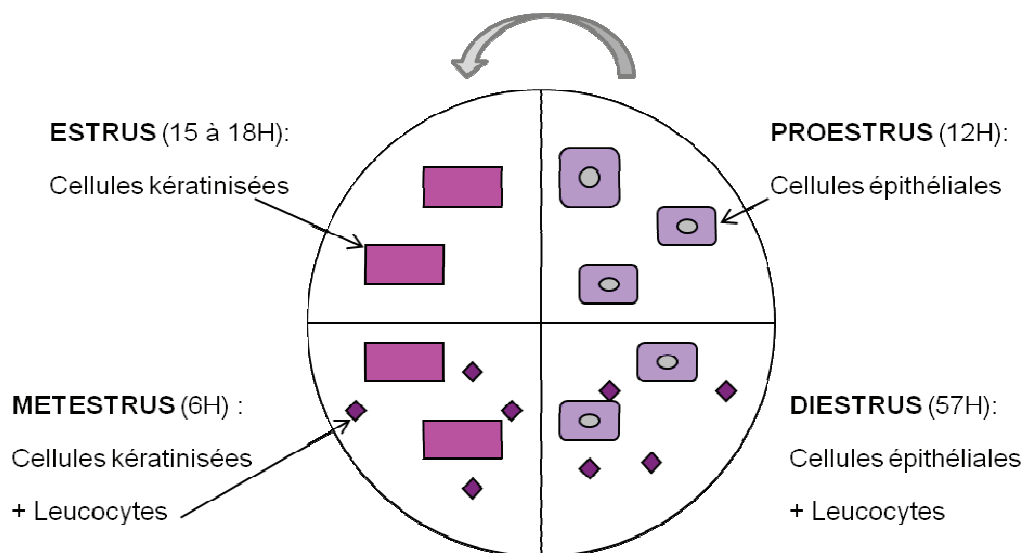


Figure 21 : Représentation schématique des modifications histologiques de la muqueuse vaginale au cours du cycle œstral chez la souris.

Nous avons observé que les souris Cbg^{-/-} et Cbg^{+/+} présentent un cycle œstral identique. De plus, le déroulement des reproductions des souris Cbg^{+/+} comme des Cbg^{-/-} est identique et les portées sont de taille similaire.

Cette étude est présentée dans la partie suivante sous forme d'article scientifique que nous allons soumettre à un journal scientifique lorsque ces expériences supplémentaires auront été faites.

IV. Publication n°3

Sex differences in stress sensitivity are strikingly influenced by corticosteroid binding globulin in mice

Minni A.M (1,2), Helbling J.C. (1,2), Duittoz A. (3), Tridon C. (1,2), Marissal-Arvy N. (1,2), De Smedt-Peyrusse V. (1,2), & Moisan M.P. (1,2)

(1) INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France

(2) Univ. de Bordeaux, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France

(3) INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France

Corresponding author : Marie-Pierre Moisan

INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, Université de Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

Tel : +33 557 579214

Fax : +33 557 571227

Email: mpmoisan@bordeaux.inra.fr

Keywords: glucocorticoid, stress, sex difference, depression, transcortin, estrogens

Abstract

Background- Sex differences exist for stress reactivity as well as for the prevalence of depression which is more frequent in women. Corticosteroid binding globulin (CBG) is thought to influence sex differences of glucocorticoid stress response. Its deficiency in a mouse model (Cbg^{-/-}) leads, in males, to an altered stress response and an increased "despair-like" behavior. Thus, the role of CBG in female mice was explored as a possible factor influencing female sex bias for "depression-like" symptoms.

Methods- Emotional behaviors were evaluated in forced swim, tail suspension, open-field and elevated plus maze tests. Additionally, corticosterone levels were measured in plasma and in urine as well as after stress. The role of estrogens was examined by ovariectomy and estradiol replacement.

Results- Females, both wild-type and Cbg^{-/-}, presented an enhanced despair-like behavior compared to wild-type male mice. Additionally, wild-type females showed higher levels of circulating and urine corticosterone levels compared to wild-type males. However, in Cbg^{-/-} mice, whatever sex, these corticosterone levels were markedly reduced. Finally, we found that in wild-type females, estrogens levels positively modulate CBG and corticosterone levels as well as despair-like behaviors. However, these regulations were not observed in Cbg^{-/-} mice.

Conclusions- These results show that CBG is essential in sex differences of stress sensitivity leading to despair-like behavior in mice. Indeed, CBG contributes to the fine-tuning of glucocorticoids levels (hyper- or hypo-) and is an essential mediator of estrogens action on corticosterone concentrations. This mechanism may explain part of the sex differences observed in humans for depressive symptoms.

Introduction

Women and men present differential risks in the occurrence and symptomatology of depression, with women of reproductive age being around two times as likely as men to report a lifetime history of major depressive episode (Kessler et al., 1993; Wittchen et al., 2011). While social factors certainly contribute to these differences, biological sex differences are known to play an important role (Schotte et al., 2006). Physiologic stress responses, in particular hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity culminating in glucocorticoid release, are believed to be involved. This endocrine system is deregulated in a significant number of depressive patients who generally present a hyper- activity of the HPA axis i.e. increased cortisol levels often explained by an impaired feedback regulation (Pariante and Lightman, 2008). Although much less studied, the HPA axis dysregulation observed in depression can also result, at the opposite, to a hypo-activity, leading to lower or inefficient cortisol levels (Gold and Chrousos, 2002; Raison and Miller, 2003; Bremner et al., 2007).

Sex differences in HPA axis regulation are well documented in animal (Handa et al., 1994; Rhodes and Rubin, 1999) as well as in human studies (Kudielka and Kirschbaum, 2005; Kajantie and Phillips, 2006). Both basal and stimulated HPA axis activities are generally increased in female compared to male rodents (Rhodes and Rubin, 1999). In human studies, reported sex differences in HPA axis response to stress are inconsistent as they appear to be influenced by age, type of stressors, phase of the menstrual cycle or oral contraceptive intake (Kudielka et al., 2009). Prime candidates for explaining such sex differences are circulating gonadal steroids levels with estradiol known to increase (except during pregnancy) and testosterone to

decrease both ACTH and cortisol (corticosterone in rodents) responses to stress (Handa et al., 1994; Seale et al., 2004a, 2005a). Estradiol has been shown to increase central HPA axis drive in rodents through its stimulating effects on corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression (Solomon and Herman, 2009). Additionally, estrogens are thought to increase glucocorticoids levels indirectly by positively stimulating corticosteroid binding globulin (CBG) synthesis as observed during pregnancy (Moore et al., 1978) or after oral contraceptives intake containing ethinyl-estradiol (White et al., 2006; Qureshi et al., 2007).

CBG or transcortin is the high-affinity transport protein for glucocorticoids in vertebrate blood. This plasma glycoprotein plays an essential role in glucocorticoid disposition and delivery to target tissues (Gagliardi et al., 2010; Moisan, 2010). In a previous study (Richard et al., 2010), we showed that CBG deficiency in male mice led to an insufficient glucocorticoid signaling associated with an increase of despair-like behaviors. In the present study, by analyzing *Cbg*^{-/-} females, we show that sex differences in emotional behavior and HPA axis activity are dependent on estrogen-induced CBG expression. First we show that both wild-type and CBG-deficient females present "despair-like" behaviors compared to wild-type males. Then we provide evidence that this enhanced emotional sensitivity is associated with increased corticosterone levels in wild-type females but blunted ones in *Cbg*^{-/-} females. Finally, we show by ovariectomy and estrogen replacement, that estrogen-induced CBG is essential for these emotional and corticosterone sex differences.

Methods

Animals

Knock-out Cbg mice (MGI ID : 4833641, *Serpina6*^{tm1.1Mmp}) were produced in our laboratory in Bordeaux (Richard et al., 2010). Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice were littermates obtained by breeding Cbg^{+/-} males and females. Mice used in the present work have a C57BL/6J genetic background above 95%. Animals were maintained in an animal room (23°C) with a 12h light/dark cycle (lights on at 0700h) and with *ad libitum* access to food and water. All the experiments were conducted in strict compliance with current European Conventions (86/609/CEE) and approved by Institutional Committee.

All mice (8–10 weeks of age) were housed individually 1 week before the experiments. All behavioral tests, conducted in the morning between 0600h and 1300h, were recorded with a ceiling-mounted video camera and analyzed using specific software (The Observer, Noldus, Wageningen, The Netherlands). Previously, vaginal smears were performed in Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} females to check that CBG deficiency do not disturb the ovarian cycle.

Experiment 1: Emotional behavior analysis

Male and female Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} were submitted to a tail suspension test (TST) and forced swim test (FST) one week later. TST was carried out as previously described (Steru et al., 1985). Briefly, an adhesive tape was fixed to the mouse tail (distance from the tip of the tail = 2cm) and hooked to a horizontal ring stand bar placed 30cm above the floor. The test was conducted for a period of 6 min during which immobility duration (s) was recorded. FST is described in our last study

(Richard et al., 2010). Each mouse was placed in a cylinder (height, 32.5cm; diameter, 15cm) containing 3 l of water (16cm) at $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The water was changed between subjects. A mouse was judged immobile when it stopped any movements except to remain afloat. Immobility behaviors in the FST were expressed in immobility occurrence. Two experimentators recorded immobility and swimming behaviors every 10 s over a period of 6 min as described (Bolanos et al., 2008).

New groups of Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice were used to perform elevated-plus-maze and open-field a week later. The elevated-plus-maze apparatus consisted of two opposing open arms (30 x 8cm) and two opposing closed arms (30 x 8 x 15cm) extending from a 8 x 8cm central platform and elevated 1m from the ground. Each mouse was first placed onto the central platform facing an open arm and then left to explore freely for 5 min. Parameters recorded were number of open and closed arm entries and time spent on the various sections of the maze. The percentage of time spent in open arms ($(\text{time in open arms} / (\text{time in open} + \text{closed arms})) \times 100$) was used as an index of anxiety and total number of entries in closed arms as an index of locomotor activity. The open-field apparatus was a square area (40 x 40cm) with 16cm high walls. The floor was divided into 16 squares (10 x 10cm). Mice were placed in the central area and allowed to explore freely for 10min. The total number of squares crossed was recorded as an index of locomotor activity. The percentage of time spent in the center (four inner squares) was recorded as index of anxiety.

Experiment 2: HPA axis activity analyses

For nycthemeral experiments, blood and urine samples were collected every 4 hours from 0700h to 2300h in male and females Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice. Blood samples were obtained by tail nick and collected in tubes containing 10% EDTA in

less than 2 min to obtain basal levels. After 10min of centrifugation (10,000rpm), plasma samples were collected and kept at -80°C . Urine samples were collected during tail nick using a Petri dish placed under the mouse and kept at -80°C .

Total corticosterone was measured by an in-house RIA in plasma and urine samples (see (Richard et al., 2010) for details). Anti-corticosterone antibody was provided by Dr. H. Vaudry (University of Rouen, France). Urine samples were first extracted with dichloromethane and creatinine concentration was measured by a commercial kit (Kit Biomerieux Creatinine cinétique) in the same urine samples to normalize corticosterone concentrations between samples.

Plasma CBG was then measured in new groups of Cbg^{+/+} male and female mice that were anesthetized with isoflurane (Aerrane, Baxter SA, Maurepas, France) before withdrawing about 1ml of blood by cardiac puncture. Animals were then sacrificed by decapitation. CBG maximum binding capacity was measured by saturation curve and Scatchard analysis as described in (Richard et al., 2010) using a standard curve of tritiated corticosterone up to 32nM.

Free corticosterone was measured in the morning (0900h) and the evening (1900h) in new groups of Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} female mice. Blood samples were collected and animals were sacrificed as described above. Free corticosterone was measured by isotopic dilution and plasma ultrafiltration using Centrifree filter device (YM membranes 30K, Millipore, France) as in (Richard et al., 2010). Free corticosterone percentage was calculated as the ratio of cpm filtrate (free corticosterone) / cpm retentate (bound corticosterone). Free corticosterone concentration was obtained as percentage free corticosterone multiplied by total corticosterone concentration measured by prior RIA.

Total and free corticosterone after stress was measured in the plasma of animals of experiment 1 immediately after the FST.

Experiment 3: Effect of ovariectomy and 17 β -estradiol (E2) replacement on behavior, corticosterone and CBG

Bilateral ovariectomies (OVX) or sham surgeries were performed under continuous anesthesia (2% isoflurane and 2% oxygen) on mice. One week later, a silastic implant of 17 β -estradiol (OVX E2) was implanted subcutaneously into the back of half of the OVX animals. To activate and stabilize the hormone release, implants were incubated in gelatin-phosphate-buffered saline 24h before use.

The E2 pellets of 2cm length were prepared in-house according to the method described by (Cohen and Milligan, 1993). These pellets produced a slow and continuous release of E2 and have been shown to maintain estrogens plasma levels of around 3-4 pg/ml as observed in males.

Two weeks after ovariectomy mice were submitted to a TST and then to a FST one week later. Mice were sacrificed 5h after the forced swim. At sacrifice, we confirmed that all ovariectomized mice (OVX and OVX E2) had ovaries removed. Moreover, to have an indication about the quantity of estradiol production, uteri were weighted and were related to mice body weights. As expected (Cohen and Milligan, 1993), uteri weights were lower for ovariectomized mice indicating a diminished or abolished estradiol production on OVX mice.

As above, plasma samples for corticosterone and CBG measurements were obtained from blood withdrawn by cardiac puncture just before sacrifice.

Statistics

All results were expressed as mean \pm S.E.M. Outliers with value that differed to more than 2 S.D. from the mean were excluded from analysis. Statistics were calculated with the software Statistica v.8.

Two-way analyses of variance (ANOVA) followed by Fisher LSD post-hoc tests were used to detect sex and genotype effects in experiment 1 and in experiment 2, genotype and treatment effects (sham, OVX and OVX E2) in experiment 3. For nycthemeral experiments, two-way ANOVA of repeated measures were performed on genotype and time effects for plasma and urine corticosterone. For other endocrine measures and behavioral tests, genotype effect was detected by unpaired Student *t* test. The level of statistical significance was set as *p* values <0.05 in all tests. On graphs, one symbol indicated a $p < 0.05$, two symbols $p < 0.01$ and three symbols $p < 0.001$, ns: not significant.

Results

1) Sex difference in despair-like behavior is not found in Cbg^{-/-} mice

We have analyzed males and females Cbg^{-/-} and their wild-type controls in two tests of despair-like behavior: the tail suspension test (TST) and the forced swim test (FST). By two-way ANOVA on sex and genotype, a significant genotype ($F_{(1,32)} = 9.5$, $p < 0.01$ for TST; $F_{(1,32)} = 30.5$, $p < 0.001$ for FST) but no sex effect ($F_{(1,32)} = 0.29$, $p = 0.59$ for TST; $F_{(1,32)} = 1.32$, $p = 0.06$ for FST) were detected. However, a significant interaction of sex and genotype for immobility time was detected in the

TST ($F_{(1,32)} = 5.69$, $p < 0.05$) and FST ($F_{(1,32)} = 9.14$, $p < 0.001$). Post-hoc analyses revealed that Cbg^{-/-} male mice showed higher immobility than wild-type males in both tests ($p < 0.01$ for TST and $p < 0.001$ for FST). Interestingly, this genotype difference was not observed between Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} female mice ($p > 0.05$). Furthermore, wild-type females showed higher immobility than wild-type males in both TST ($p < 0.05$) and FST ($p < 0.001$). Regarding Cbg^{-/-} mice, males and females were not found different ($p > 0.05$ in both tests). To further characterize female Cbg^{-/-} emotional responses, elevated plus maze and open-field tests were performed on new groups of Cbg^{-/-} and Cbg^{+/+} mice (supplemental Figure S1). We observed no difference in the percentage of time spent in open arms of the elevated plus maze ($t_9 = 0.33$, $p = 0.75$) and in time spent in the central arena of the open field ($t_8 = 0.25$, $p = 0.81$). Furthermore, locomotor activity evaluated by the number of entries in closed arms of the elevated plus maze ($t_9 = 1.4$, $p = 0.28$) and the number of squares crossed in the open field ($t_8 = 0.40$, $p = 0.70$) were similar between genotypes, demonstrating that CBG deficiency did not induce locomotor disturbances.

Given the role of CBG in corticosterone levels regulation and its previously shown impact on despair-like behavior in males (Richard et al., 2010), we then evaluated some HPA parameters in Cbg^{-/-} females.

2) Sex differences in HPA regulation are not found in Cbg^{-/-} mice

Total plasma corticosterone concentrations were measured during the diurnal cycle in male and female mice (Figures 2A & B). Two-way ANOVA on total corticosterone data in males detected strong genotype ($F_{(1,9)} = 19.1$, $p < 0.001$) and time ($F_{(4,36)} = 17.3$, $p < 0.001$) effects, and a significant genotype x time interaction ($F_{(4,36)} = 7.1$, $p < 0.001$). As in males, a strong genotype ($F_{(1,19)} = 26.0$, $p < 0.001$) and

time ($F_{(4,76)} = 7.2, p < 0.001$) effects and a significant genotype x time interaction ($F_{(4,76)} = 4.9, p < 0.001$) were observed in females. Wild-type females showed a higher peak of corticosterone levels (216.5nM versus 180.5nM in Cbg+/+ males) whereas Cbg-/- females and males have equivalent peak values (39nM vs. 41nM in Cbg-/- males).

To know if the reduced circulating corticosterone pool in Cbg-/- mice is due to a difference in production rate, we also measured corticosterone in urine across the circadian cycle in the same animals. A significant genotype effect was detected ($F_{(1,25)} = 6.74, p < 0.01$) but neither sex nor sex by genotype interaction were observed for area under the curve (AUC) of urine corticosterone. Cbg-/- female mice had reduced AUC values (152.5 ± 21.0 vs. 227.6 ± 18.9 in Cbg+/+ females), 33% lower than their Cbg+/+ controls ($p < 0.05$) but Cbg+/+ and Cbg-/- males were not different (Figure 2C), indicating that the elevated corticosterone secretion of females is CBG dependent.

Plasma CBG was then measured in wild-type male and female mice (Figure 2D). We observed that levels of plasma CBG were 22.4% higher in Cbg+/+ females than Cbg+/+ males ($t_9 = 9.1, p < 0.05$).

To analyze the effect of CBG deficiency further, free plasma corticosterone levels were measured during the resting phase (0900h) and at the beginning of the active phase (1900h) on a new group of females (Figure 3). No significant difference was observed for free corticosterone concentrations between females mice in the morning ($t_{12} = 0.08, p = 0.94$). However, in the evening a significant genotype effect ($t_7 = 3.2, p < 0.05$) was detected, CBG deficiency resulting in decreased free corticosterone compared to Cbg+/+ females (Figure 3A). Total and free corticosterone levels were also measured in the plasma collected immediately after

the FST presented above to evaluate corticosterone response after stress. A significant genotype effect ($t_{11} = 61.9$, $p < 0.001$) was found for total corticosterone (751.7 ± 60.2 nM in Cbg^{+/+} vs. 162.1 ± 8.5 nM in Cbg^{-/-}, data not shown) as well as for free corticosterone concentrations ($t_{11} = 10.1$, $p < 0.001$, Figure 3B) that were reduced by 65% in Cbg^{-/-} compared to Cbg^{+/+}.

Thus, the elevated corticosterone secretion and the higher plasma CBG concentration in wild-type females compared to wild-type males may explain differences in despair-like behavior. Paradoxically, Cbg^{-/-} females have too low corticosterone levels, similar to Cbg^{-/-} males, but are presenting equally increased despair-like behavior compared to wild-type males. Thus, CBG appears to be strongly involved in the corticosterone levels regulation that, when dysregulated towards too high or too low levels, favors the development of despair-like disorder in mice.

Estrogens are known to positively influence both corticosterone and CBG levels. Given the sex differences found above, we performed ovariectomy and E2 replacement on controls and Cbg^{-/-} females in order to analyze the role of estrogens in the association of despair-like behavior, corticosterone and CBG levels.

3) CBG is essential for estrogen-induced sex differences

Ovarian hormones influence was analyzed by comparing three groups of Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} female mice: ovariectomized (OVX), ovariectomized supplemented with an E2 pellet (OVX E2) and a control sham-operated group (sham).

For the TST (Figure 4A), two-way ANOVA revealed a significant treatment effect ($F_{(2,44)} = 4.22$, $p < 0.05$), a significant genotype effect ($F_{(1,44)} = 11.22$, $p < 0.01$),

and a significant genotype x treatment interaction ($F_{(2,44)} = 7.38, p < 0.01$). Among wild-type females Cbg^{+/+} OVX had immobility scores decreased by 44% compared to Cbg^{+/+} sham ($p < 0.01$) whereas immobility scores of Cbg^{+/+} OVX E2 were not different from sham. No difference was observed among Cbg^{-/-} females whatever the treatment. A difference between genotype was detected only in the OVX group ($p < 0.001$) with immobility scores 54.4% lower in Cbg^{+/+} OVX compared to Cbg^{-/-} OVX.

In FST, similar results were observed (Figure 4B). Two-way ANOVA showed a significant treatment effect ($F_{(2,44)} = 4.01, p < 0.05$), a significant genotype effect ($F_{(1,44)} = 19.87, p < 0.001$) and a nearly significant genotype x treatment interaction ($F_{(2,44)} = 2.80, p = 0.07$). Again, no difference was observed among Cbg^{-/-} females whatever the treatment. Immobility scores of Cbg^{+/+} OVX mice were significantly reduced by 40.4% ($p < 0.001$) compared to sham Cbg^{+/+} mice whereas immobility scores of Cbg^{+/+} OVX E2 mice was not significantly different from sham but slightly increased compared to OVX Cbg^{+/+} ($p < 0.05$). Difference between genotype was found for OVX groups ($p < 0.001$) with immobility scores 47.1% lower in Cbg^{+/+} OVX compared to Cbg^{-/-} OVX and a moderate difference for OVX E2 female group ($p < 0.01$) with Cbg^{+/+} OVX E2 displaying 28.4% immobility scores lower than Cbg^{-/-} OVX E2 mice.

Plasma was collected on these animals to measure corticosterone and CBG concentrations. Two-way ANOVA done on total corticosterone (Figure 4C) showed significant treatment ($F_{(2,42)} = 18.53, p < 0.001$), genotype ($F_{(1,42)} = 98.61, p < 0.001$) and genotype x treatment interaction effects ($F_{(2,42)} = 22.74, p < 0.001$). Among Cbg^{+/+} mice, corticosterone levels were significantly decreased by OVX (66.2%, $p < 0.001$) and partially restored in OVX E2 treatments (38.6% higher than those of OVX, $p < 0.05$). In Cbg^{-/-} mice, no difference in corticosterone levels was observed

between sham, OVX and OVX E2 mice. Corticosterone levels in Cbg^{-/-} mice were lower than wild-type females ($p < 0.001$) except for OVX group where no difference between genotype was detected ($p = 0.23$).

A one-way ANOVA conducted on plasma CBG measures of Cbg^{+/+} female mice (Figure 4D), revealed a nearly significant effect of treatment ($F_{(1,26)} = 2.95$, $p = 0.06$), CBG levels were decreased (33.4%, $p < 0.05$) in OVX compared to sham Cbg^{+/+} females and OVX E2 had intermediary levels statistically not different from either OVX or sham mice.

Discussion

Genetic, environmental factors and their interactions can lead to an inappropriate stress response, embodied by a hyper- or hypoactivity of the HPA axis, that in turn play an important role in the vulnerability to develop depressive disorders (Herbert et al., 2006a; Anacker et al., 2011). Gender differences are observed in the prevalence of depressive disorders in humans as well as in cortisol response to stress reactivity in both humans and rodents. However, female rodent models are far less characterized than male rodents in biomedical research including stress-associated despair-like behaviors (Kim et al., 2010; Wald and Wu, 2010; Zucker and Beery, 2010). In this study, we examined the role of CBG in emotional behaviors and HPA axis regulation in female mice, as CBG is involved in HPA sex differences and its deficiency in males is associated with increased “despair-like” behavior and glucocorticoid hyposignaling (Richard et al., 2010).

We found that wild-type females have endogenous higher immobility scores compared to males in both forced swim and tail suspension tests. Sex differences in immobility scores of FST have been found before by some authors in wild-type mice (Bale and Vale, 2003; Frye, 2011) or rats (Dalla et al., 2010) but not by others (LaPlant et al., 2009). The reasons for these discrepancies between studies are unclear but may relate to paradigm differences in the forced swim test or to the ovarian cycle period, increased immobility being typically observed in diestrous females (Frye, 2011). We found that this sex difference in despair-like behavior, observed in two tests, is CBG-dependent as it no longer appeared between CBG-deficient male and female animals. Indeed, *Cbg*^{-/-} males showed increased immobility behavior equivalent to *Cbg*^{-/-} females but also to *Cbg*^{+/+} females.

No genotype difference was found for other emotional behaviors measured in elevated plus maze and open-field tests. Furthermore, because no difference was observed in the locomotor activity between wild-type and *Cbg*^{-/-} female mice, we thus conclude that the effect of CBG deficiency is specific to "despair-like" behavior. This specificity was also found in our previous study for *Cbg*^{-/-} males where despair-like behavior measured in forced swim and learned helplessness was increased compared to *Cbg*^{+/+} but other emotional responses were equivalent between genotypes (Richard et al., 2010).

Because of the role of CBG in HPA axis regulation and the impact of its deficiency in males on despair-like behavior, we analyzed corticosterone levels in female *Cbg*^{-/-} and control mice. We found that both plasma and urine corticosterone concentrations are higher in female than male *Cbg*^{+/+}, suggesting that the well described elevated corticosterone levels in female rodents (Handa et al., 1994) stems from a different production rate. Neither plasma nor urine corticosterone levels

differences were observed between Cbg^{-/-} female and male mice, indicating that CBG plays an essential role in the sex difference of corticosterone secretion found in wild-type animals. Furthermore, a strong difference was found in evening and post-stress free corticosterone levels between Cbg^{-/-} and wild-type females. The latter have elevated free corticosterone levels compared to levels reported in males; besides, Cbg^{-/-} females have reduced levels after stress similar to those found in Cbg^{-/-} males (Richard et al., 2010). Thus, elevated corticosterone levels in wild-type females may explain their endogenous high despair-like behavior whereas too low corticosterone rise after stress may be responsible for Cbg^{-/-} despair-like behavior in females as reported in males (Richard et al., 2010).

The effect of estrogens was then examined since these hormones are known to induce both CBG and corticosterone (Mataradze et al., 1992; Seale et al., 2004b) and to impact despair-like behavior in rodents (Becker et al., 2007). As expected both CBG and corticosterone levels were decreased by ovary removals in our wild-type females and restored, although not fully, by E2 replacement. In our conditions E2 concentrations through pellet implantation may not have been sufficiently optimal to reproduce previous studies on ovariectomized rats showing full recovery of corticosterone levels by E2 replacement (Seale et al., 2004a). Importantly, in Cbg^{-/-} females, ovariectomy and E2 had no effect on corticosterone levels. These data suggest that corticosterone secretion in female mice is dependent on estrogen-induced CBG expression. Regarding “despair-like” behavior in wild-type females, ovariectomy decreased immobility behavior in both FST and TST and E2 replacement restored the immobility levels fully in the TST and partially in the FST. No effect of ovariectomy on the immobility behavior was observed in Cbg^{-/-} females.

Thus, estrogens are responsible for the increased despair-like behavior observed in wild-type females and their effect is observable only if CBG is present.

Collectively, our data suggest that the enhanced “despair-like” behavior observed in wild-type females is influenced by an increased corticosterone secretion that is induced by estrogens through CBG expression. Thus, CBG is a crucial and unavoidable intermediate in the positive regulation of corticosterone levels by estrogens. The association of corticosterone hypersecretion with despair-like behavior is congruent with mice models of constitutive corticosterone hypersecretion such as the forebrain glucocorticoid receptor knockout mice that display enhanced basal and post stress secretion of glucocorticoids associated with increased immobility in the TST and FST (Boyle et al., 2005; Kolber and Muglia, 2009). CBG levels are not reported in this model but we trust that they play a role in maintaining a high circulating glucocorticoid pool.

Conversely, we believed that the “despair-like” behavior of *Cbg*^{-/-} females is due to a hypoactive glucocorticoid signaling in stress condition as previously reported in our study in males (Richard et al., 2010). In this model, the lack of CBG cancelled out the estrogen induction of corticosterone levels. Thus, our rodent model is a good illustration of stress-induced dysregulation of HPA axis illustrated in Figure 5, with hypo-corticosterone reactivity (*Cbg*^{-/-} male and female mice) and hyper-corticosterone reactivity (*Cbg*^{+/+} females) that both induced a despair-like behavior. *Cbg*^{+/+} male mice appear as holding the optimal responsiveness of the stress system thanks to optimal CBG and corticosterone levels. Thus, CBG, by determining the glucocorticoid reservoir size, is a crucial factor contributing to the fine-tuning of glucocorticoids action.

In human, different forms of depression are found associated to an altered HPA axis activity and reactivity to stress. Melancholic depression is associated with hyperactivity of the HPA axis whereas atypical and seasonal depressions are linked to hypoactivity of the HPA (Gold and Chrousos, 2002; Bremmer et al., 2007) that are more frequently found in women. Although the literature is conflicting, it is generally thought that ovarian hormones are a predisposing factor (Becker et al., 2007). In this context, the Cbg^{-/-} mouse proves to be a very interesting animal model.

Acknowledgments

We wish to thank Pr. H. Vaudry for providing anti-corticosterone antibody, Pr. G. Hammond for very helpful discussions on CBG biochemistry and Pr. M. Darnaudery for critically reading the manuscript.

Financial disclosures

All authors of this manuscript reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

References

1. Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jonsson B, et al. (2011): The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol.* 21:655-679.
2. Kessler RC, McGonagle KA, Swartz M, Blazer DG, Nelson CB (1993): Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *JAffectDisord.* 29:85-96.
3. Schotte CK, Van Den BB, De Doncker D, Claes S, Cosyns P (2006): A biopsychosocial model as a guide for psychoeducation and treatment of depression. *DepressAnxiety.* 23:312-324.
4. Pariante CM, Lightman SL (2008): The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci.* 31:464-468.

5. Bremmer MA, Deeg DJ, Beekman AT, Penninx BW, Lips P, Hoogendijk WJ (2007): Major depression in late life is associated with both hypo- and hypercortisolemia. *BiolPsychiatry*. 62:479-486.
6. Raison CL, Miller AH (2003): When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *AmJPsychiatry*. 160:1554-1565.
7. Gold PW, Chrousos GP (2002): Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *MolPsychiatry*. 7:254-275.
8. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA (1994): Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *HormBehav*. 28:464-476.
9. Rhodes ME, Rubin RT (1999): Functional sex differences ('sexual diergism') of central nervous system cholinergic systems, vasopressin, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mammals: a selective review. *Brain ResBrain ResRev*. 30:135-152.
10. Kudielka BM, Kirschbaum C (2005): Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *BiolPsychol*. 69:113-132.
11. Kajantie E, Phillips DI (2006): The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*. 31:151-178.
12. Kudielka BM, Hellhammer DH, Wust S (2009): Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology*. 34:2-18.
13. Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Harbuz MS, Lightman SL (2004): Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *JNeuroendocrinol*. 16:989-998.
14. Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Harbuz MS, Lightman SL (2005): Postnatal masculinization alters the HPA axis phenotype in the adult female rat. *JPhysiol*. 563:265-274.
15. Solomon MB, Herman JP (2009): Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. *Physiol Behav*. 97:250-258.
16. Moore DE, Kawagoe S, Davajan V, Nakamura RM, Mishell DR (1978): An in vivo system in man for quantitation of estrogenicity. II. Pharmacologic changes in binding capacity of serum corticosteroid-binding globulin induced by conjugated estrogens, mestranol, and ethinyl estradiol. *AmJObstetGynecol*. 130:482-486.
17. White T, Ozel B, Jain JK, Stanczyk FZ (2006): Effects of transdermal and oral contraceptives on estrogen-sensitive hepatic proteins. *Contraception*. 74:293-296.
18. Qureshi AC, Bahri A, Breen LA, Barnes SC, Powrie JK, Thomas SM, et al. (2007): The influence of the route of oestrogen administration on serum levels of cortisol-binding globulin and total cortisol. *ClinEndocrinol(Oxf)*. 66:632-635.
19. Gagliardi L, Ho JT, Torpy DJ (2010): Corticosteroid-binding globulin: the clinical significance of altered levels and heritable mutations. *MolCell Endocrinol*. 316:24-34.
20. Moisan MP (2010): Genotype-phenotype associations in understanding the role of corticosteroid-binding globulin in health and disease animal models. *Mol Cell Endocrinol*. 316:35-41.
21. Richard EM, Helbling JC, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, et al. (2010): Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology*. 151:649-659.
22. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985): The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 85:367-370.
23. Bolanos CA, Willey MD, Maffeo ML, Powers KD, Kinka DW, Grausam KB, et al. (2008): Antidepressant treatment can normalize adult behavioral deficits induced by early-life exposure to methylphenidate. *BiolPsychiatry*. 63:309-316.
24. Cohen PE, Milligan SR (1993): Silastic implants for delivery of oestradiol to mice. *JReprodFertil*. 99:219-223.
25. Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM (2011): The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*. 36:415-425.

26. Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, De Kloet ER, Lightman SL, et al. (2006): Do corticosteroids damage the brain? *JNeuroendocrinol.* 18:393-411.
27. Wald C, Wu C (2010): Biomedical research. Of mice and women: the bias in animal models. *Science.* 327:1571-1572.
28. Kim AM, Tingen CM, Woodruff TK (2010): Sex bias in trials and treatment must end. *Nature.* 465:688-689.
29. Zucker I, Beery AK (2010): Males still dominate animal studies. *Nature.* 465:690.
30. Bale TL, Vale WW (2003): Increased depression-like behaviors in corticotropin-releasing factor receptor-2-deficient mice: sexually dichotomous responses. *JNeurosci.* 23:5295-5301.
31. Frye CA (2011): Progesterone reduces depressive behavior of young ovariectomized, aged progestin receptor knockout, and aged wild type mice in the tail suspension test. *JPsychopharmacol.* 25:421-428.
32. Dalla C, Pitychoutis PM, Kokras N, Papadopoulou-Daifoti Z (2010): Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic ClinPharmacolToxicol.* 106:226-233.
33. LaPlant Q, Chakravarty S, Vialou V, Mukherjee S, Koo JW, Kalahasti G, et al. (2009): Role of nuclear factor kappaB in ovarian hormone-mediated stress hypersensitivity in female mice. *BiolPsychiatry.* 65:874-880.
34. Mataradze GD, Kurabekova RM, Rozen VB (1992): The role of sex steroids in the formation of sex-differentiated concentrations of corticosteroid-binding globulin in rats. *JEndocrinol.* 132:235-240.
35. Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Bate E, Lightman SL, Ingram CD, et al. (2004): Gonadectomy reverses the sexually divergent patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *JNeuroendocrinol.* 16:516-524.
36. Becker JB, Monteggia LM, Perrot-Sinal TS, Romeo RD, Taylor JR, Yehuda R, et al. (2007): Stress and disease: is being female a predisposing factor? *J Neurosci.* 27:11851-11855.
37. Kolber BJ, Muglia LJ (2009): Defining brain region-specific glucocorticoid action during stress by conditional gene disruption in mice. *Brain Res.* 1293:85-90.
38. Boyle MP, Brewer JA, Funatsu M, Wozniak DF, Tsien JZ, Izumi Y, et al. (2005): Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *ProcNatlAcadSciUSA.* 102:473-478.

Figures legends**Figure 1****“Despair-like” behavior in CBG deficient male and female mice**

A, Immobility duration in the tail suspension test in Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} males and females. **B**, Immobility occurrence in a forced swim test in Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} males and females.

(n = 8-9 mice per group).

* Post-hoc *p* value vs. Cbg^{+/+} mice; # post-hoc *p* value vs. Cbg^{+/+} females; ns = not significant.

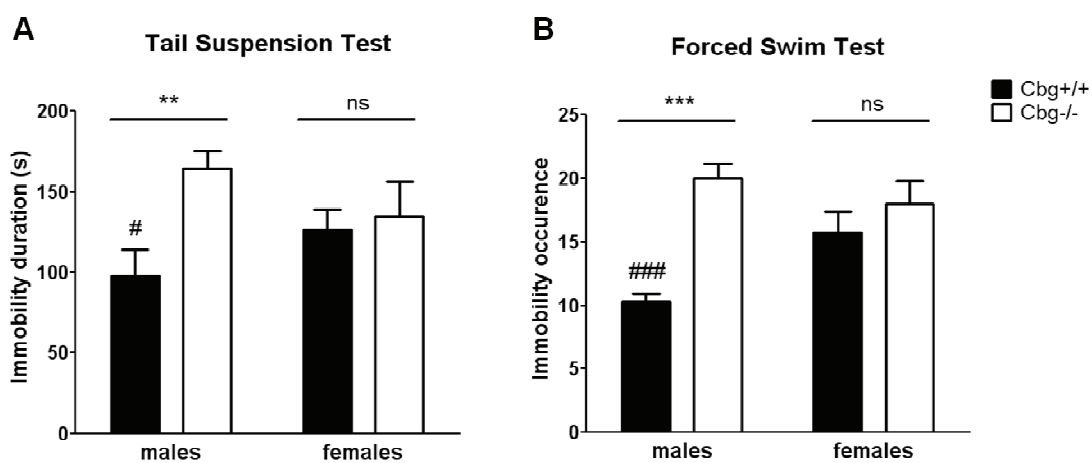


Figure 2**Corticosterone and CBG levels in basal condition in CBG deficient male and female mice**

A, Total plasma corticosterone (nM) levels across the circadian cycle in male (n = 5 Cbg^{+/+} and 6 Cbg^{-/-}) and **B**, in female (n = 10 Cbg^{+/+} and 11 Cbg^{-/-}) mice. **C**, Area under the curve (AUC) of circadian urine corticosterone levels in male (n = 5 Cbg^{+/+} and 6 Cbg^{-/-}) and female mice (n= 8 Cbg^{+/+} and 10 Cbg^{-/-}). **D**, plasma CBG (nM) in male and female Cbg^{+/+} mice (n = 5 per sex).

* Post-hoc *p* value Cbg^{+/+} vs. Cbg^{-/-} and Cbg^{+/+} males vs. females; # post-hoc *p* value vs. Cbg^{+/+} at time = 7 h.

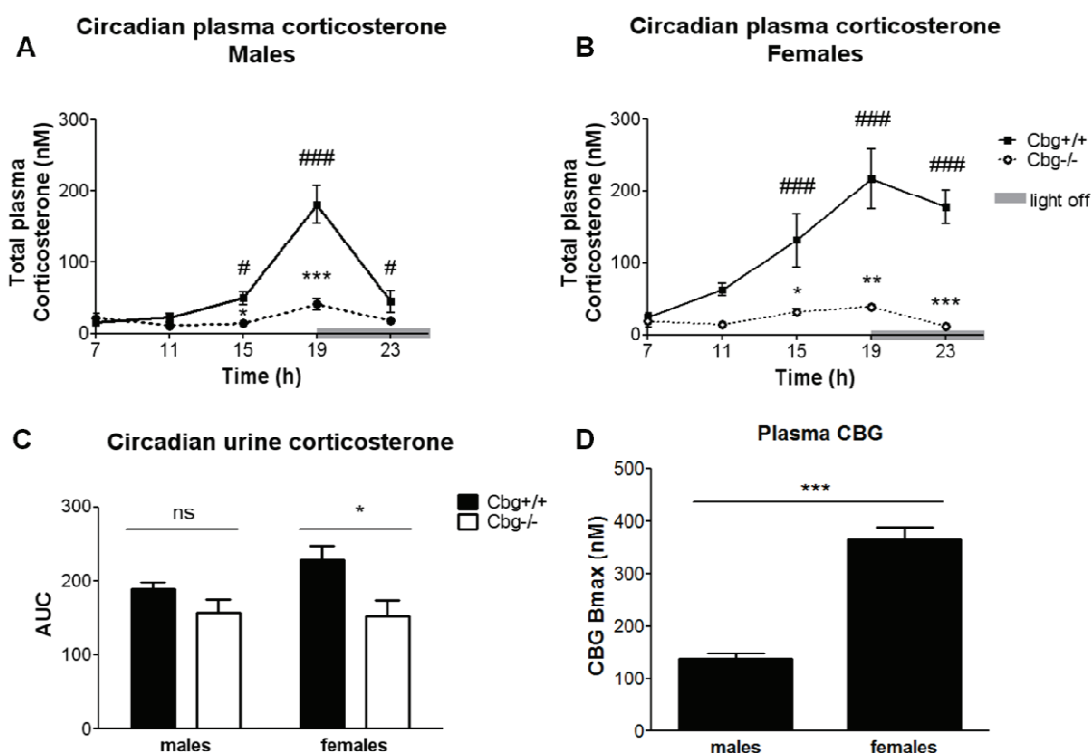


Figure 3**Free plasma corticosterone concentration in CBG deficient female mice.**

A, Free corticosterone levels (nM) in basal condition in resting phase (morning, 0900h, n = 7 Cbg^{+/+} and 7 Cbg^{-/-} female mice) and in the beginning of the active phase (evening, 1900h, n = 4 Cbg^{+/+} and 5 Cbg^{-/-} females). **B**, Free corticosterone levels (nM) measured immediately after stress induced by a forced swim test (n = 6 Cbg^{+/+} and 7 Cbg^{-/-} female mice).

* Post-hoc *p* value vs. Cbg^{+/+} female mice; ns = not significant.

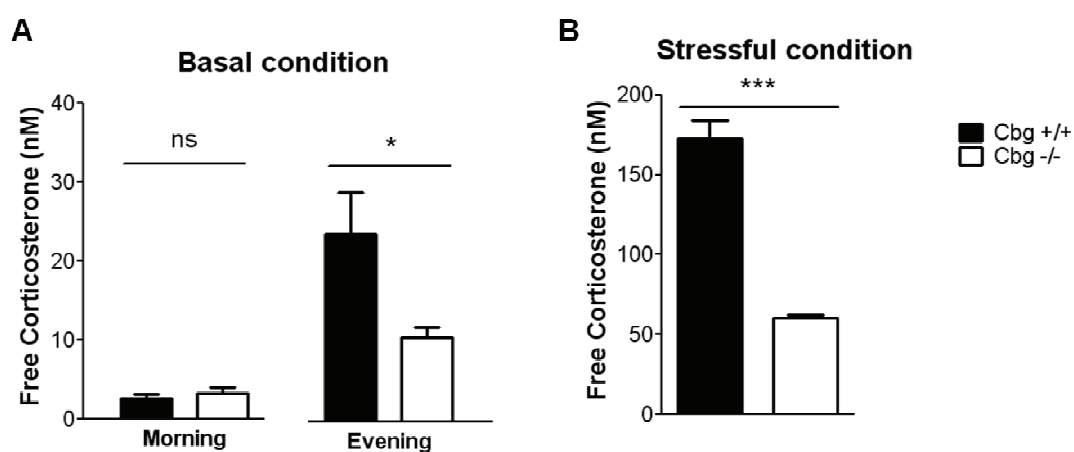


Figure 4

“Despair-like” behavior, total plasma corticosterone and plasma CBG in ovariectomized CBG deficient female mice.

A, Immobility duration in tail suspension test (n = 8 - 12 per group). **B**, Immobility occurrence in forced swim test (n = 8 - 12 per group). **C**, Plasma total corticosterone (nM) and **D**, plasma CBG (nM). Measures were done 5 h after stress induced by a forced swim test (n = 8 - 12 per group).

sham: sham-operated; OVX: ovariectomized; OVX E2: ovariectomized with E2 pellet

* Post-hoc *p* value Cbg+/+ vs. Cbg-/- for each treatment; + post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ sham-operated mice; # post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ OVX mice.

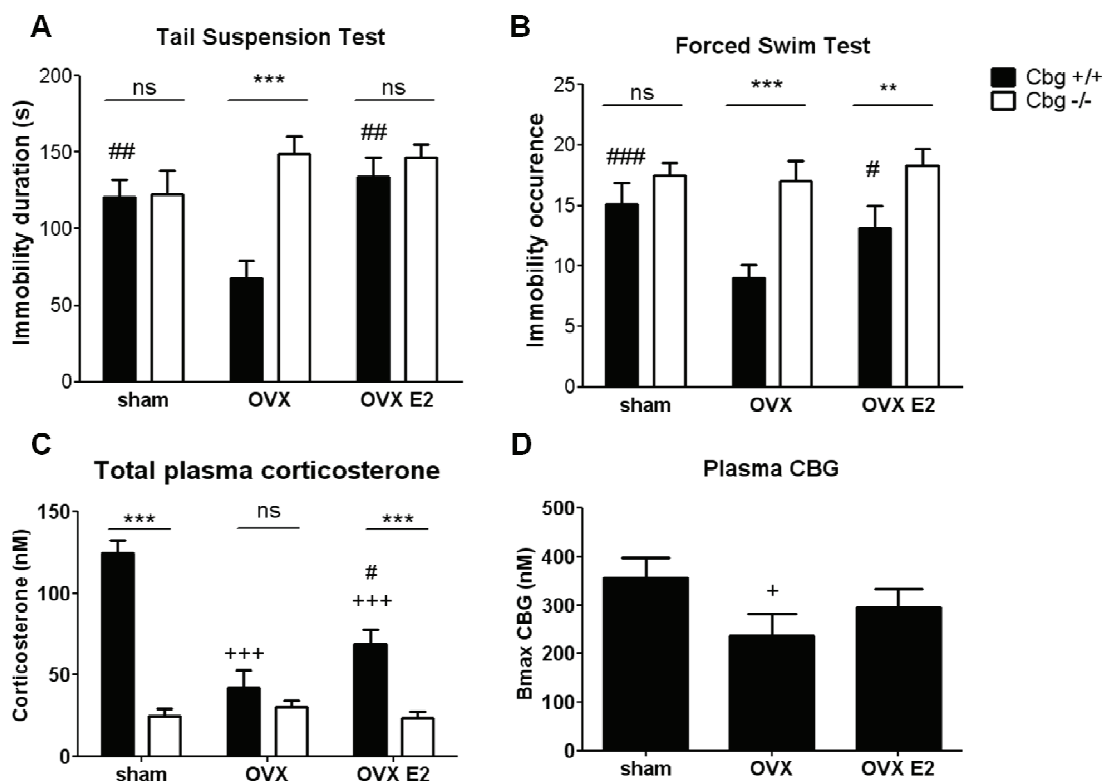


Figure 5**Stress-induced dysregulation of HPA axis leading to despair-like behavior modeled by CBG-deficient mice.**

CBG, by determining the glucocorticoid reservoir size is a crucial factor contributing to the fine-tuning of glucocorticoids action. *Cbg*^{-/-} male as female mice model hypocortisone reactivity to stress. *Cbg*^{+/+} female mice model hypercortisone reactivity to stress influenced by estrogens (E2) through CBG expression. These dysregulated stress reactivities induce a despair-like behaviors i.e. immobility behaviors in forced swim and tail suspension tests. *Cbg*^{+/+} male mice appear as holding the optimal responsiveness of the stress system thanks to optimal CBG and corticosterone levels.

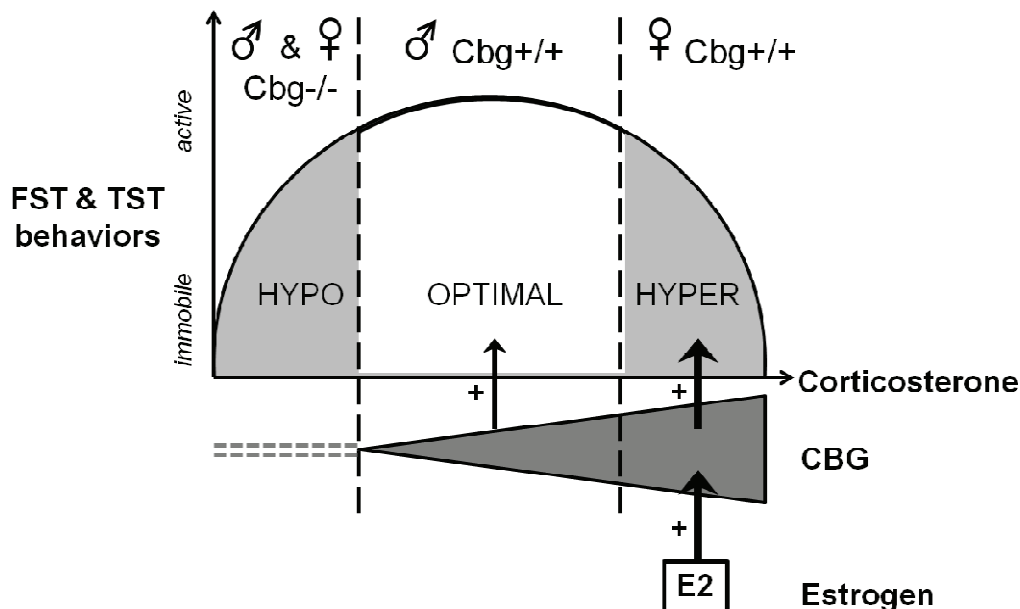
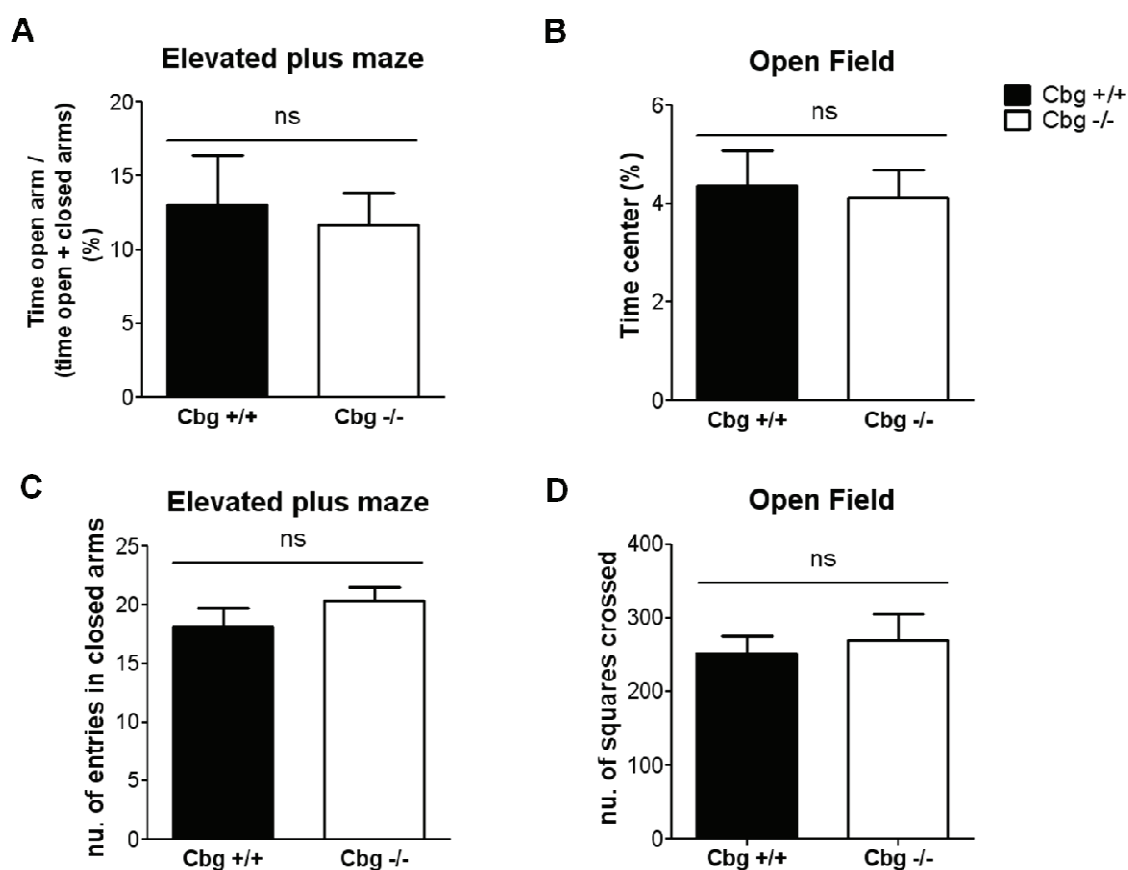


Figure supplementary 1

“Anxiety-like” behavior in CBG deficient female mice (n=5-6 mice per group). **A**, Percentage of time spent in open arms of the elevated plus maze. **B**, Percentage of time spent in center area of the open field. **C**, Number of entries in closed arms of the elevated plus maze. **D**, Number of squares crossed in the open field arena. Post-hoc *p* value: ns = not significant.



CHAPITRE 4 :

Effets d'un régime enrichi en gras associé à un stress chronique imprévisible sur la prise de poids et le développement de troubles émotionnels
Rôle de la CBG

Chapitre 4 : Effets d'un régime enrichi en gras associé à un stress chronique imprévisible sur la prise de poids et le développement de troubles émotionnels. Rôle de la CBG

I. Introduction

Dans nos sociétés modernes, l'obésité a pris des proportions alarmantes et est devenu de nos jours un important problème de santé public. En effet, d'après l'OMS plus d'un adulte sur deux est considéré en surpoids en Europe et 15% de ces individus sont déclarés obèses. Le style de vie stressant (qualifié de stress chronique) associé à une facilité d'accès à une alimentation trop riche (en gras et en sucre) favorisent cette « épidémie » d'obésité.

L'activation chronique de l'axe corticotrope due à l'effet du stress chronique peut conduire à une dérégulation de celui-ci (hyper ou hypo-actif). De même, un lien a pu être établi entre l'obésité et une dérégulation de l'activité de l'axe corticotrope. Par exemple, des patients atteints du syndrome de Cushing, caractérisé par un hypercortisolisme, prennent du poids rapidement (Carroll and Findling, 2010). Cependant, le stress chronique présente des effets bidirectionnels sur le poids et peut conduire également à une perte de poids. Il a d'ailleurs été observé que la réactivité de l'axe corticotrope et plus particulièrement la réponse du cortisol au stress peut être un marqueur de l'effet du stress chronique sur le poids en permettant de dissocier les personnes qui ont tendance à gagner ou à perdre du poids. En effet, cette étude, conduite chez la femme, a montré qu'une femme présentant une hyper-réponse du cortisol à un stress aigu mange plus et à l'inverse une femme hypo-réactive mange moins (Epel et al., 2001; Adam and Epel, 2007).

Nous l'avons vu au cours de cette thèse, la dépression est une autre pathologie qui résulte d'une dérégulation de l'activité de l'axe corticotrope. Une hyperréactivité au stress peut favoriser le développement de la dépression majeure à symptômes mélancolique alors qu'une hyporéactivité conduit plutôt à une dépression majeure à symptômes atypiques (Gold and Chrousos, 2002; Bremmer et al., 2007). Il est

intéressant d'observer qu'obésité et dépression coexistent dans nos sociétés modernes et montrent une forte comorbidité chez les patients.

L'environnement, le patrimoine génétique et leurs interactions peuvent favoriser le développement d'une réponse inappropriée aux effets du stress chronique par une dérégulation de l'axe corticotrope, qui en conséquence favorise le développement d'une vulnérabilité à développer, en l'occurrence, ces deux pathologies. Ainsi, il nous a semblé intéressant **d'étudier l'impact d'un « style de vie moderne » dans notre modèle de souris déficientes en CBG**, caractérisées par un hypocorticostéronisme en situation de stress associés à des troubles de type dépressifs. Nous avons alors placé des souris adultes Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-} sous un régime enrichi en gras (HF pour *High Fat*) pendant 20 semaines. Puis, après avoir mesuré une prise de poids significative chez ces animaux, une période de 4 semaines de stress chronique modéré et non prévisible (UCMS pour *Unpredictable Chronic Mild Stress*) a été associée. Ainsi, nous avons étudié la **conséquence de ces traitements combinés sur la prise de poids et sur les comportements émotionnels de ces souris Cbg^{-/-} et de leurs contrôles Cbg^{+/+}**.

II. Résumé des résultats

1) *Conséquences majeures du régime HF associé au stress chronique UCMS chez les souris Cbg^{-/-}*

Deux résultats surprenant ressortent de cette étude. Premièrement, les courbes de poids mettent en évidence que le régime HF utilisé dans cette étude entraîne une prise de poids importante et similaire entre les mâles Cbg^{-/-} et Cbg^{+/+}. Cependant, lorsque le protocole de stress chronique UCMS s'ajoute au régime HF, les souris Cbg^{-/-} perdent 18% de leur poids alors qu'aucun effet n'est observé chez les animaux contrôles. Le deuxième résultat marquant de cette étude porte sur le comportement de ces souris dans le test de la nage forcée. En effet, les souris Cbg^{+/+} ont un comportement d'immobilité augmenté par l'effet du stress chronique sous alimentation équilibrée mais aussi sous régime HF. Concernant les souris Cbg^{-/-}, comme pour l'effet du stress chronique de type défaite sociale présenté dans le

chapitre 1 de cette partie, le protocole d'UCMS dans la condition d'un régime équilibré n'a pas d'effet sur le comportement d'immobilité dans le FST de ces souris qui reste élevé. Ainsi, ces souris Cbg^{-/-} sont également insensibles aux effets du stress chronique UCMS. Par contre et de façon surprenante, lorsque l'UCMS est effectué dans la condition d'un régime HF, le comportement d'immobilité de ces souris est diminué de telle sorte qu'il n'est plus différent statistiquement de celui des animaux contrôles (non stressés et sous régime équilibré).

Afin d'expliquer ces différences marquantes, nous avons étudié les conséquences du régime HF associé au stress chronique UCMS sur la régulation de l'axe corticotrope, leurs conséquences métaboliques ainsi que leurs conséquences sur les paramètres neurobiologiques de l'humeur. Ainsi, nous avons mesuré la concentration de corticostérone totale dans le plasma le matin et le soir à l'issue des 4 semaines d'UCMS. Par RT-qPCR, nous avons mesuré l'expression de certains gènes impliqués dans l'activité de l'axe corticotrope, ainsi que l'expression de gènes régulés par les glucocorticoïdes et impliqués dans le métabolisme énergétique et dans la régulation de l'humeur. Les lipides plasmatiques et les monoamines cérébrales ont également été mesurés par chromatographie.

2) *De nouvelles informations apportées au modèle Cbg^{-/-} en situation basale*

Tout d'abord ces différentes mesures nous ont apporté de nouvelles informations sur notre modèle dans les conditions standard (sans stress et sous régime équilibré). En effet, en plus de présenter un comportement d'immobilité augmenté dans le FST, nous observons que des gènes normalement négativement régulés par les glucocorticoïdes sont surexprimés dans l'hippocampe des souris Cbg^{-/-}. C'est le cas par exemple des gènes $Il-6$ et $5-HT_{1A}$. Ces gènes jouant un rôle dans la régulation de l'humeur, leur surexpression pourrait favoriser l'augmentation du comportement d'immobilité observé dans le FST. De plus, le gène $Glut_4$ dont l'expression a été mesurée dans le muscle et qui est impliqué dans l'utilisation du glucose, de même que la concentration plasmatique des acides gras libres, sont quant à eux trouvés à des niveaux subnormaux. Ces observations suggèrent ainsi que le métabolisme

énergétique est plus faible chez ces animaux. Enfin, nous avons observé qu'au début de l'expérience, dans des conditions standards, les mâles Cbg^{-/-} sont ~9% plus lourds que les Cbg^{+/+} au même âge. De plus, l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des lipides (PPAR_γ et SREBP_{1C} dans le foie) est plus élevée, suggérant ainsi que la synthèse lipidique est augmentée et pourrait expliquer que ces animaux mutants sont plus lourds si ces données sont confirmées dans le tissu graisseux. Ces nouvelles observations confirment ainsi que les souris Cbg^{-/-} ont une capacité d'adaptation réduite face aux variations environnementales en raison de leur hypocorticisme associé à des altérations comportementales et endocrines.

3) Conséquences biologiques du régime HF associé au stress chronique UCMS chez les souris Cbg^{-/-}

Nous observons chez les souris Cbg^{+/+} que les niveaux de corticostérone totale plasmatique sont augmentés par le régime HF, diminués par le stress chronique UCMS et normalisés lorsque le régime HF et l'UCMS sont combinés. Les souris Cbg^{-/-} quant à elles, présentent les mêmes profils de résultats, mais les variations de la corticostérone sont émoussées.

L'expression des gènes MR, GR, 11βHSD1 dans l'hippocampe, CRF et CRF-R1 dans l'hypothalamus, les niveaux de noradrénaline dans le cortex frontal et l'expression des gènes BDNF (*Brain Derived Neutrophic Factors*), CB1 (récepteur aux endocannabinoïdes de type 1) et Il-6 dans l'hippocampe sont différemment modulés par les effets du régime HF ou du stress chronique UCMS. Pourtant, lorsque ces deux traitements sont associés, nous observons que ces différents paramètres biologiques sont normalisés chez les souris contrôles. Seule l'expression du gène Glut₄ est diminuée par les effets combinés de ces traitements chez les souris Cbg^{+/+}.

Concernant les souris Cbg^{-/-}, plutôt sensibles aux effets du régime HF seul mais insensibles aux effets du stress chronique UCMS seul, présentent les mêmes normalisations lorsque les deux traitements sont combinés. Quelques exceptions sont toutefois observées. En effet, les niveaux de CRF et de POMC sont augmentés.

De plus, les concentrations de sérotonine et de dopamine dans le cortex frontal semblent être également augmentés par les traitements expérimentaux combinés. A l'inverse, l'expression des gènes $Il-6$ et $5-HT_{1A}$ est diminuée par l'association du régime HF au stress chronique, par rapport aux souris $Cbg^{-/-}$ en condition standard. Ces effets pourraient contribuer à la diminution du comportement d'immobilité observé dans le FST. Enfin, comme les souris $Cbg^{+/+}$ en condition HF associé au stress chronique, les niveaux d'expression du gène $Glut_4$ sont encore plus effondrés chez les animaux $Cbg^{-/-}$ dans ces mêmes conditions.

III. Discussion des résultats actuels et perspectives

Ainsi, nous observons chez les animaux contrôles que les effets du régime HF et du stress chronique UCMS sont compensés lorsque les deux traitements sont combinés, sauf au niveau de l'utilisation du glucose (diminution de $Glut_4$). Aux vues de l'absence d'effet du stress chronique en situation de régime HF sur le poids et de l'augmentation du trait de type « dépressif » chez les souris $Cbg^{+/+}$, il est tentant de conclure que l'utilisation du glucose joue un rôle majeur dans le maintien des phénotypes d'obésité associée au trait de type « dépressif ».

Pour les souris $Cbg^{-/-}$ cet effondrement de $Glut_4$ est également retrouvé en plus d'autres modifications biologiques qui pourraient expliquer les phénotypes observés sur la baisse de poids et la baisse du comportement d'immobilité : l'expression de CRF et POMC ainsi que d' $Il-6$ et $5-HT_{1A}$ suggèrent que le tonus des glucocorticoïdes est augmenté, comparé aux individus $Cbg^{-/-}$ en condition standard.

Cette étude n'est actuellement pas finalisée. En effet, ces résultats ne permettent pas d'expliquer clairement comment les animaux $Cbg^{-/-}$ normalement insensibles aux effets du stress aigu et chronique en raison de leur réserve plasmatique de corticostérone effondrée, deviennent sensibles lorsqu'ils sont placés sous régime enrichi en gras. En effet, afin de finaliser ce projet des expériences supplémentaires sont nécessaires.

1. Nous posons tout d'abord l'hypothèse que dans ces conditions combinées, le tonus des glucocorticoïdes est augmenté chez les animaux Cbg^{-/-}. En effet, partant d'une hyporéactivité corticotrope endogène, cette augmentation du tonus permettrait paradoxalement la « restauration » d'une adaptation au stress. Il serait ainsi intéressant de mesurer dans un premier temps la **concentration de corticostérone libre** le soir, lors du pic circadien. Ceci n'a actuellement pas pu être fait puisque nous avons réalisés le sacrifice de ces animaux le matin, où les valeurs de l'hormone sont très faibles et ne permettent pas de visualiser des différences nettes entre les génotypes.
2. Aux vues de nos résultats sur les gènes du métabolisme du glucose et des lipides et des différences de poids, mesurées au début de l'expérience en condition basale (mâles Cbg^{-/-} ~9% plus lourds que les Cbg^{+/+}) et lorsque régime HF et UCMS sont combinés (perte de 18% de poids chez les Cbg^{-/-} alors qu'aucun changement n'apparaît chez les Cbg^{+/+}), il serait ensuite intéressant de poursuivre notre **investigation sur l'aspect métabolique**. Nous avons prévu de mesurer la composition corporelle de nos animaux à la fin de notre protocole expérimental grâce à l'utilisation d'un appareil appelé Piximus qui permet, par un scan aux rayons X, de mesurer le pourcentage de masse grasse et de densité osseuse. Malheureusement, l'appareil était défectueux le jour du test.

La pesée des différents tissus gras sous cutané, mésentérique, brun, testiculaire etc. auraient également permis d'évaluer la composition corporelle de nos animaux. Or, nous avons pris le parti d'extraire les ARN de ces tissus afin de réaliser des mesures d'expression de gènes par RTqPCR. L'ARN étant facilement dégradable par l'action des RNases, les tissus collectés au sacrifice ont été très rapidement disséqués et congelés dans la carboglace.

Enfin, les mesures de gènes cibles dans les tissus gras sont indispensables. J'ai déjà débuté ces analyses mais l'extraction des ARNs des tissus adipeux a posé quelques problèmes et a nécessité une mise au point. Les ARN sont

désormais extraits et nous prévoyons de mesurer dans ces tissus des gènes impliqués dans :

- la synthèse des lipides : SREPB1c, PPAR γ , AcetylCoA carboxylase et Fatty acid syntase (Fas) dont l'activité des deux derniers est connue pour diminuer avec le régime HF (Piscitelli et al., 2011) ;
- dans la lipolyse : récepteur adrénergique β 3AR, lipase hormono-sensible (HSL) qui hydrolyse les triglycérides de réserve et libère dans le sang des acides gras libres pouvant être utilisés par la cellule pour la lipolyse. Cette enzyme est positivement induite par les glucocorticoïdes permettant ainsi, lors d'un stress l'utilisation des triglycérides de réserve par la lipolyse. A l'inverse, en présence d'insuline (conditions postprandiales et en cas d'obésité), les glucocorticoïdes ont une action lipogénique induite par une diminution de l'activité de l'enzyme HSL qui régule l'hydrolyse des triglycérides (Samra et al., 1998; Yu et al., 2010) ;
- dans le transport des lipides : Fat/CD36 dont l'activité augmente avec un régime HF (Piscitelli et al., 2011),

3. Enfin des **mesures plasmatiques d'hormones métaboliques** sont également nécessaires. Nous envisageons de mesurer dans nos échantillons de plasma récoltés le matin du sacrifice l'insuline et la leptine par ELISA.

Les résultats obtenus jusqu'ici sont présentés dans la partie suivante sous forme d'article scientifique. Il faut ici le considérer comme un document de travail.

IV. Publication n°4, en préparation

Behavioral and metabolic consequences of transcortin deficiency on male mice submitted to high fat diet combined to chronic mild stress

Minni A.M. (1,2), Helbling J.C. (1,2), De Deurwaerdère P. (3,4), Tridon C. (1,2), Grégoire S. (5), Bretillon L. (5), Layé S. (1,2), Pallet, V. (1,2) & Castanon N. (1,2), Moisan M.-P. (1,2)

(1) Univ.de Bordeaux, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux France ;

(2) INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux

(3) University of Bordeaux, Institut des Maladies Neurodegeneratives, UMR 5293, 33000 Bordeaux France ;

(4) CNRS, Institut des Maladies Neurodegeneratives, UMR 5293, 33000 Bordeaux France

(5) Eye and Nutrition Research Group, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR 1324 INRA, 6265 CNRS, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 21000 Dijon, France.

Keywords: HPA axis, hypocortisolemia, despair-like behavior, chronic stress, high-fat diet

Introduction

In modern Western society, obesity is becoming an important public health issue which has reached epidemic proportions. According to WHO, more than 1 adult person on 2 is considered overweight in Europe and of these, 15% are obese. Lifestyle of people is evoked to explain this obesity escalating problem, especially because of the increase of sedentary life, the palatable food environment with an abundance of calorically dense food and the stressful life conducting to chronic activation of the stress response, especially the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis (Dallman et al., 2003; Adam and Epel, 2007).

The HPA axis is the major neuroendocrine system involved in the stress-response by regulating the secretion and release of glucocorticoids (cortisol in human; corticosterone in rodent). When HPA axis is activated acutely, a battery of physiological and behavioral responses constituting the adaptive stress response is rapidly orchestrated in order to reinstate the challenged body homeostasis. However, protracted stressor exposure, called chronic stress, leading to a dysregulation (hypo- or hyper-activity) of the HPA axis can induce detrimental effects for the whole body constituting a base for pathophysiological consequences (de Kloet et al., 2005; McEwen, 2007; Chrousos, 2009).

A growing literature indicates a connection between dysregulated HPA axis activity and obesity (Rosmond et al., 1998a; Dallman et al., 2006; Kyrou and Tsigos, 2009). Cushing's syndrome and Addison' disease represent two extremes of plasma cortisolism in human pathology. When Cushing 's syndrome, characterized by hypercortisolism, leads to a rapid weight gain (Carroll and Findling, 2010), the Addison' disease, characterized by hypocortisolism, conducts to weight loss (Lovas

and Husebye, 2007). Furthermore, it was observed that parents of children recently diagnosed with cancer reported marked weight gain associated to their chronic stress situation although the caloric intake was lower than parents of healthy children (Smith et al., 2005). However, chronic stress present bidirectional effects on weight, depending on situations and/or the individual. In men, the effect of job stress can lead to weight gain or weight loss depending of baseline body mass index (BMI) (Kivimaki et al., 2006). Furthermore, it was demonstrated that cortisol reactivity may be a marker for vulnerability to stress induced eating, and thus may help to explain who eats more versus who eats less after stress. Indeed, women who were high cortisol reactors to stress ate more food than low reactors while recovering from stress (Epel et al., 2001).

In rodent studies, there is evidence that social status in model of chronic social stress might differently affect the metabolic consequences (Bartolomucci et al., 2004; Moles et al., 2006; Solomon et al., 2007). Indeed, it was reported that subordination can be reliably associated with increased weight gain, whereas dominance is associated with lower weight gain or weight loss. But under high fat diet, subordinate mice, reported hypophage, showed higher vulnerability to obesity than dominant (Bartolomucci et al., 2009).

Another chronic disease has also become an important public health problem : the major depression (Pariante and Lightman, 2008). As for obesity, major depression often results to chronic dysregulation of HPA axis activity conducting to hyper-cortisolemia associated to melancholic depression subtype, or hypo-cortisolemia associated to atypical depression subtype (Gold and Chrousos, 2002; Bremmer et al., 2007). These pathologies frequently coexist: obesity can follow depressive episodes that occurred earlier in life, or depressed mood can be a side

effect of obesity and obesity treatment. Adolescents with depression are at a greater risk to become obese and obese individuals are more likely to develop depression as non-obese individuals (Bornstein et al., 2006).

It is of note that genes, environment and their interactions can lead to an inappropriate response to chronic stress embodied by a HPA axis dysregulation. In turn, this dysregulation plays an important role in the vulnerability to develop obesity and depression (Bornstein et al., 2006; Kyrou and Tsigos, 2009). In our previous study (Richard et al., 2010), we presented a mice model of HPA axis dysregulation due to CBG gene deficiency: the *Cbg*^{-/-} mice obtained by specific deletion of the *Cbg* gene. CBG (Corticosteroid Binding Globulin) or transcortin is the high-affinity transport protein for glucocorticoids in vertebrate blood. This plasma glycoprotein plays an essential role in glucocorticoid disposition and delivery to target tissues (Gagliardi et al., 2010; Moisan, 2010). In male *Cbg*^{-/-} mice, we observed that acute stress led to an insufficient glucocorticoid signaling associated with an increase of despair-like behaviors measured in the forced swim, tail suspension and learned helplessness tests. In the present study, wild-type and *Cbg*^{-/-} mice were submitted to high-fat (HF) diet combined or not to an unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedure (Schweizer et al., 2009) in the aim to investigate weight gain and despair-like behavior in a genetic model of HPA dysregulation submitted to a Western lifestyle.

Methods

Animals and housing conditions

Knock-out Cbg mice (MGI ID : 4833641, *Serpina6*^{tm1.1Mmp}) are produced in our laboratory in Bordeaux by breeding Cbg^{+/-} males and females (Richard et al., 2010). Mice used in the present work are Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} males (8 - 10 weeks of age and 25 – 30 g body weight at the beginning of the experiment) and have a C57BL/6J genetic background above 95%. Animals were maintained in an animal room (23 °C) with a 12 hr light/dark cycle (lights on at 0700h) and with *ad libitum* access to food and water. All the experiments were conducted in strict compliance with current European Conventions and approved by Institutional Committee.

Experimental Design

Experimental design is illustrated in Fig. 1. At the beginning of the experiment, animals were housed four per cage: 2 Cbg^{+/+} with 2 Cbg^{-/-} mice and were allowed to habituate to their novel environment and establish the social hierarchy for at least one week. Then, cages were divided in two groups determined by the diet imposed for a period of 20 weeks: (1) standard chow (A04 diet, SAFE, Augy, France; 10%kcal fat, 20%kcal protein and 70%kcal carbohydrate) or (2) High Fat (HF) chow (D12451 diet, Research diet, New Brunswick, NJ, USA; 45%kcal fat, 20%kcal protein and 35%kcal carbohydrate). After 14 weeks of diet, an unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedure was imposed during 4 weeks to half of the cages for each diet group. Only animals submitted to the UCMS procedure were housed individually, till the end of the experiment. The UCMS procedure consisted of random exposure to many mild stressors, twice a day as presented in Fig. 1. Thus, there were 8

experimental groups: Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} under standard diet, HF diet (HF), standard diet associated to UCMS procedure (S), HF diet associated to UCMS procedure (HF S). All groups are composed of 8 - 10 mice.

During this experiment, body weight of each mouse and food consumed (grams and kcal) per cages were determined weekly and animals were submitted to sample collection for endocrine measures and behavioral tests:

Blood glucose measure: On weeks 12 and 18 and after a 24h food deprivation, blood glucose concentration was measured by tail nick using Accu-chek® devices (Roche Diagnostics, France).

Total plasma corticosterone: At the beginning of the active phase (1900h) of week 18, after the UCMS period, blood samples were obtained by tail nick in order to measure total corticosterone. Because we wanted to measure basal levels of plasma corticosterone, this procedure did not exceed 2 min. Blood samples were collected in tubes containing 10% EDTA. After 10 min of centrifugation at 10000 rpm, plasma samples were obtained and kept at -80°C.

Preference sucrose test: Preference to a 1% sucrose solution was determined at week 12 when mice were 4 per cage and at week 18 when animals were 2 per cage for unstressed mice or in individual cage for UCMS mice. During 3 days, two water bottles were placed in the animal cage to familiarize mice to use both bottles. Then one of them was replaced by 1% D-sucrose solution (Sigma, France) for two days. Liquid intake was determined by weighting before, 24h later and 48h after both water and sucrose solution bottles were introduced in the cage. The percentage of sucrose drunk during these 2 days was measured as an index of anhedonic behavior.

Then, all mice were studied in the evening in open field (week 18.5) and forced swim tests (week 19.5) spaced by 1 week and were conducted as described in our last study (Richard et al., 2010).

The Open field: the apparatus, made of white coated plywood, was a square area (40 x 40 cm) with 16-cm high walls. The floor was divided into 16 squares (10 x 10 cm). Mice were placed in the central area and allowed to explore freely for 10 min (600 lux light). The total number of squares crossed was recorded as an index of locomotor activity and the number of center squares (four inner squares) divided by the total number of squares crossed was recorded as index of anxiety.

Forced swim test: Each mouse was placed in a plastic cylinder (height, 32.5 cm; diameter, 15 cm) containing 3 liters of water (16 cm) at $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Four mice were tested at the same time. The water was changed between subjects. A mouse was judged floating (immobile) when it stopped any movements. Immobility behaviors in the forced swim test were expressed in immobility occurrence. Two experimentators recorded immobility and swimming behaviors every 10 seconds over a period of 6 minutes as described (Bolanos et al., 2008).

Finally, in the morning (0800h - 1100h) of the sacrifice day, week 20, mice were anesthetized with isoflurane (Aerrane, Baxter SA, Maurepas, France). Then, about 1mL of blood sample was taken by cardiac puncture in less than 20s to collect plasma. Finally, animals were sacrificed by decapitation and brain, pituitary, adipose tissue, muscle, liver and adrenals glands were collected and immediately frozen in dry ice and kept at -80°C . The frontal cortex, hippocampus and hypothalamus were dissected and punched at -20°C and stored at -80°C until their use in biochemical assays.

Total corticosterone measurement

Total corticosterone was measured by an in-house RIA (see (Richard et al., 2010) for details). Briefly, after steroid extraction of plasma samples with absolute ethanol, total corticosterone was measured by competition between cold corticosterone (B) and $^3\text{H-B}$ by a specific antibody anti-corticosterone provided by Dr. H. Vaudry (University of Rouen, France).

Chromatographic Analysis

Tissue concentrations of monoamines (Norepinephrine, serotonin, dopamine, DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid), 5-HIAA (5-Hydroxyindoleacetic acid) and HVA (homovanillic acid)) in the frontal cortex were performed by HPLC-ECD as described previously (Navailles et al., 2010) to evaluate the impact of HF diet associated or not to the UCMS procedure. Frontal punches tissues were homogenized in 100 μl of 0.1N HClO_4 , gently sonicated and centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C. Aliquots (20 μL) of the supernatants were injected into the HPLC system.

Chromatographic analysis: Tissue dosages of monoamines and their metabolites were performed by a sensitive HPLC-ECD system. Samples were injected via a manual injector (Rheodyne 7725i, C.I.L. Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) into the HPLC column (Kromasyl C8, 150 X 4.6 mm, 5 μm ; C.I.L.-Cluzeau) protected by a Brownlee–Newgard precolumn (RP-8, 15 X 3.2 mm, 7 μm ; C.I.L.-Cluzeau). The mobile phase, delivered at 1.2 mL/min flow rate using a HPLC pump (Beckman pump 116, Beckman, Paris) was as follows (in mM): 60 NaH_2PO_4 , 0.1 disodium EDTA, and 2 octane sulfonic acid plus 7% methanol, adjusted to pH 3.9 with orthophosphoric acid and filtered through a 0.22 mm Millipore filter. Detection of

monoamines and their metabolites was performed with a coulometric detector (CoulochemII, ESA) coupled to a dual-electrode analytic cell (model 5011). The potential of the electrodes was set at +350 and -270 mV. Signals were recorded on a computer system and analyzed using the Chromnav system (JASCO, France). Results are expressed as ng/mg of tissue.

Plasma lipid composition and analyses

Total lipids were extracted from plasma according to the Moilanen and Nikkari method (Moilanen and Nikkari, 1981), using a mixture of chloroform and methanol (1:1, v/v).

Lipid class profiles: The distribution of lipids into phospholipids (PL), triglycerides, free fatty acids, free cholesterol, and cholesteryl esters (CE) in the plasma was determined using a combination of thin-layer chromatography on silica gel-coated quartz rods and flame ionization detection (Iatroscan® system, Iatron, Tokyo, Japan), according to Ackman's technique (Ackman, 1981). The values obtained for each compound were corrected according to their response factor using specific calibration curves, as published by (Sébédio and Juanéda, 1991). Data were reported as a percentage of the total lipids in the sample.

Preparation of cholesterol esters, phospholipids and triglycerides: Total lipids from the plasma were submitted to a thin-layer chromatography separation on precoated silica gel plates (Merck, Darmstadt, Germany) using a solvent mixture of hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:1, v/v/v). The silica gel plates were visualized under UV light (360 nm) after spraying with 2',7'-dichlorofluorescein. The spots corresponding to CEs, PL and TG were scraped off the plate and the samples were transesterified following the fatty acid analysis procedure.

Fatty acid analysis: Lipids were transesterified using boron trifluoride in methanol according to Morrison and Smith (Morrison and Smith, 1964). The fatty acid methyl esters were analyzed by gas chromatography on a Hewlett Packard Model 5890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) fitted with a CPSIL-88 column (100 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.20 µm; Varian, Les Ulis, France) equipped with a flame ionization detector. Hydrogen was used as a carrier gas (inlet pressure 210 kPa). The oven temperature was held at 60°C for 5 min, increased to 165°C at 15°C /min and held for 1 min, and then to 225°C at 2°C /min and finally held at 225°C for 17 min. The injector and the flame ionization detector were maintained at 250°C and 250°C, respectively. Fatty acid methyl esters were identified by comparison with standards. The data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Massy, France).

Gene expression by real-time qPCR

Total RNA was extracted of hippocampus with TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol. RNA quality was evaluated with RNA Nano chips onto a Bioanalyser 2100 (Agilent, Boeblingen, Germany). 2 µg of total RNA was reverse-transcribed with Superscript III (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and random hexamers according to the manufacturer's protocol. 5 µL of cDNA diluted 1:20 was PCR amplified using 10µL of Mesagreen QPCR MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgium) and 5µL of primer mix at 300nM in a total volume of 20 µL onto an ABI7500 thermocycler. PCR program consisted of 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 min. All primer pairs were designed using Primer Express software (PE APPLIED Biosystems, Courtaboeuf, France) in a way avoiding genomic DNA amplification. Sequences of primers used are provided in

Table 1 and presented a 100% precision. The specificity of the PCR reaction was validated following MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real time PCR Experiments) guidelines (Bustin et al., 2009). mRNA levels of target genes were normalized using 18S RNA expression for each sample (cDNA diluted 1:2000) as 18S proved not to vary between conditions in our experiments. The quantification of target mRNA levels was calculated with the SDS2.1 software (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) and expressed as relative mRNA expression.

Statistical analyses

All results were expressed as mean \pm S.E.M. Outliers with value that differed to more than 2 S.D. from the mean were excluded from analysis. Statistics were calculated with the software Statistica v. 8.

For body weight evolution, statistical analyzes were done in three stages. Firstly, at day 0, an unpaired Student test was realized between Cbg+/+ and Cbg-/- mice. Then between weeks 0 to 12 a three-way analysis of variance (ANOVA) of repeated measure was done on genotype, diet and time effects. Four-way ANOVA of repeated measures was assessed between 14 to 20 to explore genotype, diet, UCMS and time effects. Both ANOVA analyzes were followed by Fisher LSD post-hoc tests when adequate.

For corticosterone concentration analysis, a four-way ANOVA of repeated measure was done on genotype, HF diet, UCMS and time of day effects. Then, Fisher LSD post-hoc tests were performed when adequate.

Then, for the other analyzes, to test the genotype, diet and UCMS effects, three-way analysis of variance (ANOVA) were assessed and followed by Fisher LSD post-hoc tests when adequate. Because we tested 8 groups of mice together, if a

statistical difference did not appear by three-way ANOVA although means seemed different between one or two effects, a separate two-way ANOVA or unpaired *t* test were done to evinced mean difference. The level of statistical difference was set as *p* value < 0.05. On graphs, *ns* indicated no significant difference, one symbol *p* < 0.05, two symbols *p* < 0.01 and three symbols *p* < 0.001.

Results

1) Consequences of HF diet and UCMS on weight gain

Body weight evolution was followed each week throughout the experiment. Firstly, we noted that at the beginning of the experiment, day 0, Cbg^{-/-} mice were significantly heavier than Cbg^{+/+} mice by 8.8% (28.8±0.4 g vs. 26.5±0.4 g; $t_{73}=4.41$, *p* < 0.001; Fig. 2A).

Then, for the diet period between 0 to 12 weeks, 3-way ANOVA of repeated measures conducted on genotype (Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} are presented separately in Fig. 2B & C but were analyzed together), diet and time effects, showed a diet effect ($F_{(1,70)} = 50.62$, *p* < 0.0001), a week effect ($F_{(12,840)} = 354.57$, *p* < 0.001) and a diet x week interaction ($F_{(12,840)} = 94.27$, *p* < 0.001) but no genotype effect. Indeed after 2 weeks, HF diet induced a progressive weight gain (*p* < 0.01) similar between genotypes.

Finally, when UCMS was associated to the HF diet (HFS mice) in the period between 14 to 20 weeks, the 4-way ANOVA evinced a diet effect ($F_{(1,70)} = 131.88$, *p* < 0.001), a UCMS effect ($F_{(1,70)} = 6.75$, *p* = 0.012), a week effect ($F_{(7,462)} = 85.84$, *p* < 0.001), and week x genotype x stress ($F_{(7,462)} = 2.63$, *p* = 0.01) as well as week x diet x stress ($F_{(7,462)} = 3.29$, *p* = 0.002) interactions. Post hoc analyses showed that: (i)

mice under HF diet (HF mice) were significantly heavier than mice under standard diet (33.5% for Cbg^{+/+} HF and 40.7% for Cbg^{-/-} HF, week 20), (ii) UCMS procedure under standard diet condition (S mice) did not change significantly their body weight whatever the genotype, (iii) the body weight of Cbg^{+/+} HF mice was similar to Cbg^{+/+} HFS mice but Cbg^{-/-} HFS mice presented a significant 18.0% weight loss compared to Cbg^{-/-} HF ($p < 0.0001$). These HFS mice remain 23.8% heavier than Cbg^{-/-} mice under standard diet.

At week 12, mice were fasting 24H in the aim to measure blood glucose. Then, they were submitted to other tests resulting to a short period of stress between weeks 12 to 14. Interestingly, we observed that this period induced a different weight change between Cbg^{+/+} HF and Cbg^{-/-} HF mice. Indeed, between week 14 (the end of this period) to week 15 (when animals returned to resting condition), when Cbg^{+/+} HF mice presented a similar weight (-0.5%), Cbg^{-/-} HF mice had a rapid and important weight gain (+9.3%). Beside the fact that Cbg^{-/-} HF mice were heavier than Cbg^{+/+} HF, this new observation suggested a different weight regulation and metabolism.

2) Consequences of HF diet and UCMS on emotional behavior

To examine emotional reactivity of mice in consequence to our conditions, Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice were evaluated, first, in a sucrose preference test twice, at week 12 and at week 18, in order to measure anhedonic behavior, then in an open field test at week 18, to measure locomotor activity and anxiety-like behavior, and finally by forced swim test (FST) conducted on week 19 to measure despair-like behavior.

Sucrose preference test: At week 12 (Fig. 3A) and 18 for unstressed condition (Fig. 3B), mice were 4 per cage and included both genotypes; thus, we could only measure the HF diet effect on sucrose consumption. No effect was detected by one-way ANOVA neither at week 12 ($F_{(1;17)} = 0.001$, $p = 0.98$) nor at week 18 ($F_{(1;18)} = 1.39$, $p = 0.25$). At week 18 for UCMS mice placed in individual cage (Fig. 3C), the two-way ANOVA analysis showed no genotype effect ($F_{(1;61)} = 0.35$, $p = 0.56$), no diet effect ($F_{(1;61)} = 1.19$, $p = 0.28$), and no genotype x diet interaction ($F_{(1;61)} = 0.02$, $p = 0.88$). For all conditions, sucrose consumption was around 60% suggesting no anhedonic effect of genotype, diet and UCMS conditions.

Open field test: Locomotor activity was first evaluated by measuring the number of squares crossed (Fig. 3D). By three-way ANOVA we observed genotype ($F_{(1;65)} = 7.49$, $p = 0.008$), diet ($F_{(1;65)} = 14.79$, $p < 0.001$) and UCMS effects ($F_{(1;65)} = 7.91$, $p = 0.007$) with genotype x diet interaction ($F_{(1;65)} = 3.96$, $p = 0.05$). Post-hoc analyses revealed that compared to Cbg+/+ mice controls, locomotor activity was 29.2% decreased for Cbg+/+ HF vs. Cbg+/+ ($p = 0.001$) and 27.2% decreased for Cbg-/- mice controls vs. Cbg+/+ ($p = 0.003$). Furthermore, compared to Cbg-/-, Cbg-/- S mice presented a 29.5% increase of locomotor activity ($p = 0.02$). No difference was observed for anxiety-like behavior (Fig. 3E) whatever the genotype ($F_{(1;65)} = 0.006$, $p = 0.94$), diet ($F_{(1;65)} = 0.66$, $p = 0.42$) and UCMS conditions ($F_{(1;65)} = 1.13$, $p = 0.29$).

Forced swim test: Despair-like behavior (Fig. 3F) was analyzed by three-way ANOVA that evidenced genotype ($F_{(1;65)} = 17.64$, $p < 0.001$) and UCMS effects ($F_{(1;65)} = 15.32$, $p < 0.001$), with genotype x diet x UCMS interactions ($F_{(1;65)} = 14.60$, $p < 0.001$). We observed by post-hoc test that in Cbg+/+ mice, immobility behavior was increased by UCMS procedure ($p = 0.02$ Cbg+/+ vs. Cbg+/+ S) and by the combination of HF with UCMS ($p < 0.001$ Cbg+/+ vs. Cbg+/+ HFS). For Cbg-/- mice,

immobility behavior was unchanged by HF diet or UCMS conditions and was always higher than Cbg+/+ mice in corresponding conditions ($p < 0.001$ for standard condition, $p < 0.001$ for HF diet and $p = 0.02$ for UCMS). However, Cbg-/- HFS mice showed a decrease immobility compared to control Cbg-/- ($p = 0.03$), and to Cbg+/+ HFS mice ($p = 0.001$) but no different from control Cbg+/+ mice ($p = 0.11$).

Thus, in addition to the body weight loss observed in Cbg-/- HFS mice, interestingly we observed a behavioral modification for the despair-like trait in this same group.

3) Consequences of HF diet and UCMS on HPA axis

Plasma corticosterone concentrations were measured in the morning (Fig. 4A) and in the evening (the beginning of the active phase) at week 18 (Fig. 4B).

Analyzes were done by 4-way ANOVA of repeated measures (called day time) and revealed genotype ($F_{(1;56)} = 152.10$, $p < 0.001$), diet ($F_{(1;56)} = 47.78$, $p < 0.001$), UCMS ($F_{(1;56)} = 10.56$, $p = 0.02$) and day time ($F_{(1;56)} = 24.62$, $p < 0.001$) effects. Then genotype x diet ($F_{(1;56)} = 5.63$, $p = 0.02$), genotype x UCMS ($F_{(1;56)} = 11.11$, $p = 0.002$), day time x genotype ($F_{(1;56)} = 24.62$, $p < 0.001$), day time x UCMS ($F_{(1;56)} = 7.64$, $p = 0.008$) and day time x genotype x UCMS interactions ($F_{(1;56)} = 7.11$, $p = 0.01$) were detected.

Under standard diet, as observed in our previous study (Richard et al., 2010), corticosterone levels of Cbg-/- were lower, slightly in the morning (36.3 ± 3.7 nM vs. 58.1 ± 7.8 nM; $p = 0.1$) and significantly in the evening (25.7 ± 2.5 nM vs. 94.6 ± 8.6 nM; $p < 0.001$) than those of Cbg+/+ mice.

HF diet, UCMS and the combination of both conditions did not change this genotype difference that was found significant only in the evening. However, we noted that in UCMS conditions, this genotype difference was less pronounced (the

evening: $p < 0.001$ in HF conditions, $p < 0.01$ in HFS conditions, and $p < 0.05$ for UCMS conditions).

Then, regarding HF diet effect, when no statistical difference was observed in the morning between Cbg^{+/+} and Cbg^{+/+} HF mice, we observed that corticosterone levels were significantly increased the evening (+44%, $p < 0.001$ Cbg^{+/+} vs. Cbg^{+/+} HF). Concerning Cbg^{-/-} mice, HF diet induced a corticosterone increase in the morning as well as in the evening (Cbg^{-/-} vs. Cbg^{-/-} HF: +46% $p < 0.05$ the morning and +67%, $p < 0.05$ the evening).

Conversely, UCMS conditions had no significant effect on Cbg^{+/+} S and Cbg^{-/-} S mice in the morning. The evening, however, UCMS induced in Cbg^{+/+} S mice a significant 39% corticosterone level decrease (-39%, $p < 0.001$ Cbg^{+/+} S vs. Cbg^{+/+}). Interestingly, no change was observed between Cbg^{-/-} and Cbg^{-/-} S mice.

Finally, when HF diet was combined to UCMS, corticosterone levels were significantly increased in the morning ($p < 0.01$ Cbg^{+/+} vs. Cbg^{+/+} HFS and $p < 0.05$ Cbg^{-/-} vs. Cbg^{-/-} HFS). However, in the evening no difference was observed neither for Cbg^{+/+} ($p = 0.27$) nor for Cbg^{-/-} genotype ($p = 0.29$).

Thus, most differences were revealed the evening, at the circadian peak except for HFS condition. We observed that Cbg^{+/+} mice were found sensitive to HF diet and UCMS conditions in opposite way and when these conditions were combined a compensation appeared. These phenomena were not observed in Cbg^{-/-} mice that presented low corticosterone levels and seemed not or less sensitive to any conditions, except for HF diet alone. Furthermore, the circadian rhythm of corticosterone levels was found blunted in Cbg^{-/-} mice whatever the diet and stress conditions.

Genes involved in HPA axis activity were also measured (Fig. 5). By 3-way ANOVA, no genotype, diet and UCMS effects were observed for MR or GR mRNA expression in hippocampus. However, within Cbg^{+/+} mice both MR and GR genes expression showed a non significant tendency to be decreased by UCMS condition.

11 β HSD1 mRNA in hippocampus presented a nearly significant genotype effect ($F_{(1;56)} = 3.59, p = 0.06$) and a significant UCMS effect ($F_{(1;56)} = 6.29, p = 0.01$) but no interactions.

Then, CRF and CRF receptor type 1 (CRFR1), mRNA expression were measured in hypothalamus. The three-way ANOVA analysis evidenced a genotype effect ($F_{(1;57)} = 6.14, p = 0.02$) and a genotype x diet x stress interaction ($F_{(1;57)} = 5.74, p = 0.02$) for CRF expression. Post-hoc analysis showed genotype difference in UCMS conditions (Cbg^{+/+} S vs. Cbg^{-/-} S, $p = 0.004$) and a nearly significant difference in HF diet (Cbg^{+/+} HF vs. Cbg^{-/-} HF, $p = 0.08$), CRF mRNA expression being lower in Cbg^{-/-} mice. Moreover, while no significant difference was observed in Cbg^{-/-} whatever the treatment, HF diet ($p = 0.04$) and UCMS procedure ($p = 0.02$) induced an elevation of CRF gene expression in Cbg^{+/+} mice.

For CRF-R1, a genotype x diet x UCMS interaction was detected ($F_{(1;54)} = 5.61, p = 0.02$). The post-hoc analysis showed that CRF-R1 mRNA levels tended to be higher in Cbg^{-/-} mice compared to Cbg^{+/+} under standard diet ($p = 0.07$), but was lower in Cbg^{-/-} HF compared to Cbg^{+/+} HF ($p = 0.02$). Moreover, we observed that in Cbg^{+/+} mice the expression level was increased whatever conditions and significantly by HF diet ($p = 0.01$). In Cbg^{-/-} mice, expression levels were not changed by conditions except with UCMS alone that decreased the expression ($p = 0.07$). CRF-R1 mRNA was also measured in pituitary but displayed no difference whatever genotype, HF or UCMS conditions.

POMC mRNA was also measured in pituitary and the three-way ANOVA analysis showed a strong diet effect ($F_{(1;59)} = 17.56, p < 0.001$). Indeed, compared to the standard diet, the HF diet induced a 50.8% increase in Cbg^{+/+} mice and 30.9% in Cbg^{-/-} mice compared to their respective controls. Compared to standard condition, HF diet combined to the UCMS led to 36.9% increase in Cbg^{+/+} and 63.6% in Cbg^{-/-} mice.

4) Consequences of HF diet and UCMS on energy metabolism

To explain the important weight regulation difference between Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice induced by HF diet combined to UCMS procedure, food intake was monitored for both quantitative (grams) and qualitative (kcal) consumption. Concerning unstressed mice, (Fig. 6A and 6B) (for which genotype effect could not be examined because 2 Cbg^{+/+} and 2 Cbg^{-/-} mice were placed together per cage), the t test analysis showed that animals in HF diet ate significantly less (29.8%) than animals under standard diet ($t_8 = 39.6, p < 0.001$) but consumed 14.5% more calories ($t_8 = 12.35, p < 0.001$) suggesting that animals regulated their food intake according to the diet. Regarding UCMS animals (Fig. 6C and 6D), the two-way ANOVA analysis evidenced a diet effect (HF animals ate 23.4% less but absorbed 24.8% more calories than mice under standard diet, $F_{(1;31)} = 49.71, p < 0.001$ for grams absorbed and $F_{(1;31)} = 32.5, p < 0.001$ for kcal absorbed). However neither genotype nor genotype \times diet interactions were observed. Thus the weight loss observed in Cbg^{-/-} HFS mice was not due to a food consumption difference.

Then, blood glucose was measured at two steps of the experiment: after 12 weeks of diet (Fig. 7A) and after 18 weeks of diet combined or not to UCMS procedure (Fig. 7B). At 12 weeks, the two-way ANOVA analysis displayed only a diet

effect ($F_{(1;63)} = 33.62$, $p < 0.001$). Indeed, Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} presented similar blood glucose levels under standard diet (82.4 mg/dL and 85.9 mg/mL respectively), and in HF diet (113.9 mg/dL and 112.1mg/dL respectively) increasing by 37% under HF diet. At 18 weeks, we observed that glucose levels of Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} under standard diet were 40.7% higher for Cbg^{+/+} and 30.3% higher for Cbg^{-/-} compared to week 12. Then, the three-way ANOVA analysis conducted on genotype, diet and UCMS effects only evinced a diet x stress interaction ($F_{(1;65)} = 4.68$, $p = 0.03$). By post hoc analyses we found that HF diet again induced in Cbg^{+/+} an increase in glucose level compared to standard diet (+18.5% Cbg^{+/+} vs. Cbg^{+/+} HF, $p = 0.05$), but this observation was no longer significantly observed for Cbg^{-/-} mice (Cbg^{-/-} vs. Cbg^{-/-} HF, $p = 0.12$). Furthermore, the UCMS procedure induced the same effect than HF diet on animals: glucose level was 19.8% higher in Cbg^{+/+} (Cbg^{+/+} vs. Cbg^{+/+} S, $p = 0.05$), but unchanged for Cbg^{-/-} (Cbg^{-/-} vs. Cbg^{-/-} S, $p = 0.23$). Finally, when HF diet was associated to the UCMS, no change was observed in blood glucose levels compared to standard diet for each genotype. Furthermore, Cbg^{+/+} HFS and Cbg^{-/-} HFS presented similar levels (129.9 mg/dL and 125.4 mg/dL respectively). Thus, Cbg^{-/-} seemed after 18 weeks of the experiment less sensitive to HF diet and UCMS procedure than Cbg^{+/+} concerning blood glucose regulation.

Interestingly, Glut₄ mRNA expression in muscle (Figure 7C), implicated in glucose utilization, presented by three-way ANOVA a genotype effect ($F_{(1;38)} = 9.36$, $p = 0.004$) with lower levels in Cbg^{-/-}. Among Cbg^{+/+} mice, we observed by two-way ANOVA that UCMS treatment decrease Glut₄ expression ($F_{(1;18)} = 4.44$, $p = 0.04$ Cbg^{+/+} vs. Cbg^{+/+} S). In Cbg^{-/-}, two-way ANOVA analysis displayed a nearly significant diet x UCMS interaction ($F_{(1;19)} = 3.38$, $p = 0.08$). Indeed, HF diet led to increase mRNA expression compared to Cbg^{-/-} under standard condition, but this HF

effect was canceled out when UCMS was associated. Finally, we noted that profiles of Glut₄ expression induced by all treatments were similar between Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} (HF increased, UCMS decrease and HFS decrease more Glut₄ expression) but in Cbg^{-/-} this was very attenuated.

At sacrifice we observed that the liver of each mouse under HF diet, whatever genotype and UCMS treatment presented steatosis. This observation in addition to the body weight loss observed in Cbg^{-/-} HFS prompted us to evaluate plasma lipids profiles including cholesterol esters, triglycerides, phospholipids, free fatty acids and cholesterols.

Three-way ANOVA analysis conducted on cholesterol level (Fig. 8A) showed no genotype and HF effects, but showed a nearly significant UCMS effect ($F_{(1;35)} = 4.18$, $p = 0.05$) that reduced cholesterol level (~15% in Cbg^{+/+} S vs. Cbg^{+/+} and ~20% in Cbg^{-/-} S vs. Cbg^{-/-} mice).

Regarding plasma cholesterol esters (Fig. 8B), the ANOVA detected a strong HF diet effect ($F_{(1;35)} = 77.36$, $p < 0.0001$) and a diet x UCMS interaction ($F_{(1;35)} = 4.60$, $p = 0.04$). In unstressed condition the HF diet conducted to a similar increase of cholesterol esters in Cbg^{+/+} as in Cbg^{-/-} (40% and 43% respectively; $p < 0.0001$ for both compared to standard condition), whereas in UCMS condition the HF diet induced a less important increase in Cbg^{-/-} (Cbg^{-/-} S vs. Cbg^{-/-} HFS +22%, $p < 0.05$ and Cbg^{+/+} S vs. Cbg^{+/+} HFS +33%, $p < 0.001$).

For triglycerides levels (Fig. 8C), analysis revealed only a diet effect ($F_{(1;35)} = 77.36$, $p < 0.0001$) that was opposed to cholesterol esters. Levels were decreased by 46% in Cbg^{+/+} (Cbg^{+/+} vs. Cbg^{+/+} HF) and by 68% in Cbg^{-/-} (Cbg^{-/-} vs. Cbg^{-/-} HF). In UCMS condition, the decrease of triglycerides levels by HF diet was similar

between Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} (57% Cbg^{+/+} S vs. Cbg^{+/+} HFS and 58% Cbg^{-/-} S vs. Cbg^{-/-} HFS).

Plasma free fatty acids (Fig. 8D) were then analyzed and we observed genotype ($F_{(1;35)} = 11.98$, $p = 0.001$) and diet effect ($F_{(1;35)} = 6.67$, $p = 0.014$). We noted that profiles of plasma free fatty acids levels induced by each treatment were similar between Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} (HF decreased, UCMS unchanged and HFS decrease levels), but once again, in Cbg^{-/-} this was attenuated.

Finally, plasma phospholipids levels (Fig. 8E) presented genotype ($F_{(1;35)} = 4.60$, $p = 0.04$) and diet effect ($F_{(1;35)} = 6.24$, $p = 0.02$). Whatever the conditions, levels of phospholipids were slightly higher in Cbg^{-/-} mice. Moreover, in both Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice, HF diet combined to UCMS tended to increase plasma levels.

Plasma fatty acids were then measured in cholesterol esters, phospholipids and triglycerides classes (see suppl. data Table 1, 2 and 3).

To study lipid synthesis further, PPAR γ and SREBP_{1C} mRNA, were measured in liver (Fig. 9A & 9B). For PPAR γ , the three-way ANOVA analysis showed a genotype effect ($F_{(1;59)} = 6.69$, $p = 0.01$), profiles of expression of PPAR γ being higher in Cbg^{-/-} than Cbg^{+/+} mice, and a diet effect ($F_{(1;59)} = 20.37$, $p < 0.001$). Indeed, the HF diet induced in both genotypes and both unstressed and UCMS conditions an increase of gene expression. For unstressed condition, HF increased the expression of 267% for Cbg^{+/+} (Cbg^{+/+} vs. Cbg^{+/+} HF, $p = 0.008$ by *t* test) and of 288% for Cbg^{-/-} (Cbg^{-/-} vs. Cbg^{-/-} HF, $p = 0.005$ by *t* test). Then, for UCMS condition, HF increased the expression of 169% for Cbg^{+/+} (Cbg^{+/+} S vs. Cbg^{+/+} HFS, $p = 0.04$ by *t* test) and of 85% for Cbg^{-/-} (Cbg^{-/-} S vs. Cbg^{-/-} HFS, but $p = 0.02$ by *t* test).

Regarding SREBP_{1C} mRNA, only a diet effect was detected by 3 way ANOVA ($F_{(1;58)} = 5.68$, $p = 0.01$). As for PPAR γ , we observed that HF diet increased the expression level of SREBP_{1C} in unstressed and UCMS conditions and this profile seemed to be larger for Cbg^{-/-} mice. Indeed, when in unstressed condition the increase of the expression was around 2 fold greater in Cbg^{+/+} mice (203% increase in Cbg^{+/+} and 103% increase in Cbg^{-/-} mice), in UCMS condition the increase of the expression was around 3 fold greater in Cbg^{-/-} mice (32% increase in Cbg^{+/+} and 96% increase in Cbg^{-/-} mice). However, no statistical difference was observed by *t* test analysis.

5) Consequences of HF diet and UCMS on mood neurobiology parameters

Firstly, monoamines norepinephrine (Fig. 10A), serotonin (Fig. 10B), and its main metabolite 5-HIAA (Fig. 10C), and dopamine (Fig. 10D) and its metabolite DOPAC (Fig. 10E) were measured in frontal cortex of each mice group by HPLC.

Three-way ANOVA analyses showed for norepinephrine neurotransmitter a genotype x UCMS interaction ($F_{(1;64)} = 4.20$, $p = 0.04$). Indeed, norepinephrine level in frontal cortex was decreased by UCMS procedure in Cbg^{+/+} mice (Cbg^{+/+} vs. Cbg^{+/+} S, $p = 0.01$) but not in Cbg^{-/-} S mice that have expression not different from Cbg^{-/-} but higher than Cbg^{+/+}S ($p = 0.02$). No change was induced by genotype, HF or UCMS procedure for serotonin and 5-HIAA, dopamine and DOPAC. However, we observed by *t* test analysis that dopamine levels in Cbg^{-/-} HFS mice were higher to Cbg^{-/-} mice group ($p = 0,009$).

To complete these data gene expression analyses were performed. We chose genes that are known to be regulated by glucocorticoids and diet as well as involved

in mood modulation (Fig. 11). Three-way ANOVA revealed no statistical effect for the serotonin 5-HT_{1A} receptor mRNA measured in hippocampus (Fig. 11A). However, a higher expression of this gene was found for Cbg^{-/-} mice compared to Cbg^{+/+} mice ($p = 0.03$ by t test).

BDNF gene expression in hippocampus (Fig. 11B) was not different between groups. However UCMS had a tendency to modulate gene expression that produced differential effect in Cbg^{+/+} (decreased) and Cbg^{-/-} (unchanged or increased). Then, Cbg^{-/-} HFS display a 20.5% reduction, although not statistically significant, of BDNF expression compared to Cbg^{-/-} controls. Interestingly, CB1 mRNA in hippocampus (Fig. 11C) presented the same profile of expression than BDNF.

NPY gene expression in hypothalamus (Fig. 11D) showed a robust diet effect by three-way ANOVA ($F_{(1;52)} = 25.20$, $p < 0.001$), HF diet increasing NPY expression as expected, especially in Cbg^{+/+} HF.

Finally, cerebral cytokines interleukin 6 (Il-6) (Fig. 11E) and Interleukin 1 beta (Il-1 β) (Fig. 11F) were examined. Three-way ANOVA detected only a genotype effect ($F_{(1;59)} = 7.258$, $p = 0.009$) for Il-6 mRNA expression in hippocampus that appeared higher in Cbg^{-/-} mice ($p = 0,04$ by t test). No significant effect was detected for Il-1 β gene expression. However, Il-1 β presented an apparent lower expression of Cbg^{+/+}S vs. Cbg^{+/+}, a similar profile of expression than Il-6 gene within Cbg^{+/+} mice. The expression in Cbg^{-/-} however, appeared not different than Cbg^{+/+} under standard diet and was not influenced by any conditions.

Discussion

Obesity and depression are two important public health diseases in modern Western society and the daily stress environment with easy access to food notably enriched in fat is an important factor favoring the development of these diseases. However, some people are more vulnerable because of their susceptibility to present a dysregulated response to chronic stress leading to notably hyper- or hypo-glucocorticoid response. The aim of the present study was to characterize the role of CBG in the physiological and emotional regulations induced by high fat diet, unpredictable chronic mild stress and the combination of both.

1. Impact of Cbg deficiency under standard diet and "no stress" conditions

The comparison of Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} under standard diet in this study provides new interesting data. Indeed, Cbg^{-/-} mutants hold an endogenous decreased capacity to endure variations of the environment and stressors. This is confirmed in particular by an increased immobility behavior in the forced swim test, as observed previously (Richard et al., 2010) and a decreased locomotion in the open-field test performed under aversive conditions. The origin of these behavioral differences stems from a lower circulating corticosterone pool in Cbg^{-/-} compared to Cbg^{+/+}. Although free corticosterone could not be measured in this study, we know from previous analyses that the low corticosterone pool in Cbg^{-/-} mice translates into equivalent free corticosterone at rest but suboptimal free corticosterone levels in stressful conditions. Furthermore, we had shown that free corticosterone levels were inversely correlated with immobility scores in the forced swim test (Richard et al.,

2010). Thus, the altered behavior in forced swim and aversive open-field tests is probably the results of these suboptimal free corticosterone levels.

Then, there are several indices suggesting that *Cbg*^{-/-} mice display a slight hypocorticosteronism that may come from the accumulation of mild stressors encountered during breeding. First several glucocorticoid target genes are more weakly regulated in *Cbg*^{-/-} compared to *Cbg*^{+/+}. *Il-6* and *5HT1A* mRNA, that are known to be negatively regulated by glucocorticoid (Huang and Cidlowski, 2002; Lanfumey et al., 2008), are overexpressed in the hippocampus of *Cbg*^{-/-} mutants. As these genes have an influence on mood regulation they may explain in part the behavior in forced swim and open-field tests. *Glut4* is another well described glucocorticoid target gene (Dinneen et al., 1995) that was found under-induced in muscle of *Cbg*^{-/-} mice. The consequence of this suboptimal expression of *Glut4* will be lower glucose utilization by tissues that may explain an altered adaptation to stressors. Free fatty acid were found at lower levels in *Cbg*^{-/-} plasma compared to *Cbg*^{+/+}. This again may be explained by a lower metabolic action of glucocorticoids on triglycerides in the mutant mice. The expression of *11βHSD1* in hippocampus and *CRFR1* in hypothalamus are also slightly over-expressed in *Cbg*^{-/-} mice. Although their regulation by glucocorticoids might not be direct, their over-expression may have been induced over time in order to compensate for low corticosterone levels in *Cbg*^{-/-} mice.

Finally, *Cbg*^{-/-} mice were found ~9% heavier than *Cbg*^{+/+} controls using a large number of mice (*n* = 40 per group) and robust statistics (*p* < 0.001). *PPARγ* and *SREBP_{1C}* genes were slightly increased in the liver of *Cbg*^{-/-} mice, suggesting that their heavier weight may come from enhanced lipid synthesis. To complete these data it would be interesting to measure these genes in fat tissue as well. In a

previous analysis we had measured fat mass percentage using an X-ray scan and no difference were found between Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} despite a similar body weight difference. Rather, bone mineral density, another physiologic parameter down-regulated by glucocorticoid, was found elevated in Cbg^{-/-} (unpublished data).

Overall, our data suggest that Cbg^{-/-} kept under a standard diet and with limited stress show signs of hypocortisosteronism associated with behavioral and endocrine alterations.

2. Impact of HF diet in CBG deficient mice

Our data show that under a high fat diet, Cbg^{-/-} and Cbg^{+/+} presented the same weight gain at least after 12 weeks of diet. The food intake was also similar between genotypes, increasing in calories but decreasing in quantity.

Consequences of high fat diet on behavioral reactivity were observed in Cbg^{+/+} with significant decrease in locomotion in open field and a tendency for decreased immobility in forced swim test. However in Cbg^{-/-}, HF diet does not affect further the locomotion in open field that is already low nor does it changed the high immobility behavior in the forced swim test.

The impact of the HF diet on the HPA axis was absent or much weaker in Cbg^{-/-} mice contrary to Cbg^{+/+} mice : elevation of corticosterone levels was observed in both genotypes but CRF, as expected (Dallman et al., 1995), CRFR1 and POMC mRNAs induction were significant in Cbg^{+/+} only. Furthermore, NPY mRNA was greatly induced in both genotype in HF groups, as demonstrated in a study conducted on “obese “ Zucker rats (Dryden et al., 1995). Then, NPY gene expression was again found at a lower level in Cbg^{-/-}. It was described that this elevation of NPY mRNA contributed to energy and fat store, favoring obesity development.

Indeed, it was observed in rat studies that adrenalectomy led to decrease food intake, weight loss and was associated to decrease NPY efficiency (Castonguay et al., 1986). Then, effects of adrenalectomy were reversed by corticosterone administration (King et al., 1983). Moreover, high levels of corticosterone can lead to excessive food intake resulting to important weight gain and fat store (Campfield et al., 1995). In our experiment, whereas NPY was observed lower in Cbg^{-/-} HF mice food consumption was found similar between genotypes. This may be due to an inadequate food consumption assessment.

Similarly, the HF diet induced a hyperglycemia in both genotypes but after 18 weeks of diet this glucose increase in Cbg^{-/-} was no longer significant compared to controls. Furthermore, the differences between genotypes in free fatty acid levels as well as in Glut4, mRNA levels were exacerbated under HF diet. Finally, concerning neurotransmitters levels in cortex and genes involved in mood regulation no effect of HF diet was detected for either genotype.

Thus the HF diet resulted mainly in metabolic changes in both Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-}. The effect of HF diet on behavior are present only in Cbg^{+/+}. At the biological level there are differences between genotypes that may originate from corticosterone levels increased above normal values in Cbg^{+/+} HF while remaining low in Cbg^{-/-} HF. We observed for both genotypes expected physiological consequences of increased corticosterone in mice that are probably hyperinsulinemic under HF diet, e.g. increased lipid synthesis (measured through PPAR γ and SREBP1c). Regarding behavior, the influence of elevated corticosterone is not so clear as corticosterone usually leads to enhanced locomotor activity but the opposite was observed in the open field test.

3. Impact of UCMS in CBG deficient mice

Some authors had observed that chronic mild stress exposure can lead to weight loss associated to hypophagia and reduction of body fat mass in rodent (stress procedure consisting in chronic intermittent immobilization stress, 2 hours / day) and human (stress procedure consisting in an interview about the life events and recall difficulties) (Marti et al., 1993; Rojo et al., 2006). However in our study, the effect of UCMS treatment, consisting in most of the commonly used “mild” stressors (Mineur et al., 2006; Schweizer et al., 2009), was not observed on body weight, food intake, lipid synthesis in liver (through PPAR_γ or SREBP_{1C} mRNA expression), or sucrose preference for any genotype. However, plasma cholesterol levels were found lower after UCMS, equivalently in Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-}. Furthermore, the expected increase in immobility behavior was detected in the forced swim test in Cbg^{+/+} S mice although locomotor activity in the open field test was not affected. This result indicates that the UCMS treatment although moderate had an impact on emotional reactivity in wild-type animals.

Along the same lines, corticosterone levels were found decreased in Cbg^{+/+} S vs. controls in the evening and were associated with decreased 11βHSD1, MR and GR expression in hippocampus as expected (van Haarst et al., 1996; Furay et al., 2008), but with increased CRF and CRFR1 expression in hypothalamus. Furthermore, no effect of UCMS was detected on POMC mRNA levels in pituitary. Blunted corticosterone levels after chronic stress could be interpreted as a disengagement of the individual following repeated and uncontrollable stress. Noradrenaline levels in frontal cortex, BDNF and CB1 expression in hippocampus and Glut₄ expression in muscle were also down regulated by the UCMS regimen in

Cbg^{+/+} animals. These modifications may contribute to the altered behavior in the forced swim test. Interestingly, none of these effects were found in Cbg^{-/-}S mice. In these mutants, corticosterone levels are not different from Cbg^{-/-} controls after the UCMS treatment, remaining at low levels. The immobility behavior remained high and did not increase further and no effect on neither noradrenaline nor gene expression in brain or muscle was detected in Cbg^{-/-} S mice. Thus the Cbg^{-/-} mice presented an insensibility to the UCMS treatment that thus did not modify the endogenous helplessness trait and hypocorticism observed in Cbg^{-/-} controls.

4. Impact of HF diet combined to UCMS in CBG deficient mice

The HF diet combined to UCMS treatment provided unexpected results. In Cbg^{+/+} HFS mice, the UCMS treatment did not affect the weight gained by the HF diet, as observed in a study conducted on C57BL/6J male mice (Petro et al., 2004). The immobility behavior was high as for UCMS treatment alone and thus not modified by the combination with HF diet. However, at the biological levels we observed a normalization of corticosterone levels, MR, GR, 11bHSD1, CRF and CRFR1 mRNA expression in brain as well as noradrenaline levels in cortex and BDNF, CB1, Il-6 and Il1 β gene expression in hippocampus. Glut4 mRNA expression only, remained under normal values in Cbg^{+/+} HFS compared to Cbg^{+/+} controls. These results are in discrepancy with another study investigating a similar procedure consisting in a long term HF diet combined to chronic stress exposure, on male mice. In this study, authors showed a protective role of long term exposure to the similar HF diet to stress-induced depressive-like symptoms evaluated by the forced swim test and weight loss. Interestingly, they observed the opposite consequences with a low-fat diet showing no behavioral consequences due to chronic stress exposure that

remaining depressive-like compared to a standard diet (Finger et al., 2011). These results opposite to ours can be explained by the difference in the chronic stress protocol based on social defeat stress, psychologically and physically more intense than our chronic mild stress procedure.

In Cbg^{-/-} we obtained a very different picture. Cbg^{-/-} HFS showed an 18% weight loss compared to Cbg^{-/-} HF mice, indicating an effect of UCMS under HF diet that was not apparent under standard diet. The same Cbg^{-/-} HFS group presented a reduced immobility behavior in the forced swim test reaching levels similar to Cbg^{+/+} controls levels. However their locomotor activity in the open field is reduced compared to the Cbg^{-/-} S and equivalent to Cbg^{-/-} under standard or HF diet. The corticosterone levels of these Cbg^{-/-} HFS remained low especially in the evening and HPA genes were not affected except CRF expression slightly increased, as for Cbg^{-/-} HF. POMC gene expression in pituitary only was found elevated compared to Cbg^{-/-} controls. Serotonin and dopamine levels in cortex were also slightly increased and 5HT1A, BDNF, CB1 and Il-6 gene expression were found decreased compared to Cbg^{-/-} controls. In this group as for Cbg^{+/+}HFS, Glut4 mRNA levels were very low.

Taken together these data suggest that in Cbg^{+/+} animals the effect of HF diet and of UCMS on biological parameters are compensated when HF diet and UCMS are combined except for glucose utilization. As the weight gain and the helplessness trait remained in the Cbg^{+/+} HFS group, it is tempting to conclude that glucose utilization is major in the maintenance of the obese and depressive-like phenotypes. However, Glut₄ mRNA levels were found very low too in the Cbg^{-/-} HFS group that showed a weight loss and a decrease in immobility behavior in the forced swim test. In this Cbg^{-/-} HFS group, some biological modifications may explain the phenotypes observed : the increase in CRF and POMC mRNA levels, as well as the decrease in

CB1 and Il-6 mRNA levels, suggest that the glucocorticoid signaling is enhanced compared to Cbg^{-/-} controls. Corticosterone levels reached normal Cbg^{+/+} values in the morning but remained low in the evening. Free corticosterone levels remain unmeasured but may reveal an increased glucocorticoid signaling in this group. Finally, the restoration of normal Il-6 mRNA levels in the hippocampus may contribute to the decreased despair-like behavior (Dantzer et al., 2008).

Overall, these results showed that Cbg^{-/-} mice coped differently to a control mice in HF, UCMS or HF combined to UCMS conditions where they were paradoxically more “adapted” to this situation apparently strongly aversive. This study prompted us to demonstrate a larger and important role of CBG expression that those previously described. Despite these direct effects on glucocorticoids pool size in plasma, CBG present important roles in the metabolic field especially on lipids composition and synthesis and glucose reuptake. Supplemental analyses of these systems are necessary to determine a more precisely role of CBG, but best considerations must be really taken concerning CBG glycoprotein.

References

- Ackman RG (1981) Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. *Methods Enzymol* 72:205-252.
- Adam TC, Epel ES (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 91:449-458.
- Bartolomucci A, Pederzani T, Sacerdote P, Panerai AE, Parmigiani S, Palanza P (2004) Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 29:899-910.
- Bartolomucci A, Cabassi A, Govoni P, Ceresini G, Cero C, Berra D, Dadomo H, Franceschini P, Dell'Omo G, Parmigiani S, Palanza P (2009) Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *PLoSOne* 4:e4331.
- Bolanos CA, Willey MD, Maffeo ML, Powers KD, Kinka DW, Grausam KB, Henderson RP (2008) Antidepressant treatment can normalize adult behavioral deficits induced by early-life exposure to methylphenidate. *Biol Psychiatry* 63:309-316.
- Bornstein SR, Schuppenies A, Wong ML, Licinio J (2006) Approaching the shared biology of obesity and depression: the stress axis as the locus of gene-environment interactions. *Mol Psychiatry* 11:892-902.
- Bremmer MA, Deeg DJ, Beekman AT, Penninx BW, Lips P, Hoogendijk WJ (2007) Major depression in late life is associated with both hypo- and hypercortisolemia. *Biol Psychiatry* 62:479-486.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *ClinChem* 55:611-622.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549.
- Cancello R, Clement K (2006) Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 113:1141-1147.
- Carroll TB, Findling JW (2010) The diagnosis of Cushing's syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 11:147-153.
- Castonguay TW, Dallman MF, Stern JS (1986) Some metabolic and behavioral effects of adrenalectomy on obese Zucker rats. *Am J Physiol* 251:R923-933.
- Chrousos GP (2009) Stress and disorders of the stress system. *NatRevEndocrinol* 5:374-381.
- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Sebastian RJ (1995) The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. *Ann N Y Acad Sci* 771:730-742.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, la Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S (2003) Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *ProcNatlAcadSciUSA* 100:11696-11701.
- Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE, Warne JP, Ginsberg AB, Akana SF, Laugero KC, Houshyar H, Strack AM, Bhatnagar S, Bell ME (2006) Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. *ProgBrain Res* 153:75-105.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *NatRevNeurosci* 9:46-56.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.
- Dinneen S, Alzaid A, Miles J, Rizza R (1995) Effects of the normal nocturnal rise in cortisol on carbohydrate and fat metabolism in IDDM. *Am J Physiol* 268:E595-603.
- Dryden S, Pickavance L, Frankish HM, Williams G (1995) Increased neuropeptide Y secretion in the hypothalamic paraventricular nucleus of obese (fa/fa) Zucker rats. *Brain Res* 690:185-188.
- Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K (2001) Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26:37-49.

- Finger BC, Dinan TG, Cryan JF (2011) High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. *Neuroscience* 192:351-360.
- Furay AR, Bruestle AE, Herman JP (2008) The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress. *Endocrinology* 149:5482-5490.
- Gagliardi L, Ho JT, Torpy DJ (2010) Corticosteroid-binding globulin: the clinical significance of altered levels and heritable mutations. *MolCell Endocrinol* 316:24-34.
- Gold PW, Chrousos GP (2002) Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *MolPsychiatry* 7:254-275.
- Huang ST, Cidlowski JA (2002) Phosphorylation status modulates Bcl-2 function during glucocorticoid-induced apoptosis in T lymphocytes. *FASEB J* 16:825-832.
- King BM, Banta AR, Tharel GN, Bruce BK, Frohman LA (1983) Hypothalamic hyperinsulinemia and obesity: role of adrenal glucocorticoids. *Am J Physiol* 245:E194-199.
- Kivimaki M, Head J, Ferrie JE, Shipley MJ, Brunner E, Vahtera J, Marmot MG (2006) Work stress, weight gain and weight loss: evidence for bidirectional effects of job strain on body mass index in the Whitehall II study. *Int J Obes (Lond)* 30:982-987.
- Kyrou I, Tsigos C (2009) Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *CurrOpinPharmacol* 9:787-793.
- Lanfumey L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, Hamon M (2008) Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *NeurosciBiobehavRev* 32:1174-1184.
- Lovas K, Husebye ES (2007) Continuous subcutaneous hydrocortisone infusion in Addison's disease. *Eur J Endocrinol* 157:109-112.
- Marti O, Gavaldà A, Jolin T, Armario A (1993) Effect of regularity of exposure to chronic immobilization stress on the circadian pattern of pituitary adrenal hormones, growth hormone, and thyroid stimulating hormone in the adult male rat. *Psychoneuroendocrinology* 18:67-77.
- McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873-904.
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2006) Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *BehavBrain Res* 175:43-50.
- Moilanen T, Nikkari T (1981) The effect of storage on the fatty acid composition of human serum. *Clin Chim Acta* 114:111-116.
- Moisan MP (2010) Genotype-phenotype associations in understanding the role of corticosteroid-binding globulin in health and disease animal models. *Mol Cell Endocrinol* 316:35-41.
- Moles A, Bartolomucci A, Garbugino L, Conti R, Caprioli A, Coccorello R, Rizzi R, Ciani B, D'Amato FR (2006) Psychosocial stress affects energy balance in mice: modulation by social status. *Psychoneuroendocrinology* 31:623-633.
- Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res* 5:600-608.
- Navailles S, Benazzouz A, Bioulac B, Gross C, De Deurwaerdere P (2010) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-3,4-dihydroxyphenylalanine inhibit in vivo serotonin release in the prefrontal cortex and hippocampus in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 30:2356-2364.
- Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31:464-468.
- Petro AE, Cotter J, Cooper DA, Peters JC, Surwit SJ, Surwit RS (2004) Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. *Metabolism* 53:454-457.
- Raber J (1998) Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. From obesity to memory deficits. *Mol Neurobiol* 18:1-22.
- Rhen T, Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353:1711-1723.

- Richard EM, Helbling JC, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cadot M, Pourtau L, Konsman JP, Mormede P, Moisan MP (2010) Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151:649-659.
- Rojo L, Conesa L, Bermudez O, Livianos L (2006) Influence of stress in the onset of eating disorders: data from a two-stage epidemiologic controlled study. *Psychosom Med* 68:628-635.
- Rosmond R, Dallman MF, Bjorntorp P (1998) Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *JClinEndocrinolMetab* 83:1853-1859.
- Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I (2009) Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoSOne* 4:e4326.
- Sébédio JL, Juanéda P (1991) Quantitative lipid analyses using the new Iatroscan TLC-FID system. *J Planar Chrom* 4:35-41.
- Smith AW, Baum A, Wing RR (2005) Stress and weight gain in parents of cancer patients. *Int J Obes (Lond)* 29:244-250.
- Solomon MB, Foster MT, Bartness TJ, Huhman KL (2007) Social defeat and footshock increase body mass and adiposity in male Syrian hamsters. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 292:R283-R290.
- van Haarst AD, Oitzl MS, Workel JO, de Kloet ER (1996) Chronic brain glucocorticoid receptor blockade enhances the rise in circadian and stress-induced pituitary-adrenal activity. *Endocrinology* 137:4935-4943.

Figure legends

Table 1: Sequences of primers used for gene expression analyses by RT-qPCR

Genes	Primers	Sequence 5' → 3'
18 S RNA	Forward	ACCGCAGCTAGGAATAATGGA
	Reverse	GCCTCAGTTCCGAAAACCAA
MR RNA	Forward	GCCGTGGAAGGACAACACA
	Reverse	CCTAAGTTCATGCCGGCTTG
GR RNA	Forward	GTGGAAGGACAGCACAATTACCT
	Reverse	GCGGCATGCTGGACAGTT
CRF RNA	Forward	CAGCCCTTGAATTTCTTGCA
	Reverse	TCACCCATGCCGGATCAGA
CRF-R1 RNA	Forward	GGAGCATCCGGTGCCCTG
	Reverse	AAAGCCGAGATGAGGTTCCA
POMC RNA	Forward	ACGGAGAGCAACCTGCTGG
	Reverse	GCGAGAGGTCGAGTTTGCA
11βHSD1 RNA	Forward	GGAAGGTCTCCAGAAGGTAGTGTC
	Reverse	GAGGCTGCTCCGAGTTCAAG
IL-6 RNA	Forward	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT
	Reverse	AATCAGAATTGCCATTGCACAA
IL-1β RNA	Forward	AACCAACAAGTGATATTCTCCATGAG
	Reverse	GCCCAAGGCCACAGGTATT
5-HT _{1A} RNA	Forward	TCACTTGGCTCATTGGCTTTC
	Reverse	GCGCCAGCCCAGCAT
BDNF RNA	Forward	CACAATGTTCCACCAGGTGAGA
	Reverse	GCCTTCATGCAACCGAAGT
CB1 RNA	Forward	GTGCTGTTGCTGTTTCATTGTG
	Reverse	CTTGCCATCTTCTGAGGTGTG
NPY RNA	Forward	TCCAGCCCTGAGACACTGATT
	Reverse	CACCACATGGAAGGGTCTTCA
Glut4 RNA	Forward	TCCCTTCAGTTTGGCTATAACATTG
	Reverse	CTACCCAGCCACGTTGCATT
PPAR γ RNA	Forward	CACAATGCCATCAGGTTTGG
	Reverse	GCTGGTCGATATCACTGGAGATC
SREPB1c RNA	Forward	GGCACTAAGTGCCCTCAACCT
	Reverse	GCCACATAGATCTCTGCCAGTGT

Figure 1: Experimental design

Experimental design of this experiment conducted on 20 weeks. Cbg+/+ and Cbg-/- male mice (2Cbg+/+ and 2 Cbg-/- per cage) were submitted to standard diet or to high fat (HF) diet, for 20 weeks. Then, at week 14, an unpredictable chronic mild stress procedure (UCMS) was imposed during 4 weeks to half of the cages for each diet group, then placed in individual cage. The UCMS procedure consisted of random exposure to many mild stressors, twice a day as described in the table (O/N for overnight). Thus, 8 groups of mice composed this experiment: mice in standard diet (Cbg+/+, Cbg-/-), mice in HF diet (Cbg+/+ HF, Cbg-/- HF), mice in standard diet with UCMS procedure (Cbg+/+ S, Cbg-/- S) and mice in HF diet with UCMS procedure (Cbg+/+ HFS, Cbg-/- HFS). Some behavioral tests were performed: sucrose preference tests (on week 12 and 18), open field (week 18) and forced swim test (week 19). Animals were sacrificed the morning on week 20.

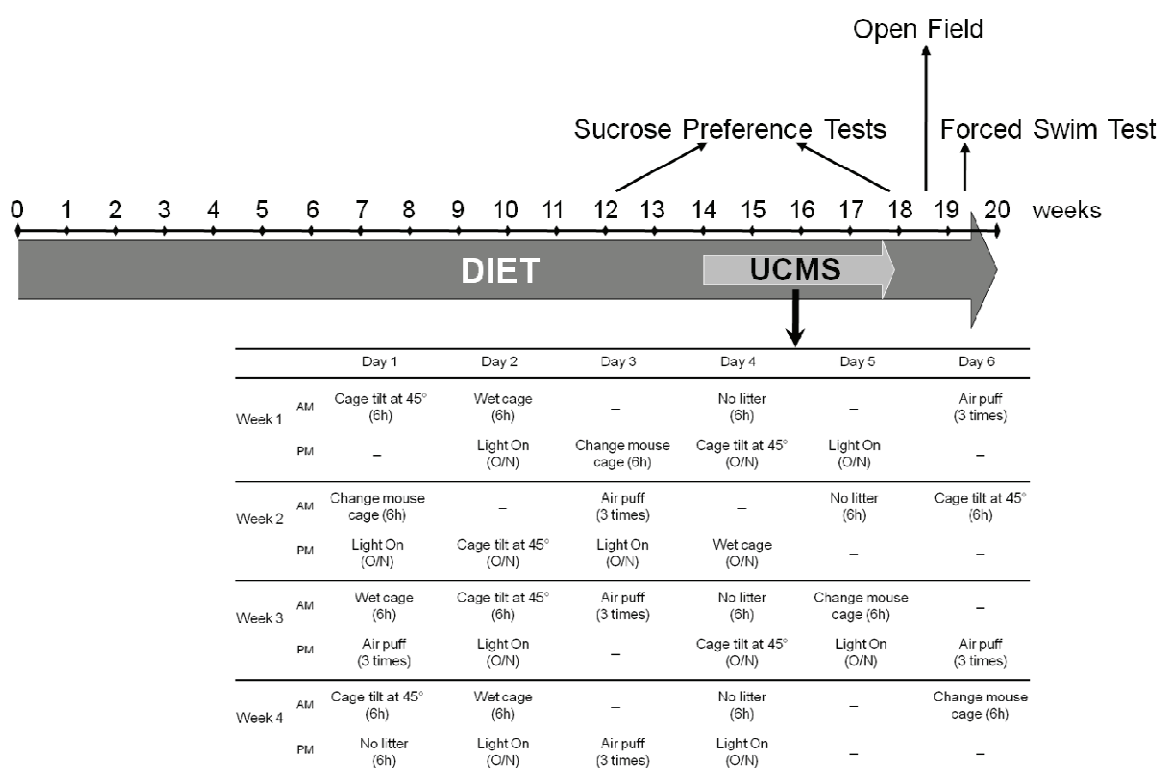


Figure 2: Body weight evolution

A: body weight of Cbg+/+ and Cbg-/- mice at the beginning of the experiment (day 0), in standard diet

Body weight evolution for the 20 weeks of experiment time in Cbg+/+ (**B**) and Cbg-/- mice (**C**). Standard or HF diet was imposed for 20 weeks; the UCMS procedure began week 14 and finished week 18.

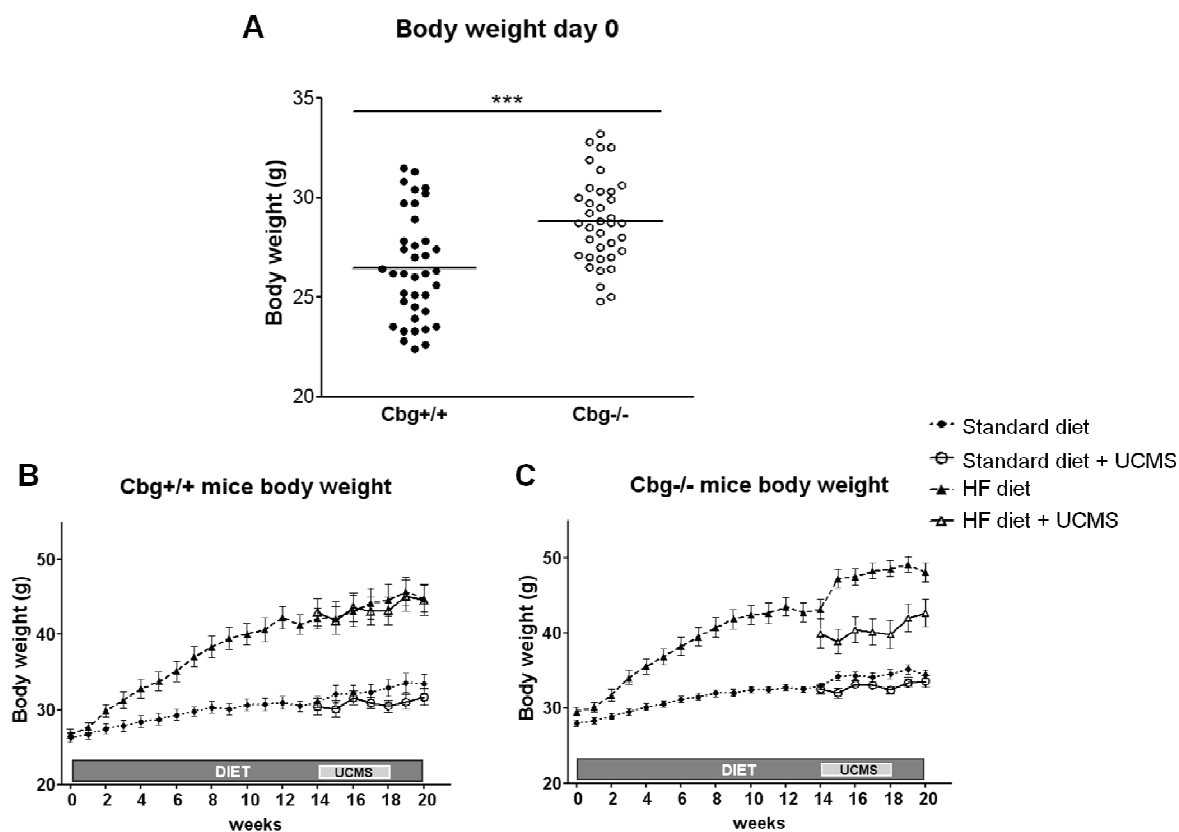


Figure 3: Consequences of HF diet and UCMS procedure on emotional behavior

Sucrose preference test was conducted two times at week 12, and 18. **A:** Sucrose 1% consumption during two consecutive days at week 12, on animals in standard diet or HF diet. At this stage, animals were 4 per cage (2 Cbg+/+ and 2 Cbg-/-). **B:** Sucrose 1% consumption during two consecutive days at week 18, on animals in standard diet or HF diet, without stress. Animals were always 4 per cage (2 Cbg+/+ and 2 Cbg-/-). **C:** Sucrose 1% consumption during two consecutive days at week 18, on animals in standard diet or HF diet, combined with UCMS procedure. Animals Cbg+/+ or Cbg-/- were placed in individual cage.

Then, animals were submitted to the open field test conducted the evening. Locomotor activity evaluated by the number of squared crossed (**D**) and anxiety like behavior evaluated by the number of center squared crossed / total number of squares crossed on the 8 groups of mice (**E**).

Finally, despair-like behavior was evaluated the evening in the forced swim test on the 8 groups of mice (**F**).

* post-hoc *p* value vs. Cbg+/+; + post-hoc *p* value vs. Cbg-/-; \$ post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ HF, # post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ S and □ post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ HFS.

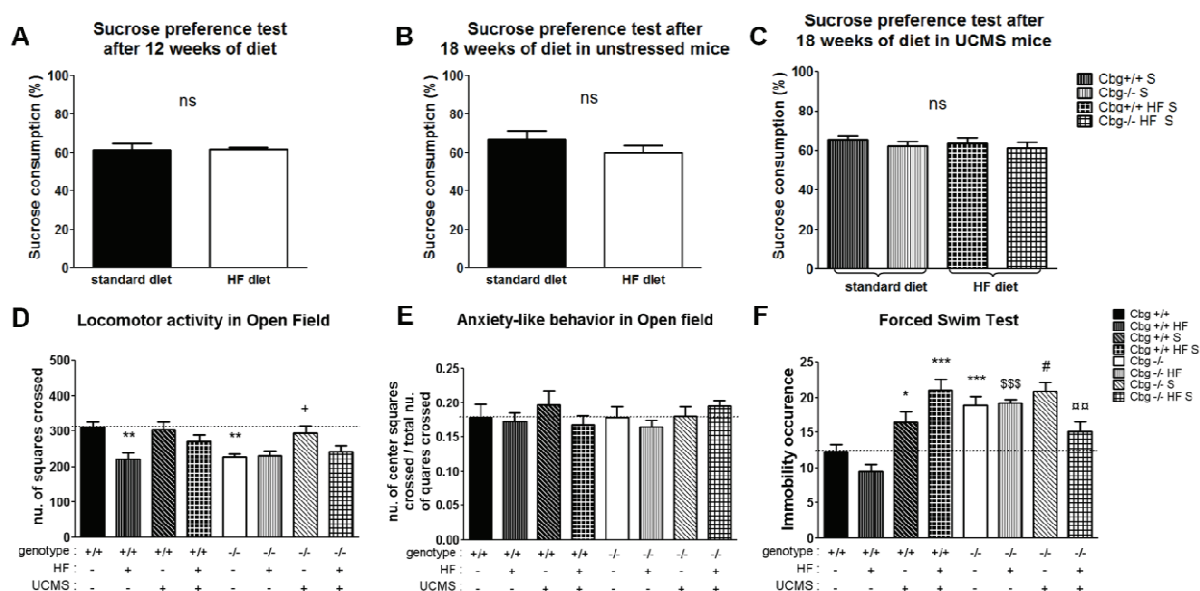


Figure 4: Total plasma corticosterone concentration (nM)

Concentration in the morning (A) and the evening (B) of week 18, on the 8 groups of mice

* post-hoc *p* value vs. Cbg+/+; + post-hoc *p* value vs. Cbg-/-; \$ post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ HF, # post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ S and □ post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ HFS.

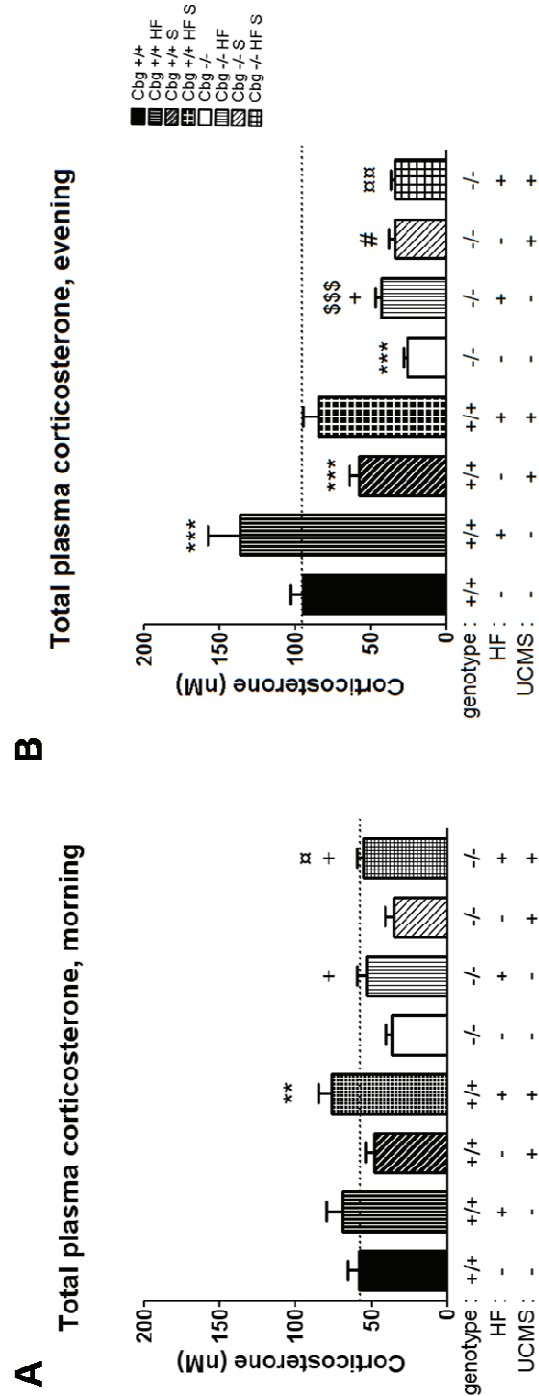


Figure 5: Gene expression of HPA axis gene involved in HPA axis activity

Gene expression by RT-qPCR of MR (A), GR (B) and 11 β HSD₁ (C) in hippocampus, of CRF (D) and CRF-R1 (E) in hypothalamus and CRF-R1 (F) and POMC (G) in pituitary.

Major statistical effects are written on each figure and when a significant effect is detected the post-hoc *p* value is illustrated by a symbol: * post-hoc *p* value vs. Cbg+/+; + post-hoc *p* value vs. Cbg-/-; \$ post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ HF, # post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ S and \square post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ HFS.

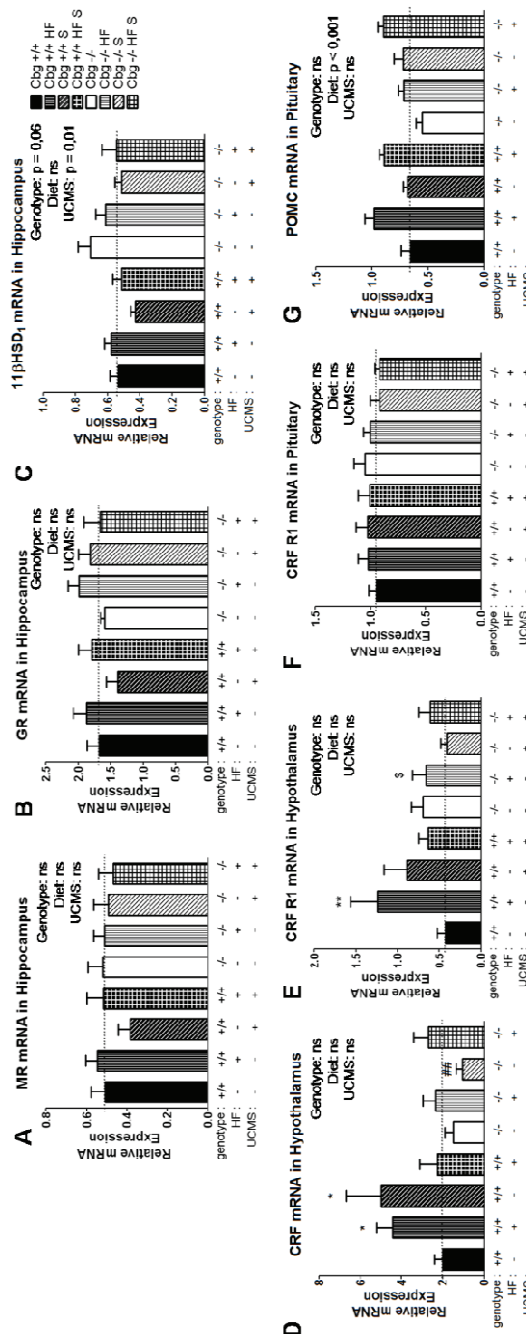


Figure 6: Food intake monitored for both quantitative (grams) and quantitative (kilocalories) consumption on week 19

A & B: Food intake for unstressed mice. These measures were done on common cage of 2 Cbg+/+ and 2 Cbg-/-.

C & D: Food intake for UCMS mice. These measures were done on individual cage of Cbg+/+ or Cbg-/- mice.

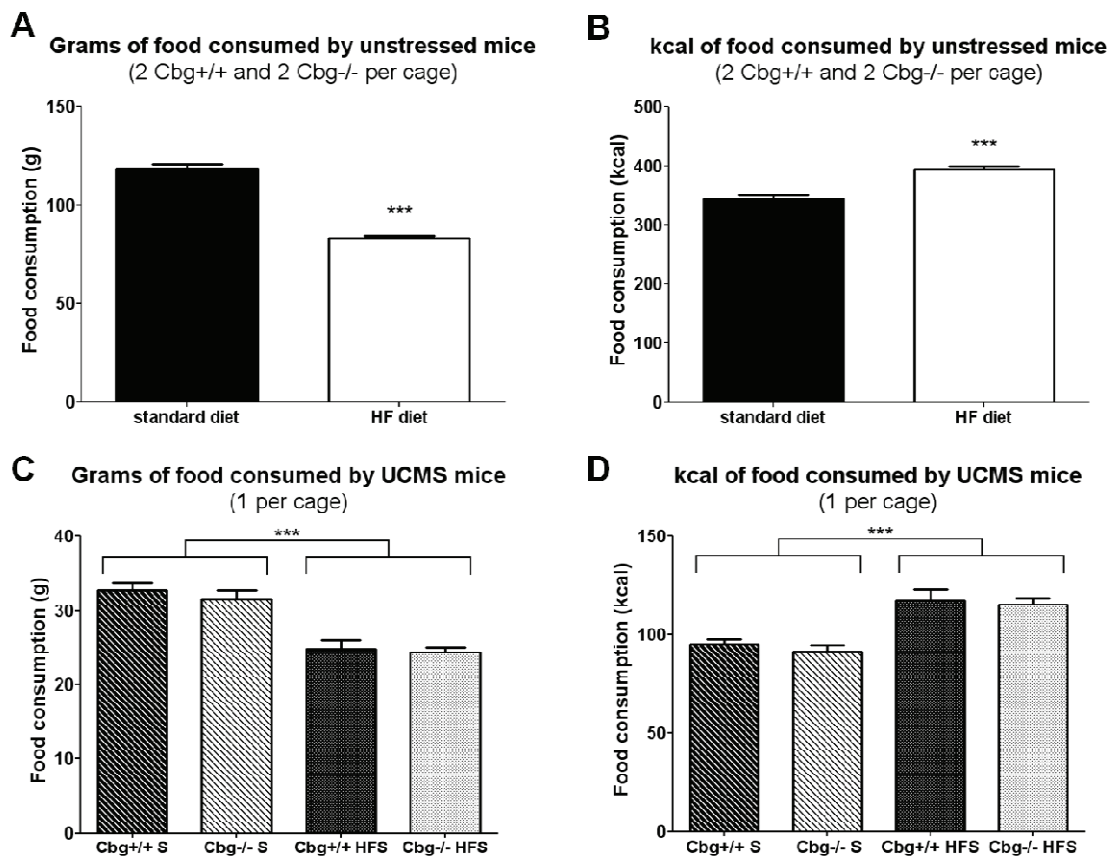


Figure 7: Blood glucose concentration and Glut₄ mRNA expression in muscle

Blood glucose concentration (mg/mL) measured at week 12 (A) and at week 18 of the experiment (B).

C: Glut₄ mRNA expression measured by RT-qPCR in muscle in the 8 groups of mice. Major statistical effects are written on Glut₄ figure.

* post-hoc *p* value vs. Cbg+/+; + post-hoc *p* value vs. Cbg-/-; \$ post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ HF, # post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ S and □ post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ HFS.

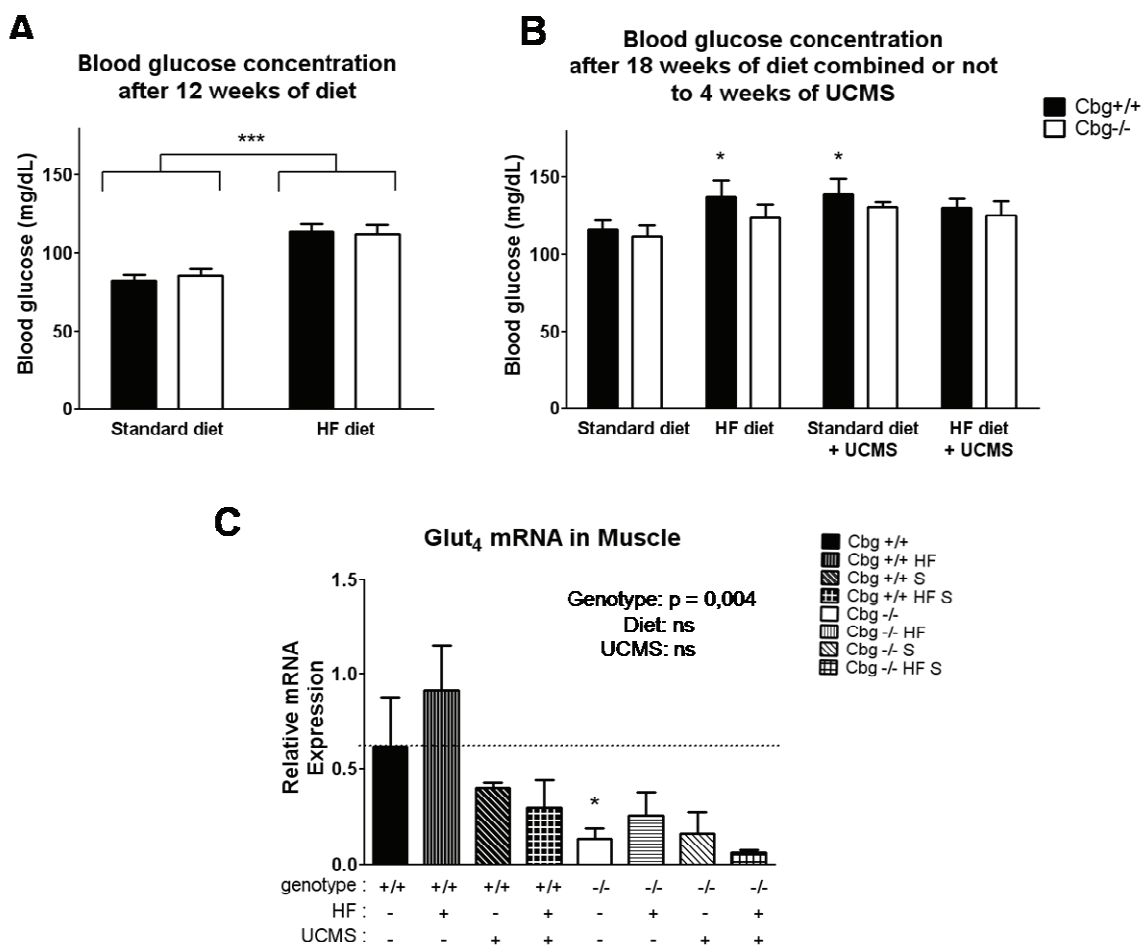


Figure 8: Plasma lipids profiles in the 8 groups of mice, measured week 20 at sacrifice including **A**: cholesterols, **B**: cholesterols esters, **C**: triglycerides, **D**: free fatty acids and **E**: phospholipids.

Major statistical effects are written on each figure and when a significant effect is detected the post-hoc *p* value is illustrated by a symbol *.

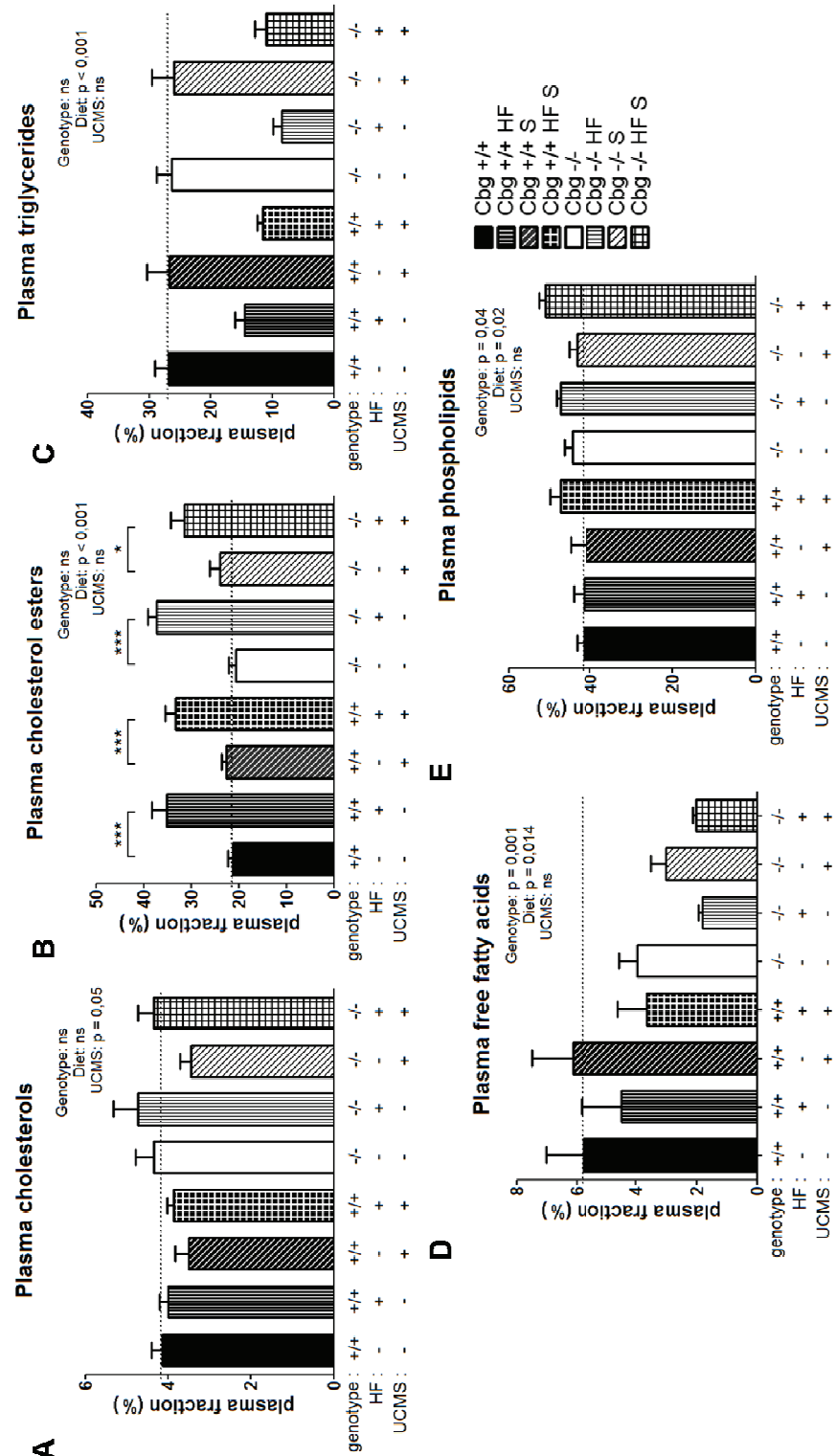


Figure 9: Gene expression of PPAR γ (A) and SREBP $_{1c}$ (B) in liver, both genes implicated in lipid synthesis, measured by RT-qPCR

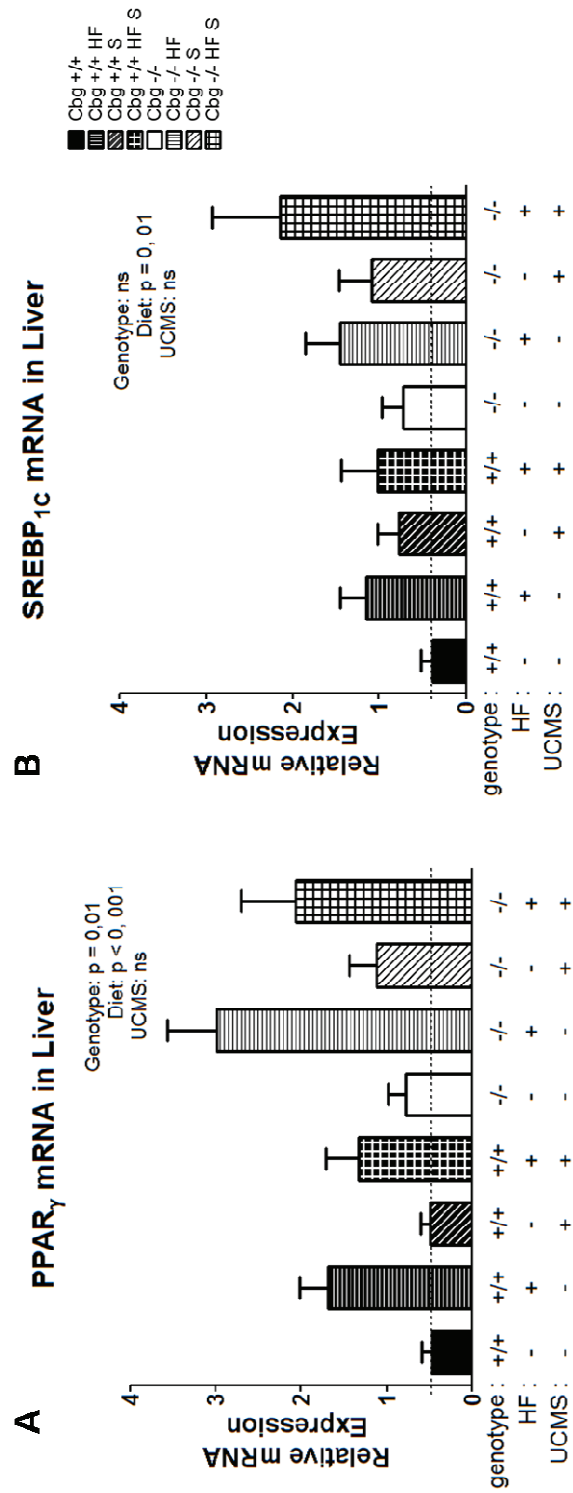


Figure 10: Monoamines norepinephrine (A), serotonin (B), and its main metabolite 5-HIAA (C), dopamine (D) and its metabolite DOPAC (E) were measured in frontal cortex of each mice group by HPLC.

Major statistical effects are written on each figure and when a significant effect is detected the post-hoc *p* value is illustrated by a symbol: * post-hoc *p* value vs. Cbg+/+; # post-hoc *p* value vs. Cbg+/+ S

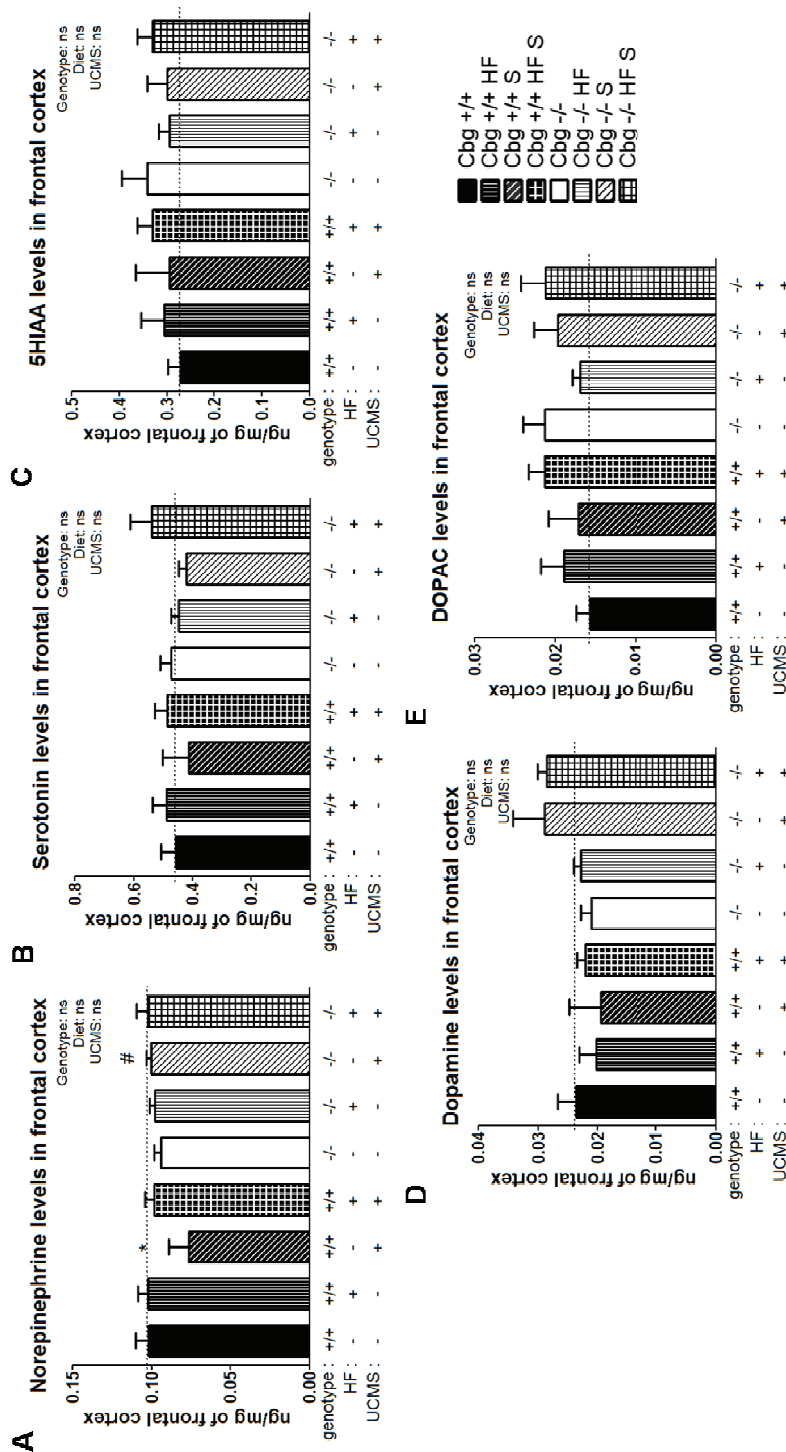
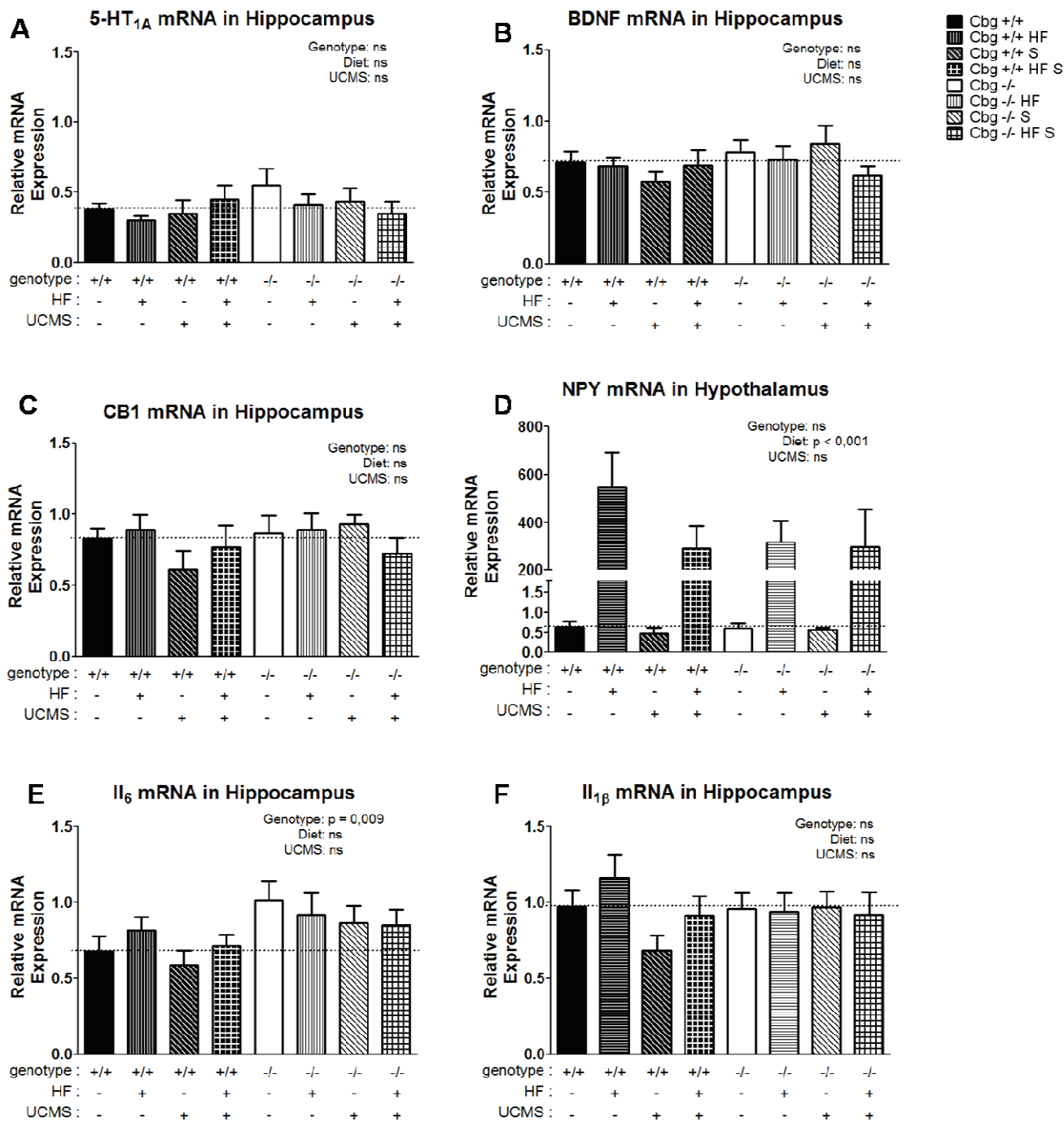


Figure 11: mRNA levels of genes, measured by RT-qPCR, regulated by glucocorticoids and diet and involved in mood regulation

A: 5-HT_{1A} mRNA in hippocampus, **B:** BDNF mRNA in hippocampus, **C:** CB1 mRNA in hippocampus, **D:** NPY mRNA in hypothalamus, **E:** Il-6 mRNA in hippocampus, **F:** Il-1 β mRNA in hippocampus.

Major statistical effects are written on each figure



Supplemental data

Table 1: Analysis of plasma fatty acids composition of cholesterol ester class

PLASMA FATTY ACIDS COMPOSITION OF CHOLESTEROL ESTERS CLASS

fatty acids:	genotype Cbg+/+		Cbg+/+ Cbg+/+		Cbg+/+ Cbg-/-		Cbg-/- Cbg-/-		Cbg-/- HF		Cbg-/- S		genotype = geno	diet	UCMS	geno x diet	UCMS	geno x diet x UCMS
	standard	no	standard	HF	standard	HF	standard	HF	standard	HF	standard	HF						
12:0	0.36	0.28	0.09	0.14	0.38	0.26	0.08	0.12	0.14	0.34	0.92	0.005	0,71	<0,0001	0,14	0,34	0,92	0,62
14:0	0.73	1.10	0.44	0.76	1.41	0.63	0.24	0.51	0.65	0.24	0,049	0,58	0,008	0,65	0,24	0,049	0,14	0,14
15:0	1.36	1.24	0.55	0.55	1.02	0.34	0.08	0.16	0.14	0,95	0,65	0,003	0,0006	0,14	0,95	0,65	0,62	0,62
16:0	6.96	5.73	4.93	6.44	6.90	4.67	3.40	4.34	0.53	0,06	0,48	0,02	0,04	0,53	0,06	0,48	0,71	0,71
16:1n-9	0.72	0.69	0.46	0.42	0.72	0.64	0.45	0.45	0.24	0,65	0,89	0,72	<0,0001	0,24	0,65	0,89	0,60	0,58
16:1n-7	10.79	9.61	2.82	1.84	11.20	10.23	2.80	2.21	0.04	0,80	0,86	0,50	<0,0001	0,04	0,80	0,86	0,77	0,77
17:0	0.56	0.66	0.15	0.17	0.36	0.28	0.08	0.21	0.97	0,14	0,69	0,99	0,0002	0,97	0,14	0,69	0,24	0,68
18:0	1.15	1.20	1.83	3.22	1.24	0.66	0.28	0.85	0.35	0,003	0,34	0,005	0,04	0,35	0,003	0,34	0,36	0,36
18:1n-9	11.20	10.43	5.74	5.72	11.62	10.80	6.04	6.49	0.48	0,89	0,77	0,27	<0,0001	0,48	0,89	0,77	0,25	0,79
18:1n-7	1.60	1.19	0.51	0.51	1.33	1.35	0.48	0.46	0.13	0,93	0,12	0,43	<0,0001	0,13	0,93	0,12	0,12	0,07
18:2n-6	38.36	38.31	34.85	33.67	37.21	37.14	34.44	38.15	0.07	0,055	0,17	0,54	0,007	0,13	0,055	0,17	0,82	0,11
18:3n-6	0.77	0.79	0.75	0.96	0.69	0.94	0.76	0.80	0.22	0,56	0,99	0,76	0,78	0,22	0,56	0,99	0,94	0,36
18:3n-3	0.54	0.56	0.30	0.33	0.87	0.47	0.24	0.38	0.39	0,26	0,21	0,36	<0,0001	0,39	0,26	0,21	0,02	0,04
20:3n-9	0.60	0.63	0.22	0.18	0.41	0.80	0.22	0.19	0.03	0,83	0,06	0,70	<0,0001	0,03	0,83	0,06	0,007	0,054
20:3n-6	0.99	1.27	1.18	1.01	1.07	1.31	1.28	0.99	0.69	0,97	0,38	0,28	0,27	0,69	0,97	0,38	<0,0001	0,77
20:4n-6	16.84	19.50	40.56	39.76	16.88	21.94	44.85	39.70	0.46	0,54	0,43	0,16	<0,0001	0,46	0,54	0,43	0,0007	0,12
20:5n-3	2.35	2.38	0.68	0.58	2.31	2.42	0.61	0.67	0.74	0,74	0,45	0,97	<0,0001	0,74	0,74	0,45	0,41	0,64
22:6n-3	4.12	4.42	3.79	3.75	4.39	5.12	3.67	3.35	0.31	0,07	0,71	0,37	<0,0001	0,31	0,07	0,71	0,005	0,60

Table 2: Analysis of plasma fatty acids composition of phospholipids class

PLASMA FATTY ACIDS COMPOSITION OF PHOSPHOLIPIDS CLASS

genotype	Cbgt+/+		Cbgt+/-		Cbgt+/-		Cbgt+/-		Cbgt+/-		genotype =		Statistical analysis: p value		diet x geno x diet x UCMS			
	standard	no	standard	no	standard	no	standard	no	HF	S	genotype =	diet	UCMS	genotype =		genotype =		
diet UCMS	standard	no	standard	no	standard	no	standard	no	HF	S	HF	S	diet	UCMS	diet x UCMS	genotype =	genotype =	
fatty acids:																		
14:0	0.20	0.14	0.12	0.23	0.33	0.19	0.11	0.10	0.10	0.10	0.62	0.02	0.27	0.03	0.002	0.03	0.69	
15:0	0.25	0.21	0.09	0.13	0.29	0.17	0.09	0.11	0.11	0.11	0.84	<0.0001	0.25	0.84	0.007	0.14	0.52	
16:0	28.64	28.15	22.29	21.97	31.45	33.52	30.51	26.16	26.16	26.16	<0.0001	<0.0001	0.26	0.13	0.03	0.59	0.02	
16:1n-9	0.24	0.24	0.21	0.21	0.24	0.32	0.29	0.27	0.27	0.27	0.0001	0.17	0.34	0.22	0.08	0.28	0.055	
16:1n-7	1.11	0.97	0.38	0.32	1.33	1.25	0.48	0.41	0.41	0.41	0.0002	<0.0001	0.049	0.07	0.59	0.77	0.63	
17:0	0.44	0.37	0.25	0.26	0.42	0.30	0.33	0.34	0.34	0.34	0.57	0.0042	0.15	0.04	0.06	0.58	0.65	
18:0	11.16	11.21	17.96	18.03	11.84	12.72	23.40	23.71	23.71	23.71	<0.0001	<0.0001	0.57	0.0003	0.80	0.63	0.79	
18:1n-9	13.59	13.46	8.74	8.33	12.74	14.03	9.45	9.18	9.18	9.18	0.27	<0.0001	0.69	0.12	0.12	0.18	0.28	
18:1n-7	3.90	3.19	1.92	1.61	3.28	4.02	2.16	1.93	1.93	1.93	0.16	<0.0001	0.35	0.53	0.29	0.008	0.02	
18:2n-6	23.55	24.32	24.90	24.97	22.29	19.87	20.29	21.74	21.74	21.74	<0.0001	0.18	0.96	0.42	0.23	0.48	0.09	
20:0	0.25	0.26	0.17	0.19	0.29	0.26	0.18	0.26	0.26	0.26	0.03	<0.0001	0.23	0.52	0.03	0.67	0.08	
18:3n-6	0.11	0.11	0.10	0.11	0.12	0.11	0.07	0.10	0.10	0.10	0.22	0.051	0.23	0.04	0.19	0.55	0.37	
20:1n-9	0.38	0.36	0.23	0.26	0.37	0.38	0.27	0.28	0.28	0.28	0.28	<0.0001	0.60	0.44	0.53	0.78	0.50	
18:3n-3	0.52	0.47	0.15	0.26	0.43	0.44	0.13	0.15	0.15	0.15	0.006	<0.0001	0.28	0.95	0.052	0.81	0.07	
20:2n-6	0.30	0.27	0.45	0.39	0.27	0.27	0.36	0.36	0.36	0.36	0.004	<0.0001	0.10	0.03	0.71	0.04	0.49	
20:3n-9	0.40	0.39	0.14	0.11	0.31	0.37	0.10	0.09	0.09	0.09	0.12	<0.0001	0.91	0.67	0.36	0.38	0.65	
22:0	0.23	0.21	0.24	0.23	0.21	0.15	0.13	0.20	0.20	0.20	0.051	0.95	0.83	0.54	0.22	0.74	0.20	
20:3																		
5,11,14	0.18	0.16	0.26	0.21	0.16	0.16	0.19	0.19	0.19	0.19	0.01	<0.0001	0.07	0.07	0.29	0.09	0.45	
20:3n-6	2.20	2.23	2.65	2.38	1.93	2.05	1.86	1.78	1.78	1.78	0.0005	0.59	0.66	0.06	0.31	0.56	0.84	
20:4n-6	5.02	5.41	11.83	12.74	5.18	4.30	6.79	8.88	8.88	8.88	<0.0001	<0.0001	0.21	0.0003	0.09	0.97	0.23	
20:5n-3	0.59	0.61	0.11	0.17	0.57	0.34	0.08	0.10	0.10	0.10	0.003	<0.0001	0.27	0.18	0.03	0.03	0.09	
24:1n-9	0.27	0.29	0.27	0.30	0.32	0.20	0.31	0.29	0.29	0.29	0.82	0.38	0.35	0.42	0.34	0.09	0.36	
22:4n-6	0.17	0.20	0.22	0.21	0.21	0.15	0.13	0.15	0.15	0.15	0.04	0.81	0.72	0.047	0.56	0.33	0.12	
22:5n-6	0.25	0.25	0.46	0.37	0.19	0.17	0.18	0.22	0.22	0.22	<0.0001	<0.0001	0.28	0.0007	0.65	0.16	0.08	
22:5n-3	0.44	0.48	0.29	0.27	0.44	0.35	0.15	0.20	0.20	0.20	0.0009	<0.0001	0.78	0.39	0.42	0.55	0.052	
22:6n-3	5.62	6.05	5.55	5.76	4.81	3.91	1.95	2.80	2.80	2.80	<0.0001	0.0007	0.60	0.004	0.20	0.55	0.09	

Table 3: Analysis of plasma fatty acids composition of triglycerids class

PLASMA FATTY ACIDS COMPOSITION OF TRIGLYCERIDES CLASS

genotype	Cb _g +/+		Cb _g +/-		Cb _g -/-		Cb _g -/-		Cb _g -/-		genotype = geno	diet	UCMS	Statistical analysis; p value		geno x diet x UCMS	
	standard no	standard S	HF	no	standard no	standard S	HF	no	HF	S				geno x diet	geno x UCMS		diet x UCMS
fatty acids:																	
14:0	1,08	1,00	0,68	1,32	1,59	1,41	0,69	1,02	1,02	0,26	0,02	0,20	0,03	0,45	0,03	0,69	
15:0	0,61	0,62	0,46	0,40	0,82	0,90	0,14	0,29	0,29	0,93	0,01	0,77	0,11	0,62	0,99	0,79	
16:0	21,79	22,58	20,58	20,13	25,48	27,41	22,11	18,83	18,83	0,005	<0,0001	0,73	0,01	0,57	0,03	0,18	
16:1n-9	0,93	0,91	1,11	1,09	0,92	1,29	1,49	0,93	0,93	0,01	0,02	0,30	0,51	0,55	0,0003	0,0003	
16:1n-7	7,27	6,33	2,74	2,28	8,95	8,54	3,26	2,08	2,08	0,01	<0,0001	0,07	0,03	0,91	0,86	0,44	
17:0	0,33	0,51	0,23	0,57	0,53	0,47	0,32	0,23	0,23	0,88	0,25	0,39	0,33	0,11	0,75	0,64	
18:0	2,22	2,28	5,23	5,64	2,14	1,92	5,01	6,66	6,66	0,68	<0,0001	0,03	0,15	0,26	0,01	0,08	
18:1n-9	31,30	32,71	35,05	34,26	30,51	32,91	36,50	37,14	37,14	0,23	<0,0001	0,24	0,11	0,43	0,20	0,89	
18:1n-7	6,91	5,81	3,00	2,70	6,33	7,06	3,28	2,93	2,93	0,17	<0,0001	0,23	0,85	0,04	0,73	0,03	
18:2n-6	17,24	17,16	20,40	20,34	14,08	11,77	17,40	19,72	19,72	<0,0001	<0,0001	0,96	0,07	0,95	0,08	0,08	
20:0	0,27	0,36	0,23	0,24	0,37	0,30	0,21	0,28	0,28	0,48	0,001	0,76	0,80	0,37	0,54	0,03	
18:3n-6	0,27	0,29	0,29	0,28	0,18	0,20	0,32	0,25	0,25	0,17	0,16	0,76	0,20	0,69	0,40	0,69	
20:1n-9	1,33	1,49	0,94	0,96	1,43	1,17	0,86	1,08	1,08	0,36	<0,0001	0,50	0,21	0,27	0,09	0,0035	
18:3n-3	3,65	3,37	2,99	3,06	1,94	1,07	1,05	1,64	1,64	<0,0001	0,29	0,69	0,59	0,96	0,14	0,36	
20:2n-6	0,23	0,18	0,44	0,50	0,21	0,19	0,42	0,57	0,57	0,66	<0,0001	0,15	0,56	0,20	0,009	0,51	
20:3n-9	0,26	0,26	0,27	0,33	0,33	0,33	0,43	0,31	0,31	0,04	0,28	0,65	0,89	0,22	0,66	0,19	
22:0	0,14	0,16	0,09	0,12	0,17	0,13	0,08	0,08	0,08	0,57	0,005	0,97	0,66	0,27	0,47	0,66	
20:3n-6	0,35	0,32	0,48	0,53	0,41	0,36	0,59	0,53	0,53	0,24	0,0003	0,62	0,93	0,44	0,71	0,58	
22:1n-9	0,77	0,68	0,52	0,47	0,55	0,19	0,19	0,17	0,17	0,003	0,058	0,23	0,85	0,59	0,38	0,50	
20:4n-6	0,72	0,79	2,13	2,38	0,81	0,66	2,86	2,43	2,43	0,14	<0,0001	0,61	0,11	0,08	0,82	0,36	
20:5n-3	0,39	0,46	0,25	0,29	0,42	0,34	0,40	0,34	0,34	0,5	0,048	0,88	0,08	0,12	0,89	0,74	
22:4n-6	0,15	0,15	0,36	0,36	0,16	0,18	0,51	0,52	0,52	0,005	<0,0001	0,83	0,02	0,87	0,98	0,88	
22:5n-6	0,17	0,28	0,27	0,32	0,16	0,10	0,34	0,38	0,38	0,76	0,003	0,41	0,07	0,38	0,82	0,39	
22:5n-3	0,30	0,24	0,26	0,27	0,31	0,25	0,33	0,31	0,31	0,15	0,47	0,17	0,30	0,75	0,31	0,71	
22:6n-3	1,30	1,07	0,99	1,17	1,22	0,86	1,19	1,30	1,30	0,96	0,61	0,45	0,13	0,62	0,03	0,88	

DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif général de ce travail de thèse était d'étudier les conséquences fonctionnelles de la déficience en CBG, en particulier sur les réponses de stress. L'ensemble de ce travail a été conduit à l'aide de notre modèle original de souris knock-out total pour le gène *Cbg*. Ces souris *Cbg*^{+/-} et *Cbg*^{-/-} nous ont permis d'en apprendre plus sur le rôle et les fonctions de la CBG. Chaque chapitre ayant fait l'objet d'une discussion approfondie, nous nous focaliserons sur les apports qu'offrent notre étude et les perspectives de recherche qui en découlent.

Rôle majeur de la CBG dans la composition d'une réserve plasmatique de glucocorticoïdes

L'étude de ces souris déficientes en CBG a permis de confirmer que cette glycoprotéine synthétisée par le foie et libérée dans le plasma joue un rôle majeur dans la taille de la réserve plasmatique des glucocorticoïdes et de leur biodisponibilité. En effet, en condition de repos, nous avons observé que la réserve plasmatique de corticostérone totale est diminuée lorsque les niveaux de CBG plasmatique sont réduits de 50% (souris *Cbg*^{+/-}) et effondré en absence de CBG plasmatique (souris *Cbg*^{-/-}). Pourtant, nous avons observé que malgré cet effondrement de la réserve corticotrope, la concentration de la corticostérone libre plasmatique est inchangée le soir, en début de phase active. Cette observation est capitale dans la compréhension de la régulation corticotrope. En effet, selon la théorie de Mendel, seule la fraction libre de l'hormone est active (Mendel, 1989). Ainsi, malgré cette mesure de corticostérone totale effondrée, la déficience en CBG n'a aucun impact sur la régulation de l'axe corticotrope en situation pas ou peu stressante. En effet, cette déficience n'est pas létale, la fonction de reproduction ne semble pas être perturbée et nous n'avons jamais observé de perturbation comportementale dans des situations n'induisant pas ou peu de stress.

Cependant, nous avons observé, chez les mâles, que la concentration de corticostérone libre mesurée le matin est plus élevée chez les *Cbg*^{-/-} que chez les

animaux de type sauvage alors que le soir au pic circadien, nous venons de le mentionner, nous observons le profil inverse. La déficience en CBG conduit donc à un émoussement du cycle circadien. Chez l'Homme, un dérèglement du rythme circadien peut être associé à un mode de vie stressant comme chez les travailleurs de nuit et est observé par exemple dans le syndrome de fatigue chronique, ou encore dans les troubles du sommeil (Chung et al., 2011). L'incidence d'une augmentation de corticostérone en phase de repos (le matin) n'a pas été approfondie ici, mais il serait alors intéressant d'étudier quelle pourrait être l'implication de la CBG dans ces troubles associés au dérèglement du rythme circadien.

Il est important de prendre conscience de l'importance de la mesure de la forme libre des glucocorticoïdes chez l'animal, comme cela est déjà le cas chez l'Homme (Ho et al., 2006). Sans celle-ci nous aurions conclu, à tort, à une hypoactivité de l'axe en condition basale, alors que finalement son activité est « normale ». En effet, les mesures d'ACTH plasmatique, de l'expression des gènes des récepteurs MR et GR et également de la production de corticostérone n'ont montré aucun impact de la déficience en CBG. Si la réserve est effondrée, c'est en raison de la clairance de l'hormone qui est augmentée en absence de CBG, comme l'a montré Petersen et ses collaborateurs dans leur propre modèle de souris k.o. *Cbg* (Petersen et al., 2006).

Il est toutefois possible que des compensations développementales se soient produites masquant potentiellement des effets de la déficience en CBG induite par un k.o. total du gène. Aussi, nous pourrions croiser nos souris, qui ont l'avantage d'être floxées, avec une souris Cre de type Alb-Cre-ERTM (Metzger et al., 1995) qui permettrait alors l'expression conditionnelle du gène *Cbg* dans le tissu hépatique. En induisant la délétion du gène *Cbg* à différents stades du développement, ce modèle nous offrirait ainsi l'opportunité d'étudier le rôle physiologique de la CBG au cours de l'ontogénèse. Nous pourrions également étudier le rôle de la CBG dans la réactivité au stress de l'axe corticotrope au cours de la période périnatale, connue pour être critique dans le développement de vulnérabilité individuelle face au stress (Lupien et al., 2009; Claessens et al., 2011). Enfin, dans l'introduction, nous évoquons la possibilité d'une production extrahépatique de la CBG notamment dans le cerveau dont la présence a été détectée par immunohistochimie par quelques équipes (cf. introduction générale, III, A. 2)). La CBG ne passant pas la barrière

hématoencéphalique (Pardridge et al., 1986), la question se pose quant à son potentiel lieu de production dans le cerveau, et à sa fonction. En collaboration avec Elena Sivukhina et de G. Jirikowski (Jena, Allemagne), nous avons très récemment comparé par immunohistochimie la présence de CBG dans le cerveau des souris Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-}. La CBG a été détectée dans les neurones et les astrocytes de divers régions cérébrales des souris Cbg^{+/+}. De manière intéressante, celle-ci n'est pas retrouvée chez les souris Cbg^{-/-}. Ensuite, nous avons voulu savoir si cette protéine détectée dans le cerveau était bien la même que celle produite par le foie. Nous avons alors cloné l'ADNc de la *Cbg* à partir d'un broyat d'hypothalamus des souris Cbg^{+/+} et nous avons comparé sa séquence à celle provenant du foie et nous observons une parfaite homologie de séquence. L'expression du gène de la *Cbg* a également été mesurée par RT-qPCR dans divers régions cérébrales. Nous observons des différences d'expression entre les souris Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-}, cependant l'expression est très faible. Afin de pallier à ce problème nous avons récemment sacrifié des souris Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-} après un stress de contrainte ou après surrénalectomie dans le but d'augmenter l'expression endogène du gène. Enfin, nous avons également développé deux modèles de souris knock-out *Cbg* tissu spécifique, le premier est spécifique des neurones (souris k.o. Cbg^{CamKinase-Cre}) et ne présente pas de phénotype particulier dans le test de la nage forcée. Le deuxième modèle est spécifique des astrocytes et est inductible par le tamoxifène (souris k.o. Cbg^{GFAP-CreTM}). Celui-ci n'a pas encore fait l'objet d'une étude phénotypique.

Rôle majeur de la CBG dans la régulation fine de la réponses des glucocorticoïdes au stress

C'est en situation stressante justement, que notre modèle nous a permis d'en apprendre beaucoup plus sur le rôle de la CBG dans la régulation de la réactivité des glucocorticoïdes au stress. En effet, nous avons accumulé un ensemble de données robustes démontrant que la réponse comportementale des souris déficientes en CBG en situation stressante est altérée : immobilité augmentée dans le test de la nage forcée, évitement du choc électrique diminué dans le test de résignation apprise, pas de sensibilisation à la cocaïne, pas de perturbation de l'interaction sociale après une expérience de défaite sociale, insensibilité au stress chronique modéré et

imprévisible, ou encore pas d'altération de la mémoire de rappel après l'application d'un stress. Ces tâches comportementales ont toutes le point commun d'impliquer une élévation plasmatique des niveaux d'hormones glucocorticoïdes totales et surtout libres. Or, après un stress, nos souris déficientes en CBG présentent, certes, une élévation des concentrations de corticostérone libre mais celle-ci est altérée par rapport à celle mesurée chez les souris de type sauvage. De manière intéressante, nous retrouvons ce défaut d'élévation des niveaux de corticostérone libre après un stress dans un tissu cible des glucocorticoïdes : l'hippocampe. C'est justement cette hypo-réponse de corticostérone libre plasmatique que nous relierons à cette altération comportementale. L'infusion de corticostérone intrahippocampique chez ces souris *Cbg*^{-/-}, mimant ainsi l'élévation de corticostérone libre qui leur fait défaut après un stress, démontre bien notre hypothèse puisque nous restaurons un phénotype de sensibilité au stress. Il serait d'ailleurs fortement intéressant de réaliser des infusions de corticostérone mimant l'élévation de l'hormone après un stress en ICV (intra-cérébro-ventriculaire) et de tester nos animaux dans les différentes tâches comportementales utilisées dans cette étude. En effet, nous pensons que c'est précisément cette augmentation de l'hormone libre qui favorise l'évaluation cognitive de la situation stressante/menaçante par l'individu qui, associée à une réactivité émotionnelle, conduit à l'ajustement de la réponse comportementale (*fight or flight*) et permet ainsi à l'individu de lutter et de faire face à la situation. C'est ce que Lazarus qualifie de *coping* (Lazarus, 1993). Il serait également intéressant de rétablir les niveaux de CBG des souris *Cbg*^{-/-} par l'administration de CBG exogène dans la circulation. Or, actuellement nous n'avons pas synthétisé la protéine CBG principalement pour deux raisons : 1) la production à grande échelle de la CBG est trop coûteuse, 2) la CBG est une glycoprotéine composée de six sites de glycosylation important quant à la fonctionnalité de la celle-ci, or *in vitro* cette modification secondaire de la protéine n'est actuellement pas maîtrisée (Schiestl et al., 2011).

Nos résultats permettent ainsi de préciser le rôle que joue la CBG dans la réponse de stress. En effet, nous avons vu que l'absence de CBG ne perturbe pas ou peu l'activité basale de l'axe corticotrope. Par contre en situation stressante, le tonus de l'axe corticotrope est diminué, favorisant un défaut de la réponse des glucocorticoïdes libres qui atteignent les tissus cibles via leurs récepteurs MR et GR

afin d'initier la mise en place de la réponse adaptative au stress. Ceci démontre ainsi le rôle majeur que joue la CBG dans la régulation fine de la réactivité au stress des glucocorticoïdes. En effet, nous pourrions penser que l'absence de CBG conduit à une augmentation des concentrations de l'hormone libre et qu'au contraire l'augmentation des niveaux de CBG, en se liant à la corticostérone, diminue le niveau de l'hormone libre. Ceci est vrai en condition de stress aigu. Or, les liaisons que forment les glucocorticoïdes avec la CBG sont dynamiques et finalement nous observons que plus il y a de CBG, plus il y a une facilité d'échange entre la forme libre et liée de l'hormone. Il faut donc comprendre qu'en réponse au stress, il y a une augmentation de la production de glucocorticoïdes et grâce à leurs liaisons dynamiques qu'ils forment avec la CBG, ces hormones peuvent être maintenues dans le plasma. Ceci est crucial, car en l'absence de CBG la corticostérone (ou le cortisol) ne peut justement pas être maintenue dans le plasma et est alors éliminée dans les urines. Ainsi, en réponse au stress, la présence de la CBG permet d'augmenter la taille de la réserve plasmatique de corticostérone totale et libre.

Les travaux de (Qian et al., 2011) vont dans ce sens. En effet ils montrent chez le rat, que suite à un stress aigu, la CBG contenue dans le foie est rapidement libérée. Les auteurs suggèrent que ce phénomène permet dans un premier temps d'augmenter la réserve plasmatique de glucocorticoïdes puis dans un deuxième temps d'augmenter les niveaux de l'hormone libre. Enfin, cette augmentation des niveaux de corticostérone libre que permet la présence de CBG conduit à un rétrocontrôle de l'axe corticotrope important, du moins proportionnel à l'intensité de la réponse glucocorticoïde, permettant ainsi un retour rapide à une activité « normale » de l'axe. Pour des animaux déficients en CBG, le stress conduit à une augmentation de production de corticostérone, qui parce qu'elle ne peut pas être maintenue dans le plasma est éliminée dans les urines. Ainsi le niveau de glucocorticoïde est moindre et par conséquent le rétrocontrôle est moins efficace. Cependant cela ne se traduit pas par une surproduction de corticostérone visible, celle-ci étant éliminée au fur et à mesure qu'elle est libérée dans le plasma. La **figure 22** illustre l'activité basale et la réactivité au stress de l'axe corticotrope des souris Cbg^{+/+} et Cbg^{-/-}.

La CBG joue donc un rôle crucial dans l'équilibre entre la production, le maintien dans le plasma et l'élimination des hormones glucocorticoïdes permettant de réguler finement la quantité de glucocorticoïdes libres et ainsi la réponse adaptative au stress.

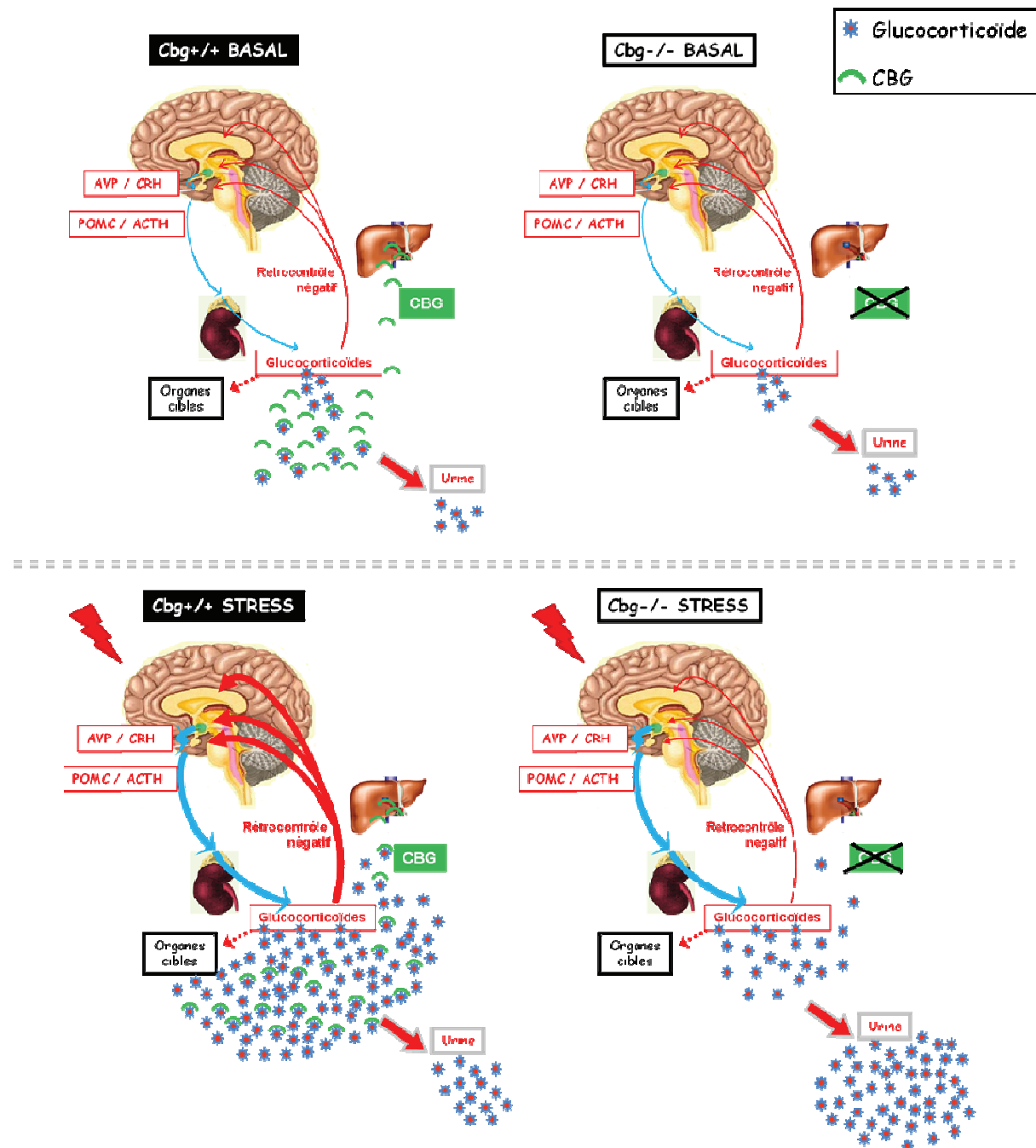


Figure 22. Activité basale et après stress de l'axe corticotrope des souris *Cbg*^{+/+} et *Cbg*^{-/-}.

De plus, l'étude des femelles renforce notre idée que la variation des niveaux plasmatiques de CBG impacte directement sur la réserve plasmatique de corticostérone et en conséquence sur la quantité de corticostérone libre qui atteindra ses cibles. En effet, nous avons observé qu'une trop forte concentration de CBG (positivement régulée par les niveaux d'œstrogènes), favorise une hyper-réponse corticotrope. A l'inverse, une concentration insuffisante de CBG favorise une hypo-réponse corticotrope. De manière intéressante, ces deux versants de dérégulation de la réponse corticotrope au stress ont une seule et même conséquence directe sur la réponse comportementale : une mauvaise réponse adaptative à ce type de stress. Afin de renforcer cette idée, il serait d'ailleurs intéressant de construire un modèle de souris surexprimant la CBG afin d'étudier sa réactivité comportementale et corticotrope en situation stressante.

Une libération intense et/ou chronique de glucocorticoïdes libres peut être neurotoxique pour l'organisme (cf. Introduction I. C. 3)) (Goosens and Sapolsky, 2007). En effet, il a été observé qu'une élévation chronique des niveaux des glucocorticoïdes peut induire, au niveau central, des modifications structurales et morphologiques et impacter sur la neurogénèse. Par exemple, il a été observé une atrophie des épines dendritiques des neurones hippocampiques ou du cortex préfrontal, réversible avec l'arrêt du stress ou au contraire à une hypertrophie dendritique des neurones amygdaliens, plus problématique car ces modifications sont persistantes après l'arrêt du stress (Arnsten, 2009; Roozendaal et al., 2009a). Ces modifications conduisent alors à de nombreuses altérations cognitives et émotionnelles (altérations de l'attention, de la mémoire, augmentation de la peur conditionnée, ou de l'agressivité) (Galea et al., 1997; McEwen, 2000; Sousa et al., 2008). Or, nous avons observé que nos souris k.o. *Cbg* sont insensibles à l'effet du stress chronique. D'ailleurs notre protocole de stress chronique modéré et imprévisible associé à un régime enrichi en gras, conduisant à une activation chronique de l'axe corticotrope, a mis en évidence une surprenante « amélioration » du comportement d'immobilité dans le test de la nage forcée. Ces résultats suggèrent ainsi que l'hypocorticostéronémie de nos souris favoriserait une diminution des effets neurotoxiques d'une libération chronique de glucocorticoïdes. Il serait ainsi intéressant d'observer la morphologie des neurones hippocampiques, du le cortex préfrontal et de l'amygdale après un protocole de stress chronique.

La souris *Cbg*^{-/-} : un modèle original d'hypocortisolisme qui offre des perspectives intéressantes

Le dérèglement de la réponse corticotrope dans le sens d'une **hyperréactivité** et ses conséquences physiopathologiques sont très largement décrits dans la littérature. À l'inverse, très peu d'études font état de l'**hyporéactivité** de l'axe corticotrope. Notre modèle k.o. *Cbg* est d'ailleurs l'un des rares modèles animaux d'hypo-réactivité glucocorticoïdes au stress. Il existe toutefois un autre modèle intéressant illustrant cette balance hyper- hyporéactivité corticotrope au stress : les souris HR (forte réactivité corticotrope au stress) et LR (faible réactivité corticotrope au stress) issues d'une sélection génétique et développées par le groupe de Chadi Touma, en Allemagne (cf. introduction générale I. D) (Touma et al., 2008; Touma et al., 2009; Heinzmann et al., 2010). Nous avons d'ailleurs fait une collaboration avec ce groupe. En effet, nous avons proposé à Chadi Touma d'étudier la CBG dans ses lignées afin d'évaluer la possible implication du gène *Cbg* dans la sélection des traits d'hyper et d'hyporéactivité corticotrope au stress. Des souris HR, IR (réactivité corticotrope au stress intermédiaire) et LR ont été sacrifiées en condition basale le matin et après 20 minutes de stress de contrainte. Nous avons alors mesuré dans le foie par RT-qPCR l'expression de l'ARN de la *Cbg*. De plus, nous avons mesuré sur les échantillons de plasma la capacité de liaison de la CBG (B_{max}) et les concentrations de corticostérone totale et libre. De plus, nous avons quantifié la CBG par western blot. Les résultats, présentés **Figure 23**, indiquent qu'en effet en condition de stress, les niveaux de CBG sont plus élevés chez les souris HR que LR, les souris IR ayant des taux intermédiaires. Actuellement, nous recherchons un polymorphisme dans le gène de la *Cbg* expliquant en partie la différence entre ces trois lignées de souris. Ces résultats très encourageants renforcent le rôle crucial de la CBG dans la régulation de la réponse corticotrope de stress. En effet, non seulement les études génétiques de recherche de QTL menées sans hypothèse de départ ont placé le gène de la *Cbg* comme le facteur génétique le plus important influençant les réponses corticotrope au stress dans des modèles porcs et rats, mais également dans une étude issue d'une sélection génétique de réactivité corticotrope au stress chez la souris.

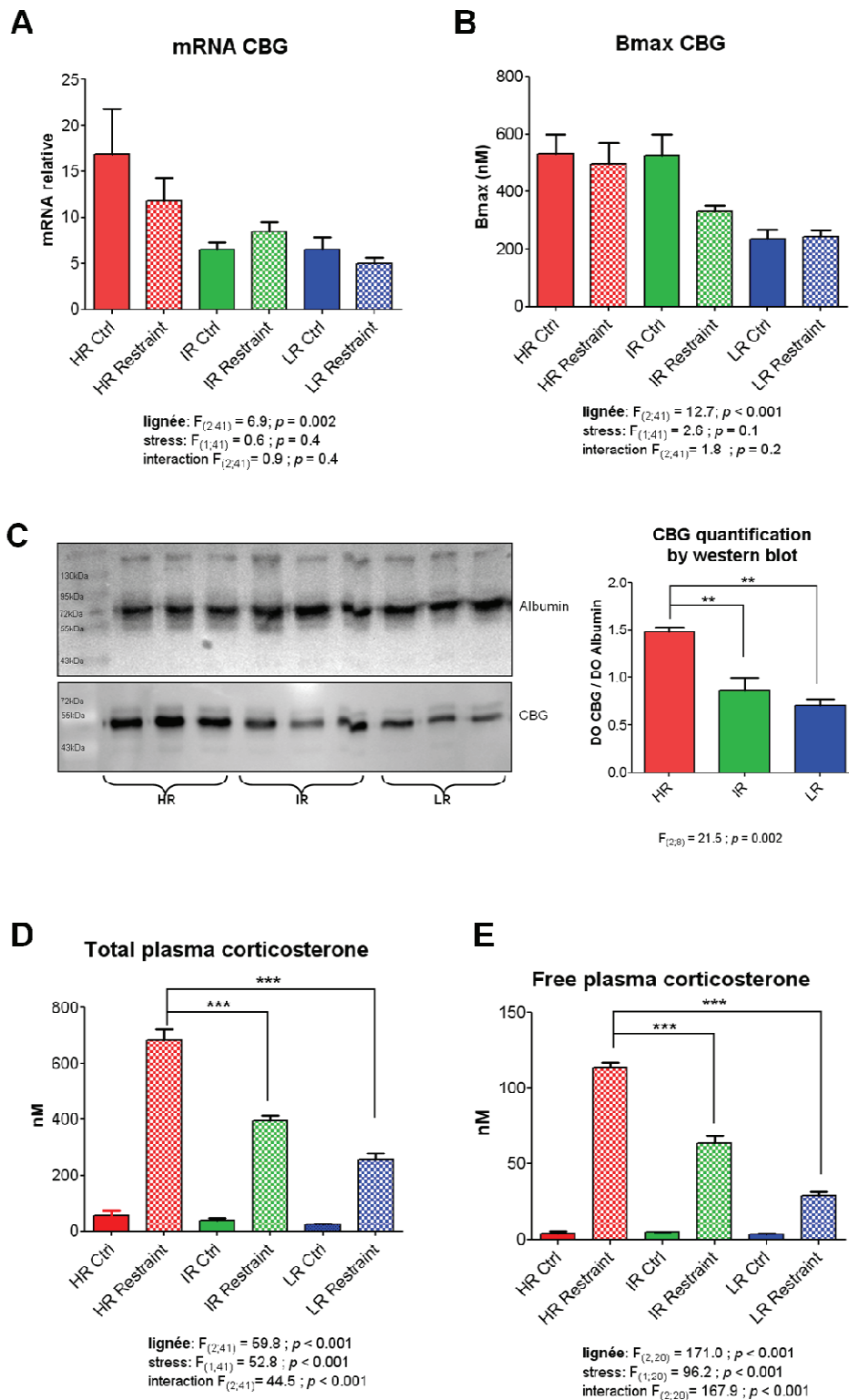


Figure 23 : Etude de la variation de CBG chez les lignées HR, IR et LR de Chadi Touma en situation contrôlée (Ctrl) et après 20 minutes de stress de contrainte (Restraint).

A : Mesure de l'expression de l'ARN *Cbg* par RTqPCR dans le foie, B : mesure de la capacité de liaison (Bmax) de la CBG par courbe de saturation, C : western blot réalisé sur les protéines plasmatiques avec un anticorps anti-CBG, et mesure de la concentration de la corticostérone plasmatique totale (D) et libre (E).

Les analyses statistiques sont des 2-way ANOVA suivies du post-hoc de Bonferroni ou du 1-way ANOVA suivi du post-hoc de Tukey.

Il est classiquement décrit que des personnes hypocortisolémiques sont vulnérables et peuvent souffrir de divers troubles comme des troubles dépressifs de type atypique, de douleur chronique, ou encore de fatigue chronique (Heim et al., 2000; Raison and Miller, 2003). Aux vues des résultats de mes travaux de thèse, il serait ainsi intéressant de cibler la CBG dans ces pathologies et d'observer si elle est modifiée (au niveau du gène et de la protéine), ce qui n'a pas réellement été réalisé à ce jour. Ceci apporterait des informations supplémentaires à celles apportées par les mesures de cortisol généralement réalisées chez ces patients. Ces indications offriraient ainsi de nouvelles pistes quant au développement de traitements pharmacologiques. En effet le principal traitement utilisé dans le cadre général d'une hypocortisolémie est la corticothérapie, notamment à l'hydrocortisone comme dans le cas par exemple de la maladie d'Addison (Lovas and Husebye, 2007, 2008). Or ces corticothérapies sont contraignantes et entraînent dans le cas d'une corticothérapie chronique l'apparition de nombreux effets secondaires comme une prise de poids voire le développement d'une obésité, des troubles psychiques avec l'apparition d'épisodes dépressifs, des fuites de mémoire, ou encore une plus grande fragilité face aux infections.

Conclusion

Une très grande diversité dans la réponse adaptative au stress est observée entre les individus favorisant une sensibilité variable face aux stressseurs et pouvant conduire à une vulnérabilité à développer divers troubles et pathologies. Cette diversité est sous tendue par les caractéristiques propres de chaque individu, déterminées par le patrimoine génétique en interaction avec l'histoire personnelle. Dans l'introduction générale, nous présentions une courbe dose réponse des effets du stress sur la réponse homéostatique (notamment corticotrope) conduisant à la mise en place de la réponse adaptative (cf. **Figure 4** extraite de la revue (Chrousos, 2009). Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que le gène de la *Cbg* et la concentration en CBG dans le plasma, pouvant être modulés par divers facteurs (sexe, développement, stress, œstrogène, hormones thyroïdiennes, cytokines etc., cf. Introduction III. B) jouent un rôle critique dans l'établissement de la réponse adaptative au stress ou au contraire dans la vulnérabilité à développer des troubles

associés à un dérèglement de la réponse des systèmes de stress et notamment corticotrope. Nous avons ainsi précisé cette figure en ajoutant cet acteur biologique important qu'est la CBG dans la réponse au stress, puisque ces variations conditionnent les niveaux des glucocorticoïdes libres qui en conséquence permettent la mise en place de la réponse adaptative (**Figure 24**).

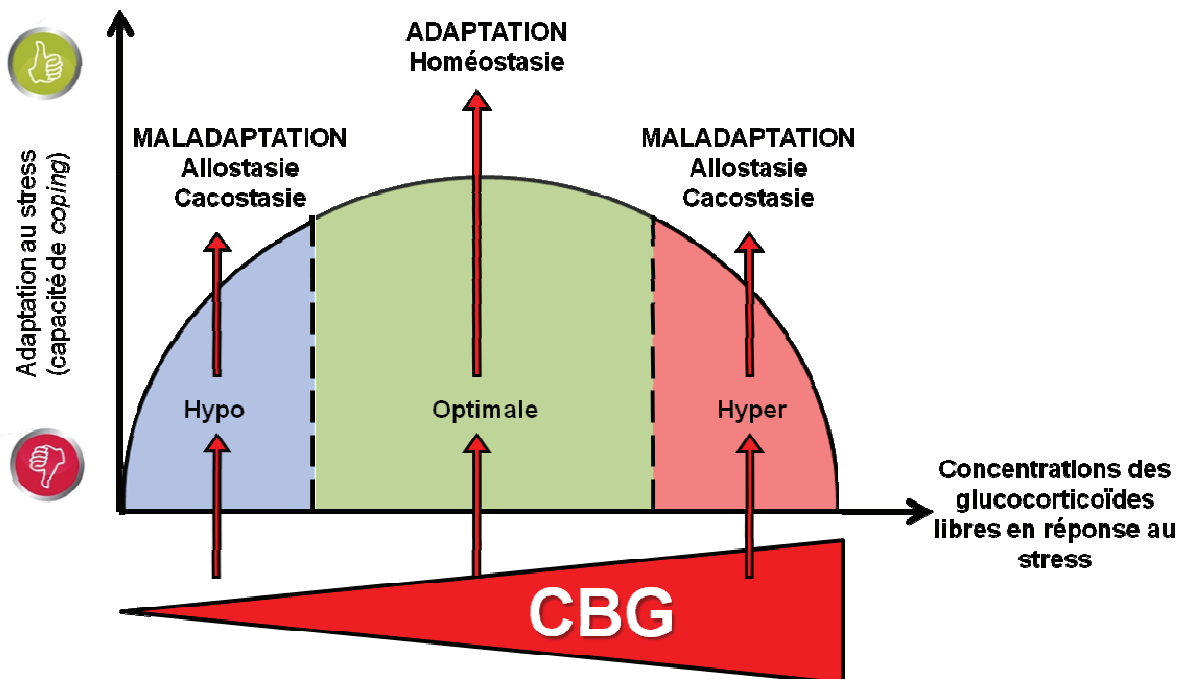


Figure 24 : La réponse adaptative au stress est dépendante de la réponse des glucocorticoïdes libres dont les concentrations plasmatiques sont intimement liées à la concentration de CBG ou à sa capacité de liaison.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou-Samra AB, Pugeat M, Dechaud H, Nachury L, Bouchareb B, Fevre-Montange M, Tourniaire J (1984) Increased plasma concentration of N-terminal beta-lipotrophin and unbound cortisol during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 20:221-228.
- Ackman RG (1981) Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. *Methods Enzymol* 72:205-252.
- Adam TC, Epel ES (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 91:449-458.
- Adcock RJ, Kattesh HG, Roberts MP, Carroll JA, Saxton AM, Kojima CJ (2007) Temporal relationships between plasma cortisol, corticosteroid-binding globulin (CBG), and the free cortisol index (FCI) in pigs in response to adrenal stimulation or suppression. *Stress* 10:305-310.
- Aguilera G (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15:321-350.
- Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Strack AM, Walker CD, Dallman MF (1992) Feedback sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis and its capacity to adjust to exogenous corticosterone. *Endocrinology* 131:585-594.
- Ali S, Bassett JR (1995) Studies on the role of glycosylation in the origin of the electrophoretic variants for rat corticosteroid-binding globulin. *Steroids* 60:743-752.
- Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM (2011) The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology* 36:415-425.
- Angeli A, Frajria R, Dogliotti L, Crosazzo C, Rigoli F, Ceresa F (1978) Differences between temporal patterns of plasma cortisol and corticosteroid-binding globulin binding capacity throughout the twenty-four hour day and the menstrual cycle. *J Endocrinol Invest* 1:31-38.
- Anisman H, Merali Z, Hayley S (2008) Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 85:1-74.
- Armony JL, LeDoux JE (1997) How the brain processes emotional information. *Ann N Y Acad Sci* 821:259-270.

- Arnsten AF (2009) Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *NatRevNeurosci* 10:410-422.
- Avvakumov GV (1995) Structure and function of corticosteroid-binding globulin: role of carbohydrates. *JSteroid BiochemMolBiol* 53:515-522.
- Avvakumov GV, Warmels-Rodenhiser S, Hammond GL (1993) Glycosylation of human corticosteroid-binding globulin at asparagine 238 is necessary for steroid binding. *J Biol Chem* 268:862-866.
- Bale TL, Vale WW (2003) Increased depression-like behaviors in corticotropin-releasing factor receptor-2-deficient mice: sexually dichotomous responses. *JNeurosci* 23:5295-5301.
- Bale TL, Baram TZ, Brown AS, Goldstein JM, Insel TR, McCarthy MM, Nemeroff CB, Reyes TM, Simerly RB, Susser ES, Nestler EJ (2010) Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry* 68:314-319.
- Ballard PL (1979) Delivery and transport of glucocorticoids to target cells. *Monogr Endocrinol* 12:25-48.
- Barat P, Duclos M, Gatta B, Roger P, Mormede P, Moisan MP (2005) Corticosteroid binding globulin gene polymorphism influences cortisol driven fat distribution in obese women. *ObesRes* 13:1485-1490.
- Bartalena L, Hammond GL, Farsetti A, Flink IL, Robbins J (1993) Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding globulin synthesis by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *Endocrinology* 133:291-296.
- Bartolomucci A, Pederzani T, Sacerdote P, Panerai AE, Parmigiani S, Palanza P (2004) Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 29:899-910.
- Bartolomucci A, Cabassi A, Govoni P, Ceresini G, Cero C, Berra D, Dadomo H, Franceschini P, Dell'Omo G, Parmigiani S, Palanza P (2009) Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *PLoSOne* 4:e4331.
- Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6:225-236.
- Beauchamp NJ, Pike RN, Daly M, Butler L, Makris M, Dafforn TR, Zhou A, Fitton HL, Preston FE, Peake IR, Carrell RW (1998) Antithrombins Wibble and Wobble (T85M/K): archetypal conformational diseases with in vivo latent-transition, thrombosis, and heparin activation. *Blood* 92:2696-2706.

- Becker JB, Monteggia LM, Perrot-Sinal TS, Romeo RD, Taylor JR, Yehuda R, Bale TL (2007) Stress and disease: is being female a predisposing factor? *J Neurosci* 27:11851-11855.
- Beracochea D, Jaffard R (1985) Memory deficits subsequent to chronic consumption of alcohol in mice: an analysis based on spontaneous alternation behavior. *Behav Brain Res* 15:15-25.
- Beracochea DJ, Jaffard R (1987) Impairment of spontaneous alternation behavior in sequential test procedures following mammillary body lesions in mice: evidence for time-dependent interference-related memory deficits. *Behav Neurosci* 101:187-197.
- Berdusco ET, Yang K, Hammond GL, Challis JR (1995) Corticosteroid-binding globulin (CBG) production by hepatic and extra-hepatic sites in the ovine fetus; effects of CBG on glucocorticoid negative feedback on pituitary cells in vitro. *JEndocrinol* 146:121-130.
- Berdusco ET, Hammond GL, Jacobs RA, Grolla A, Akagi K, Langlois D, Challis JR (1993) Glucocorticoid-induced increase in plasma corticosteroid-binding globulin levels in fetal sheep is associated with increased biosynthesis and alterations in glycosylation. *Endocrinology* 132:2001-2008.
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, Schutz G (1998) Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9424-9429.
- Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM, Garrel DR (1998) Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Crit Care Med* 26:452-460.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311:864-868.
- Bolanos CA, Willey MD, Maffeo ML, Powers KD, Kinka DW, Grausam KB, Henderson RP (2008) Antidepressant treatment can normalize adult behavioral deficits induced by early-life exposure to methylphenidate. *Biol Psychiatry* 63:309-316.
- Born J, Spath-Schwalbe E, Schwachenhofer H, Kern W, Fehm HL (1989) Influences of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin, and cortisol on sleep in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 68:904-911.

- Bornstein SR, Schuppenies A, Wong ML, Licinio J (2006) Approaching the shared biology of obesity and depression: the stress axis as the locus of gene-environment interactions. *Mol Psychiatry* 11:892-902.
- Boyle MP, Brewer JA, Funatsu M, Wozniak DF, Tsien JZ, Izumi Y, Muglia LJ (2005) Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:473-478.
- Bremmer MA, Deeg DJ, Beekman AT, Penninx BW, Lips P, Hoogendijk WJ (2007) Major depression in late life is associated with both hypo- and hypercortisolemia. *Biol Psychiatry* 62:479-486.
- Breuner CW, Orchinik M (2002) Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175:99-112.
- Breuner CW, Hahn TP (2003) Integrating stress physiology, environmental change, and behavior in free-living sparrows. *Horm Behav* 43:115-123.
- Brien TG (1981) Human corticosteroid binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 14:193-212.
- Bright GM (1995) Corticosteroid-binding globulin influences kinetic parameters of plasma cortisol transport and clearance. *J Clin Endocrinol Metab* 80:770-775.
- Brunner E (1997) Stress and the biology of inequality. *BMJ* 314:1472-1476.
- Brunner E, Baima J, Vieira TC, Vieira JG, Abucham J (2003) Hereditary corticosteroid-binding globulin deficiency due to a missense mutation (Asp367Asn, CBG Lyon) in a Brazilian kindred. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58:756-762.
- Buckley TM, Schatzberg AF (2005) On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3106-3114.
- Burton RM, Westphal U (1972) Steroid hormone-binding proteins in blood plasma. *Metabolism* 21:253-276.
- Buss C, Schuelter U, Hesse J, Moser D, Phillips DI, Hellhammer D, Meyer J (2007) Haploinsufficiency of the SERPINA6 gene is associated with severe muscle fatigue: A de novo mutation in corticosteroid-binding globulin deficiency. *J Neural Transm* 114:563-569.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The

MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *ClinChem* 55:611-622.

Cahill L, Haier RJ, White NS, Fallon J, Kilpatrick L, Lawrence C, Potkin SG, Alkire MT (2001) Sex-related difference in amygdala activity during emotionally influenced memory storage. *NeurobiolLearnMem* 75:1-9.

Cameron A, Henley D, Carrell R, Zhou A, Clarke A, Lightman S (2010) Temperature-responsive release of cortisol from its binding globulin: a protein thermocouple. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4689-4695.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549.

Cancello R, Clement K (2006) Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 113:1141-1147.

Cannon W (1935) Stresses and strains of homeostasis *Amer J Med Sci* 189:1-14.

Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PM (1995) Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 37:496-503; discussion 503-494.

Carroll TB, Findling JW (2010) The diagnosis of Cushing's syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 11:147-153.

Castonguay TW, Dallman MF, Stern JS (1986) Some metabolic and behavioral effects of adrenalectomy on obese Zucker rats. *Am J Physiol* 251:R923-933.

Chader GJ, Meltzer R, Silver J (1972) A soluble receptor for corticoids in the neural retina of the chick embryo. *Biochem Biophys Res Commun* 46:2026-2033.

Chaouloff F, Groc L (2010) Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress. *Front Neuroendocrinol*.

Chaouloff F, Groc L (2011) Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress. *Front Neuroendocrinol* 32:25-42.

Charmandari E, Pincus SM, Matthews DR, Dennison E, Fall CH, Hindmarsh PC (2001) Joint growth hormone and cortisol spontaneous secretion is more asynchronous in older females than in their male counterparts. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3393-3399.

Chauveau F, Pierard C, Tronche C, Coutan M, Drouet I, Liscia P, Beracochea D (2009) The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in

- serial memory retrieval in non-stress and stress conditions. *Neurobiol Learn Mem* 91:447-455.
- Chauveau F, Tronche C, Pierard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M, Beracochea D (2010) Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* 20:196-207.
- Chopra KK, Ravindran A, Kennedy SH, Mackenzie B, Matthews S, Anisman H, Bagby RM, Farvolden P, Levitan RD (2009) Sex differences in hormonal responses to a social stressor in chronic major depression. *Psychoneuroendocrinology*.
- Chrousos GP (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5:374-381.
- Chrousos GP, Kino T (2009) Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Ann NY Acad Sci* 1179:153-166.
- Chung S, Son GH, Kim K (2011) Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 1812:581-591.
- Claessens SE, Daskalakis NP, van der Veen R, Oitzl MS, de Kloet ER, Champagne DL (2011) Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences. *Psychopharmacology (Berl)* 214:141-154.
- Cohen PE, Milligan SR (1993) Silastic implants for delivery of oestradiol to mice. *J Reprod Fertil* 99:219-223.
- Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Schmid W, Aguzzi A, Schutz G (1995) Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids* 60:93-96.
- Conrad CD, Lupien SJ, McEwen BS (1999) Support for a bimodal role for type II adrenal steroid receptors in spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 72:39-46.
- Covar RA, Leung DY, McCormick D, Steelman J, Zeitler P, Spahn JD (2000) Risk factors associated with glucocorticoid-induced adverse effects in children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 106:651-659.
- Crave JC, LeJeune H, Brebant C, Baret C, Pugeat M (1995) Differential effects of insulin and insulin-like growth factor I on the production of plasma steroid-binding globulins by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1283-1289.

- Cullinan WE, Ziegler DR, Herman JP (2008) Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct Funct* 213:63-72.
- D'Agostino J, Vaeth GF, Henning SJ (1982) Diurnal rhythm of total and free concentrations of serum corticosterone in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 100:85-90.
- Dalla C, Whetstone AS, Hodes GE, Shors TJ (2009) Stressful experience has opposite effects on dendritic spines in the hippocampus of cycling versus masculinized females. *NeurosciLett* 449:52-56.
- Dalla C, Pitychoutis PM, Kokras N, Papadopoulou-Daifoti Z (2010) Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic ClinPharmacolToxicol* 106:226-233.
- Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE (2005) Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun* 19:275-280.
- Dallman MF, Darlington DN, Suemaru S, Cascio CS, Levin N (1989) Corticosteroids in homeostasis. *Acta Physiol Scand Suppl* 583:27-34.
- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Sebastian RJ (1995) The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. *Ann N Y Acad Sci* 771:730-742.
- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Scribner KS, Pecoraro N, la Fleur SE, Houshyar H, Gomez F (2004) Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *AnnNYAcadSci* 1018:141-150.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, la Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S (2003) Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *ProcNatlAcadSciUSA* 100:11696-11701.
- Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE, Warne JP, Ginsberg AB, Akana SF, Laugero KC, Houshyar H, Strack AM, Bhatnagar S, Bell ME (2006) Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. *ProgBrain Res* 153:75-105.
- Dantzer R (2002) Is it important to know about emotions in order to study emotions? *Behav Processes* 60:V-VII.
- Dantzer R (2010) Psychoneuroendocrinology of Stress. In: *Encyclopedia of Behavioral Neurosciences* (ed. E, ed). Oxford: Koob, G.F., Le Moal, M, Thompson, R.F. .

- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *NatRevNeurosci* 9:46-56.
- Datson NA, Morsink MC, Meijer OC, de Kloet ER (2008) Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *EurJPharmacol* 583:272-289.
- Davis M, Whalen PJ (2001) The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 6:13-34.
- de Kloet ER, Sarabdjitsingh RA (2008) Everything has rhythm: focus on glucocorticoid pulsatility. *Endocrinology* 149:3241-3243.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M (1999) Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22:422-426.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.
- de Kloet ER, Karst H, Joels M (2008) Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol* 29:268-272.
- de Kloet ER, Voorhuis TA, Leunissen JL, Koch B (1984) Intracellular CBG-like molecules in the rat pituitary. *J Steroid Biochem* 20:367-371.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *EndocrRev* 19:269-301.
- De Moor P, Heirwegh K, Heremans JF, Declerck-Raskin M (1962) Protein binding of corticoids studied by gel filtration. *J Clin Invest* 41:816-827.
- De Moor P, Steeno O, Brosens I, Hendrikx A (1966) Data on transcortin activity in human plasma as studied by gel filtration. *J Clin Endocrinol Metab* 26:71-78.
- de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL (1998) Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394:787-790.
- de Quervain DJ, Roozendaal B, Nitsch RM, McGaugh JL, Hock C (2000) Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *NatNeurosci* 3:313-314.
- de Weerth C, Buitelaar JK (2005) Physiological stress reactivity in human pregnancy - a review. *Neurosci Biobehav Rev* 29:295-312.

- Desautes C, Sarrieau A, Caritez JC, Mormede P (1999) Behavior and pituitary-adrenal function in large white and Meishan pigs. *Domest Anim Endocrinol* 16:193-205.
- Desautes C, Bidanel JP, Milant D, Iannuccelli N, Amigues Y, Bourgeois F, Caritez JC, Renard C, Chevalet C, Mormede P (2002) Genetic linkage mapping of quantitative trait loci for behavioral and neuroendocrine stress response traits in pigs. *J Anim Sci* 80:2276-2285.
- Deuschle M, Schweiger U, Standhardt H, Weber B, Heuser I (1996) Corticosteroid-binding globulin is not decreased in depressed patients. *Psychoneuroendocrinology* 21:645-649.
- Diamond DM, Fleshner M, Ingersoll N, Rose GM (1996) Psychological stress impairs spatial working memory: relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. *Behav Neurosci* 110:661-672.
- Dinneen S, Alzaid A, Miles J, Rizza R (1995) Effects of the normal nocturnal rise in cortisol on carbohydrate and fat metabolism in IDDM. *Am J Physiol* 268:E595-603.
- Doe RP, Fernandez R, Seal US (1964) Measurement of Corticosteroid-Binding Globulin in Man. *J Clin Endocrinol Metab* 24:1029-1039.
- Doe RP, Lohrenz FN, Seal US (1965) Familial Decrease in Corticosteroid-Binding Globulin. *Metabolism* 14:940-943.
- Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA, Okret S (1988) Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol Endocrinol* 2:1256-1264.
- Donn RP, Farhan A, Stevans A, Ramanan A, Ollier WE, Thomson W (2002) Neuroendocrine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 41:930-936.
- Dorey R, Pierard C, Shinkaruk S, Tronche C, Chauveau F, Baudonnat M, Beracochea D (2011) Membrane Mineralocorticoid but not Glucocorticoid Receptors of the Dorsal Hippocampus Mediate the Rapid Effects of Corticosterone on Memory Retrieval. *Neuropsychopharmacology*.
- Droste SK, de Groote L, Atkinson HC, Lightman SL, Reul JM, Linthorst AC (2008) Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. *Endocrinology* 149:3244-3253.
- Dryden S, Pickavance L, Frankish HM, Williams G (1995) Increased neuropeptide Y secretion in the hypothalamic paraventricular nucleus of obese (fa/fa) Zucker rats. *Brain Res* 690:185-188.

- Duclos M, Corcuff JB, Etcheverry N, Rashedi M, Tabarin A, Roger P (1999) Abdominal obesity increases overnight cortisol excretion. *J Endocrinol Invest* 22:465-471.
- Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D (1981) Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 53:58-68.
- Emptoz-Bonneton A, Crave JC, LeJeune H, Brebant C, Pugeat M (1997) Corticosteroid-binding globulin synthesis regulation by cytokines and glucocorticoids in human hepatoblastoma-derived (HepG2) cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3758-3762.
- Emptoz-Bonneton A, Cousin P, Seguchi K, Avvakumov GV, Bully C, Hammond GL, Pugeat M (2000) Novel human corticosteroid-binding globulin variant with low cortisol-binding affinity. *J Clin Endocrinol Metab* 85:361-367.
- Engeland WC, Arnhold MM (2005) Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* 28:325-332.
- Engler D, Pham T, Fullerton MJ, Clarke IJ, Funder JW (1989) Evidence for an ultradian secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin and alpha-melanocyte-stimulating hormone by the ovine anterior and intermediate pituitary. *Neuroendocrinology* 49:349-360.
- Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K (2001) Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26:37-49.
- Erdmann G, Berger S, Schutz G (2008) Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in the mouse brain. *J Neuroendocrinol* 20:655-659.
- Expertise (2011) *Stress au travail et Santé - Situation chez les indépendants*, Les éditions INSERM Edition.
- Faict D, De Moor P, Bouillon R, Heyns W, Heiniger HJ, Corrow D, Lesaffre E (1986) Transcortin and vitamin D-binding protein levels in mouse serum. *J Endocrinol* 109:141-147.
- Feder A, Nestler EJ, Charney DS (2009) Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci* 10:446-457.
- Fernandez-Real JM, Grasa M, Casamitjana R, Ricart W (2000) The insulin resistance syndrome and the binding capacity of cortisol binding globulin (CBG) in men and women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52:93-99.

- Fernandez-Real JM, Pugeat M, Emptoz-Bonneton A, Ricart W (2001) Study of the effect of changing glucose, insulin, and insulin-like growth factor-I levels on serum corticosteroid binding globulin in lean, obese, and obese subjects with glucose intolerance. *Metabolism* 50:1248-1252.
- Fernandez-Real JM, Pugeat M, Lopez-Bermejo A, Bornet H, Ricart W (2005) Corticosteroid-binding globulin affects the relationship between circulating adiponectin and cortisol in men and women. *Metabolism* 54:584-589.
- Fernandez-Real JM, Grasa M, Casamitjana R, Pugeat M, Barret C, Ricart W (1999) Plasma total and glycosylated corticosteroid-binding globulin levels are associated with insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3192-3196.
- Fernandez-Real JM, Pugeat M, Grasa M, Broch M, Vendrell J, Brun J, Ricart W (2002) Serum corticosteroid-binding globulin concentration and insulin resistance syndrome: a population study. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4686-4690.
- Finger BC, Dinan TG, Cryan JF (2011) High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. *Neuroscience* 192:351-360.
- Follenius M, Brandenberger G, Hietter B (1982) Diurnal cortisol peaks and their relationships to meals. *J Clin Endocrinol Metab* 55:757-761.
- Frairia R, Agrimonti F, Fortunati N, Fazzari A, Gennari P, Berta L (1988) Influence of naturally occurring and synthetic glucocorticoids on corticosteroid-binding globulin-steroid interaction in human peripheral plasma. *Ann N Y Acad Sci* 538:287-303.
- Frye CA (2011) Progesterone reduces depressive behavior of young ovariectomized, aged progestin receptor knockout, and aged wild type mice in the tail suspension test. *J Psychopharmacol* 25:421-428.
- Furay AR, Bruestle AE, Herman JP (2008) The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress. *Endocrinology* 149:5482-5490.
- Gagliardi L, Ho JT, Torpy DJ (2010) Corticosteroid-binding globulin: the clinical significance of altered levels and heritable mutations. *Mol Cell Endocrinol* 316:24-34.
- Galea LA, McEwen BS, Tanapat P, Deak T, Spencer RL, Dhabhar FS (1997) Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience* 81:689-697.
- Gayrard V, Alvinerie M, Toutain PL (1996) Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domest Anim Endocrinol* 13:35-45.

- Ghose-Dastidar J, Ross JB, Green R (1991) Expression of biologically active human corticosteroid binding globulin by insect cells: acquisition of function requires glycosylation and transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6408-6412.
- Gold PW, Chrousos GP (2002) Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry* 7:254-275.
- Goosens KA, Sapolsky RM (2007) Stress and Glucocorticoid Contributions to Normal and Pathological Aging.
- Gray TS, Carney ME, Magnuson DJ (1989) Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. *Neuroendocrinology* 50:433-446.
- Groc L, Chaouloff F (2008) [New insights in stress-induced synaptic adaptations]. *Med Sci (Paris)* 24:776-778.
- Groc L, Choquet D, Chaouloff F (2008) The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 11:868-870.
- Guyonnet-Duperat V, Geverink N, Plastow GS, Evans G, Ousova O, Croisetiere C, Foury A, Richard E, Mormede P, Moisan MP (2006) Functional implication of an Arg307Gly substitution in corticosteroid-binding globulin, a candidate gene for a quantitative trait locus associated with cortisol variability and obesity in pig. *Genetics* 173:2143-2149.
- Hammond GL (1990) Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *EndocrRev* 11:65-79.
- Hammond GL (1995) Potential functions of plasma steroid-binding proteins. *Trends Endocrinol Metab* 6:298-304.
- Hammond GL, Smith CL, Underhill DA (1991) Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:755-762.
- Hammond GL, Nisker JA, Jones LA, Siiteri PK (1980) Estimation of the percentage of free steroid in undiluted serum by centrifugal ultrafiltration-dialysis. *JBiolChem* 255:5023-5026.
- Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ (1990) A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *JClinEndocrinolMetab* 71:34-39.

- Hammond GL, Smith CL, Lahteenmaki P, Grolla A, Warmels-Rodenhiser S, Hodgert H, Murai JT, Siiteri PK (1994) Squirrel monkey corticosteroid-binding globulin: primary structure and comparison with the human protein. *Endocrinology* 134:891-898.
- Hammond GL, Smith CL, Goping IS, Underhill DA, Harley MJ, Reventos J, Musto NA, Gunsalus GL, Bardin CW (1987) Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *ProcNatlAcadSciUSA* 84:5153-5157.
- Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA (1994) Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *HormBehav* 28:464-476.
- Heim C, Ehler U, Hellhammer DH (2000) The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* 25:1-35.
- Heinzmann JM, Thoeringer CK, Knapman A, Palme R, Holsboer F, Uhr M, Landgraf R, Touma C (2010) Intrahippocampal corticosterone response in mice selectively bred for extremes in stress reactivity: a microdialysis study. *JNeuroendocrinol* 22:1187-1197.
- Henley DE, Lightman SL (2011) New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery. *Neuroscience* 180:1-8.
- Henley DE, Leendertz JA, Russell GM, Wood SA, Taheri S, Woltersdorf WW, Lightman SL (2009) Development of an automated blood sampling system for use in humans. *J Med Eng Technol* 33:199-208.
- Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, De Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR (2006a) Do corticosteroids damage the brain? *JNeuroendocrinol* 18:393-411.
- Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR (2006b) Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol* 18:393-411.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151-180.
- Ho JT, Lewis JG, O'Loughlin P, Bagley CJ, Romero R, Dekker GA, Torpy DJ (2007) Reduced maternal corticosteroid-binding globulin and cortisol levels in pre-

- eclampsia and gamete recipient pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:869-877.
- Ho JT, Al Musalhi H, Chapman MJ, Quach T, Thomas PD, Bagley CJ, Lewis JG, Torpy DJ (2006) Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. *JClinEndocrinolMetab* 91:105-114.
- Holsboer F, Ising M (2010) Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol* 61:81-109, C101-111.
- Hossner KL, Billiar RB (1981) Plasma clearance and organ distribution of native and desialylated rat and human transcortin: species specificity. *Endocrinology* 108:1780-1786.
- Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W (1986) Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3253-3256.
- Hsu BR, Kuhn RW (1988) The role of the adrenal in generating the diurnal variation in circulating levels of corticosteroid-binding globulin in the rat. *Endocrinology* 122:421-426.
- Hu JM, Bodwell JE, Munck A (1997) Control by basal phosphorylation of cell cycle-dependent, hormone-induced glucocorticoid receptor hyperphosphorylation. *Mol Endocrinol* 11:305-311.
- Huang ST, Cidlowski JA (2002) Phosphorylation status modulates Bcl-2 function during glucocorticoid-induced apoptosis in T lymphocytes. *FASEB J* 16:825-832.
- Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR (2005) A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *BiotechHistochem* 80:79-87.
- Jacobson L, Sapolsky R (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12:118-134.
- Jansson JO, Oscarsson J, Mode A, Ritzen EM (1989) Plasma growth hormone pattern and androgens influence the levels of corticosteroid-binding globulin in rat serum. *J Endocrinol* 122:725-732.
- Jasper MS, Engeland WC (1991) Synchronous ultradian rhythms in adrenocortical secretion detected by microdialysis in awake rats. *Am J Physiol* 261:R1257-1268.
- Jirikowski GF, Pusch L, Mopert B, Herbert Z, Caldwell JD (2007) Expression of corticosteroid binding globulin in the rat central nervous system. *JChemNeuroanat* 34:22-28.

- Joels M, Baram TZ (2009) The neuro-symphony of stress. *NatRevNeurosci* 10:459-466.
- Joels M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31:1-7.
- Jones BC, Sarrieau A, Reed CL, Azar MR, Mormede P (1998) Contribution of sex and genetics to neuroendocrine adaptation to stress in mice. *Psychoneuroendocrinology* 23:505-517.
- Kajantie E, Phillips DI (2006) The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 31:151-178.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M (2005) Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19204-19207.
- Kato EA, Hsu BR, Kuhn RW (1988) Comparative structural analyses of corticosteroid binding globulin. *J Steroid Biochem* 29:213-220.
- Keeney AJ, Hogg S, Marsden CA (2001) Alterations in core body temperature, locomotor activity, and corticosterone following acute and repeated social defeat of male NMRI mice. *Physiol Behav* 74:177-184.
- Kessler RC, McGonagle KA, Swartz M, Blazer DG, Nelson CB (1993) Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *JAffectDisord* 29:85-96.
- Killgore WD, Yurgelun-Todd DA (2001) Sex differences in amygdala activation during the perception of facial affect. *Neuroreport* 12:2543-2547.
- Kim AM, Tingen CM, Woodruff TK (2010) Sex bias in trials and treatment must end. *Nature* 465:688-689.
- King BM, Banta AR, Tharel GN, Bruce BK, Frohman LA (1983) Hypothalamic hyperinsulinemia and obesity: role of adrenal glucocorticoids. *Am J Physiol* 245:E194-199.
- Kirschbaum C, Kudielka BM, Gaab J, Schommer NC, Hellhammer DH (1999) Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *PsychosomMed* 61:154-162.
- Kivimaki M, Head J, Ferrie JE, Shipley MJ, Brunner E, Vahtera J, Marmot MG (2006) Work stress, weight gain and weight loss: evidence for bidirectional effects of

- job strain on body mass index in the Whitehall II study. *Int J Obes (Lond)* 30:982-987.
- Klieber MA, Underhill C, Hammond GL, Muller YA (2007) Corticosteroid-binding globulin, a structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release. *JBiolChem* 282:29594-29603.
- Kolber BJ, Muglia LJ (2009) Defining brain region-specific glucocorticoid action during stress by conditional gene disruption in mice. *Brain Res* 1293:85-90.
- Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97-129.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:69-72.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wöhr M, Fuchs E (2011) Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *NeurosciBiobehavRev* 35:1291-1301.
- Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS (2005) The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *NeurosciBiobehavRev* 29:3-38.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894-902.
- Krishnan V et al. (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131:391-404.
- Krupenko SA, Avvakumov GV, Strel'chyonok OA (1991) On the functional form of transcortin-recognizing subunit of transcortin membrane receptor. *FEBS Lett* 281:152-154.
- Kudielka BM, Kirschbaum C (2005) Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *BiolPsychol* 69:113-132.
- Kudielka BM, Hellhammer DH, Wust S (2009) Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology* 34:2-18.
- Kuhn RW, Green AL, Raymoure WJ, Siiteri PK (1986) Immunocytochemical localization of corticosteroid-binding globulin in rat tissues. *J Endocrinol* 108:31-36.

- Kumsta R, Entringer S, Hellhammer DH, Wust S (2007) Cortisol and ACTH responses to psychosocial stress are modulated by corticosteroid binding globulin levels. *Psychoneuroendocrinology* 32:1153-1157.
- Kyrou I, Tsigos C (2009) Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 9:787-793.
- Lalonde R (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 26:91-104.
- Lanfumey L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, Hamon M (2008) Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1174-1184.
- LaPlant Q, Chakravarty S, Vialou V, Mukherjee S, Koo JW, Kalahasti G, Bradbury KR, Taylor SV, Maze I, Kumar A, Graham A, Birnbaum SG, Krishnan V, Truong HT, Neve RL, Nestler EJ, Russo SJ (2009) Role of nuclear factor kappaB in ovarian hormone-mediated stress hypersensitivity in female mice. *Biol Psychiatry* 65:874-880.
- Larsen JE, Avvakumov GV, Hammond GL, Vogel LK (1999) N-glycans are not the signal for apical sorting of corticosteroid binding globulin in MDCK cells. *FEBS Lett* 451:19-22.
- Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC (2006) An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 7:216.
- Lazarus RS (1993) Coping theory and research: past, present, and future. *Psychosom Med* 55:234-247.
- Levine S (2000) Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* 405:149-160.
- Lewis JG, Shand BI, Elder PA, Scott RS (2004) Plasma sex hormone-binding globulin rather than corticosteroid-binding globulin is a marker of insulin resistance in obese adult males. *Diabetes Obes Metab* 6:259-263.
- Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ (2005) Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta* 359:189-194.
- Lewis JG, Borowski KK, Shand BI, George PM, Scott RS (2010) Plasma sex hormone-binding globulin, corticosteroid-binding globulin, cortisol, and free cortisol levels in outpatients attending a lipid disorders clinic: a cross-sectional study of 1137 subjects. *Horm Metab Res* 42:274-279.

- Liberzon I, Taylor SF, Amdur R, Jung TD, Chamberlain KR, Minoshima S, Koeppe RA, Fig LM (1999) Brain activation in PTSD in response to trauma-related stimuli. *Biol Psychiatry* 45:817-826.
- Lightman SL, Conway-Campbell BL (2010) The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *NatRevNeurosci* 11:710-718.
- Lin HY, Muller YA, Hammond GL (2010a) Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *MolCell Endocrinol* 316:3-12.
- Lin HY, Muller YA, Hammond GL (2010b) Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Mol Cell Endocrinol* 316:3-12.
- Lohrenz FN, Seal US, Doe RP (1967) Adrenal function and serum protein concentrations in a kindred with decreased corticosteroid-binding globulin (CBG) concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 27:966-972.
- Lovas K, Husebye ES (2007) Continuous subcutaneous hydrocortisone infusion in Addison's disease. *Eur J Endocrinol* 157:109-112.
- Lovas K, Husebye ES (2008) Replacement therapy for Addison's disease: recent developments. *Expert Opin Investig Drugs* 17:497-509.
- Lu A, Steiner MA, Whittle N, Vogl AM, Walser SM, Ableitner M, Refojo D, Ekker M, Rubenstein JL, Stalla GK, Singewald N, Holsboer F, Wotjak CT, Wurst W, Deussing JM (2008) Conditional mouse mutants highlight mechanisms of corticotropin-releasing hormone effects on stress-coping behavior. *MolPsychiatry* 13:1028-1042.
- Lu NZ, Cidlowski JA (2006) Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 16:301-307.
- Lupien SJ, McEwen BS (1997) The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain ResBrain ResRev* 24:1-27.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *NatRevNeurosci* 10:434-445.
- Lynn SE, Breuner CW, Wingfield JC (2003) Short-term fasting affects locomotor activity, corticosterone, and corticosterone binding globulin in a migratory songbird. *HormBehav* 43:150-157.
- Maes M, Van Gastel A, Blockx P, Martin M, Cosyns P, Scharpe S, Ranjan R, Desnyder R (1996) Lower serum transcortin (CBG) in major depressed

- females: relationships with baseline and postdexamethasone cortisol values. *J Affect Disord* 38:47-56.
- Maitra US, Khan MS, Rosner W (1993) Corticosteroid-binding globulin receptor of the rat hepatic membrane: solubilization, partial characterization, and the effect of steroids on binding. *Endocrinology* 133:1817-1822.
- Marti O, Gavaldà A, Jolin T, Armario A (1993) Effect of regularity of exposure to chronic immobilization stress on the circadian pattern of pituitary adrenal hormones, growth hormone, and thyroid stimulating hormone in the adult male rat. *Psychoneuroendocrinology* 18:67-77.
- Mason JW, Brady JV, Polish E, Bauer JA, Robinson JA, Rose RM, Taylor ED (1961) Patterns of corticosteroid and pepsinogen change related to emotional stress in the monkey. *Science* 133:1596-1598.
- Mataradze GD, Kurabekova RM, Rozen VB (1992) The role of sex steroids in the formation of sex-differentiated concentrations of corticosteroid-binding globulin in rats. *JEndocrinol* 132:235-240.
- McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *AnnNYAcadSci* 840:33-44.
- McEwen BS (2000) Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* 48:721-731.
- McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873-904.
- McEwen BS (2010) Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *AnnNYAcadSci* 1204 Suppl:E38-E59.
- McEwen BS, Stellar E (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *ArchInternMed* 153:2093-2101.
- McEwen BS, Wingfield JC (2010) What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *HormBehav* 57:105-111.
- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ (2009) Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *NatNeurosci* 12:342-348.
- McLean M, Bisits A, Davies J, Woods R, Lowry P, Smith R (1995) A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med* 1:460-463.

- Meaney MJ, Szyf M (2005) Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues Clin Neurosci* 7:103-123.
- Meaney MJ, Aitken DH, Sharma S, Viau V (1992) Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55:204-213.
- Mendel CM (1989) The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 10:232-274.
- Metz TO, Qian WJ, Jacobs JM, Gritsenko MA, Moore RJ, Polpitiya AD, Monroe ME, Camp DG, 2nd, Mueller PW, Smith RD (2008) Application of proteomics in the discovery of candidate protein biomarkers in a diabetes autoantibody standardization program sample subset. *J Proteome Res* 7:698-707.
- Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6991-6995.
- Mickelson KE, Forsthoefel J, Westphal U (1981) Steroid-protein interactions. Human corticosteroid binding globulin: some physicochemical properties and binding specificity. *Biochemistry* 20:6211-6218.
- Mickelson KE, Harding GB, Forsthoefel M, Westphal U (1982) Steroid-protein interactions. Human corticosteroid-binding globulin: characterization of dimer and electrophoretic variants. *Biochemistry* 21:654-660.
- Mihrshahi R, Lewis JG, Ali SO (2006) Hormonal effects on the secretion and glycoform profile of corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 101:275-285.
- Mineka S, Kihlstrom JF (1978) Unpredictable and uncontrollable events: a new perspective on experimental neurosis. *J Abnorm Psychol* 87:256-271.
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2006) Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 175:43-50.
- Mitchell E, Torpy DJ, Bagley CJ (2004) Pregnancy-associated corticosteroid-binding globulin: high resolution separation of glycan isoforms. *Horm Metab Res* 36:357-359.
- Mitra R (2011) Adverse effects of corticosteroids on bone metabolism: a review. *PM R* 3:466-471; quiz 471.

- Moilanen T, Nikkari T (1981) The effect of storage on the fatty acid composition of human serum. *Clin Chim Acta* 114:111-116.
- Moisan MP (2010) Genotype-phenotype associations in understanding the role of corticosteroid-binding globulin in health and disease animal models. *Mol Cell Endocrinol* 316:35-41.
- Moles A, Bartolomucci A, Garbugino L, Conti R, Caprioli A, Coccorello R, Rizzi R, Ciani B, D'Amato FR (2006) Psychosocial stress affects energy balance in mice: modulation by social status. *Psychoneuroendocrinology* 31:623-633.
- Moore DE, Kawagoe S, Davajan V, Nakamura RM, Mishell DR (1978) An in vivo system in man for quantitation of estrogenicity. II. Pharmacologic changes in binding capacity of serum corticosteroid-binding globulin induced by conjugated estrogens, mestranol, and ethinyl estradiol. *AmJObstetGynecol* 130:482-486.
- Mopert B, Herbert Z, Caldwell JD, Jirikowski GF (2006) Expression of corticosterone-binding globulin in the rat hypothalamus. *HormMetab Res* 38:246-252.
- Mormede P, Foury A, Barat P, Corcuff JB, Terenina E, Marissal-Arvy N, Moisan MP (2011) Molecular genetics of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and function. *Ann N Y Acad Sci* 1220:127-136.
- Mormède P, Dantzer R, Bluthé RM, Caritez JC (1984) Differences in adaptive abilities of three breeds of chinese pigs. *Genet Sel Evol* 16:85-102.
- Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res* 5:600-608.
- Murray EA, Bussey TJ, Saksida LM (2007) Visual perception and memory: a new view of medial temporal lobe function in primates and rodents. *Annu Rev Neurosci* 30:99-122.
- Nader N, Raverot G, Emptoz-Bonneton A, Dechaud H, Bonnay M, Baudin E, Pugeat M (2006) Mitotane has an estrogenic effect on sex hormone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in humans. *JClinEndocrinolMetab* 91:2165-2170.
- Navailles S, Benazzouz A, Bioulac B, Gross C, De Deurwaerdere P (2010) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-3,4-dihydroxyphenylalanine inhibit in vivo serotonin release in the prefrontal cortex and hippocampus in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 30:2356-2364.

- O'Regan D, Welberg LL, Holmes MC, Seckl JR (2001) Glucocorticoid programming of pituitary-adrenal function: mechanisms and physiological consequences. *Semin Neonatol* 6:319-329.
- Odermatt A, Gumy C (2008) Glucocorticoid and mineralocorticoid action: Why should we consider influences by environmental chemicals? *BiochemPharmacol*.
- Oitzl MS, Fluttert M, de Kloet ER (1994) The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. *Eur J Neurosci* 6:1072-1079.
- Orava M, Zhao XF, Leiter E, Hammond GL (1994) Structure and chromosomal location of the gene encoding mouse corticosteroid-binding globulin: strain differences in coding sequence and steroid-binding activity. *Gene* 144:259-264.
- Otte C, Hart S, Neylan TC, Marmar CR, Yaffe K, Mohr DC (2005) A meta-analysis of cortisol response to challenge in human aging: importance of gender. *Psychoneuroendocrinology* 30:80-91.
- Ottenweller JE, Meier AH, Russo AC, Frenzke ME (1979) Circadian rhythms of plasma corticosterone binding activity in the rat and the mouse. *Acta Endocrinol (Copenh)* 91:150-157.
- Ousova O, Guyonnet-Duperat V, Iannuccelli N, Bidanel JP, Milan D, Genet C, Llamas B, Yerle M, Gellin J, Chardon P, Emptoz-Bonneton A, Pugeat M, Mormede P, Moisan MP (2004) Corticosteroid binding globulin: a new target for cortisol-driven obesity. *MolEndocrinol* 18:1687-1696.
- Paoletti P, Butti G, Zibera C, Scerrati M, Gibelli N, Roselli R, Magrassi L, Sica G, Rossi G, Robustelli della Cuna G (1990) Characteristics and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors. *J Neurosurg* 73:736-742.
- Pardridge WM, Eisenberg J, Fierer G, Kuhn RW (1986) CBG does not restrict blood-brain barrier corticosterone transport in rabbits. *Am J Physiol* 251:E204-208.
- Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31:464-468.
- Patchev VK, Hayashi S, Orikasa C, Almeida OF (1995) Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB J* 9:419-423.
- Paul ES, Harding EJ, Mendl M (2005) Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neurosci Biobehav Rev* 29:469-491.

- Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24:525-529.
- Pemberton PA, Stein PE, Pepys MB, Potter JM, Carrell RW (1988) Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature* 336:257-258.
- Pepe GJ, Jury HH, Hammond GL, Albrecht ED (1996) Developmental regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the baboon fetus. *Endocrinology* 137:3323-3328.
- Perogamvros I, Underhill C, Henley DE, Hadfield KD, Newman WG, Ray DW, Lightman SL, Hammond GL, Trainer PJ (2010) Novel corticosteroid-binding globulin variant that lacks steroid binding activity. *JClinEndocrinolMetab* 95:E142-E150.
- Perrot-Applanat M, Racadot O, Milgrom E (1984) Specific localization of plasma corticosteroid-binding globulin immunoreactivity in pituitary corticotrophs. *Endocrinology* 115:559-569.
- Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, Brasen JH, Schulz H, Gross V, Grøne HJ, Nykjaer A, Willnow TE (2006) Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin. *MolCell Biol* 26:7236-7245.
- Petro AE, Cotter J, Cooper DA, Peters JC, Surwit SJ, Surwit RS (2004) Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. *Metabolism* 53:454-457.
- Piazza PV, Le Moal M (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends PharmacolSci* 19:67-74.
- Piscitelli F, Carta G, Bisogno T, Murru E, Cordeddu L, Berge K, Tandy S, Cohn JS, Griinari M, Banni S, Di Marzo V (2011) Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. *Nutr Metab (Lond)* 8:51.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.
- Potempa J, Korzus E, Travis J (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 269:15957-15960.
- Pugeat M, Bonneton A, Perrot D, Rocle-Nicolas B, Lejeune H, Grenot C, Dechaud H, Brebant C, Motin J, Cuilleron CY (1989) Decreased immunoreactivity and

- binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. *Clin Chem* 35:1675-1679.
- Pugeat MM, Dunn JF, Nisula BC (1981) Transport of steroid hormones: interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 53:69-75.
- Pusch L, Wegmann S, Caldwell JD, Jirikowski GF (2009) Expression of corticosteroid-binding globulin in human astrocytoma cell line. *Cell Mol Neurobiol* 29:583-588.
- Qian X, Droste SK, Gutierrez-Mecinas M, Collins A, Kersante F, Reul JM, Linthorst AC (2011) A rapid release of corticosteroid-binding globulin from the liver restrains the glucocorticoid hormone response to acute stress. *Endocrinology* 152:3738-3748.
- Qureshi AC, Bahri A, Breen LA, Barnes SC, Powrie JK, Thomas SM, Carroll PV (2007) The influence of the route of oestrogen administration on serum levels of cortisol-binding globulin and total cortisol. *ClinEndocrinol(Oxf)* 66:632-635.
- Raison CL, Miller AH (2003) When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *AmJPsychiatry* 160:1554-1565.
- Raison CL, Capuron L, Miller AH (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 27:24-31.
- Reul JM, de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505-2511.
- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER (1987a) Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 45:407-412.
- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER (1987b) Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *J Endocrinol* 115:459-467.
- Rhen T, Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353:1711-1723.
- Rhodes ME, Rubin RT (1999) Functional sex differences ('sexual diergism') of central nervous system cholinergic systems, vasopressin, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mammals: a selective review. *Brain ResBrain ResRev* 30:135-152.

- Richard E, Fernandez Real JM, Lopez Bermejo A, Ricard W, Déchaud H, Pugeat M, Moisan MP (2009) Corticosteroid binding globulin and glucocorticoid receptor genotypes influence body composition in a male population. *Int J Genet Mol Biol* 1:59-63.
- Richard EM, Helbling JC, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, Pourtau L, Konsman JP, Mormede P, Moisan MP (2010) Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151:649-659.
- Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hortnagl H, Flor H, Henn FA, Schutz G, Gass P (2005) Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *JNeurosci* 25:6243-6250.
- Riniker B, Sieber P, Rittel W, Zuber H (1972) Revised amino-acid sequences for porcine and human adrenocorticotrophic hormone. *Nat New Biol* 235:114-115.
- Roberts MP, Kattesh HG, Baumbach GA, Gillespie BE, Godkin JD, Schneider JF, Saxton AM (2003) Age-related changes in porcine corticosteroid-binding globulin (pCBG) as determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Domest Anim Endocrinol* 24:323-339.
- Roitman A, Bruchis S, Bauman B, Kaufman H, Laron Z (1984) Total deficiency of corticosteroid-binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 21:541-548.
- Rojo L, Conesa L, Bermudez O, Livianos L (2006) Influence of stress in the onset of eating disorders: data from a two-stage epidemiologic controlled study. *Psychosom Med* 68:628-635.
- Rooszendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009a) Stress, memory and the amygdala. *NatRevNeurosci*.
- Rooszendaal B, de Quervain DJ, Ferry B, Setlow B, McGaugh JL (2001a) Basolateral amygdala-nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. *J Neurosci* 21:2518-2525.
- Rooszendaal B, Phillips RG, Power AE, Brooke SM, Sapolsky RM, McGaugh JL (2001b) Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression. *Nat Neurosci* 4:1169-1171.
- Rooszendaal B, McReynolds JR, Van der Zee EA, Lee S, McGaugh JL, McIntyre CK (2009b) Glucocorticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. *JNeurosci* 29:14299-14308.

- Rosmond R, Dallman MF, Bjorntorp P (1998a) Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1853-1859.
- Rosmond R, Dallman MF, Bjorntorp P (1998b) Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1853-1859.
- Rosner W (1990) The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr Rev* 11:80-91.
- Rosner W, Hryb DJ, Kahn SM, Nakhla AM, Romas NA (2010) Interactions of sex hormone-binding globulin with target cells. *Mol Cell Endocrinol* 316:79-85.
- Salehi B, Cordero MI, Sandi C (2010) Learning under stress: the inverted-U-shape function revisited. *Learn Mem* 17:522-530.
- Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, MacDonald IA, Bannister PA, Frayn KN (1998) Effects of physiological hypercortisolemia on the regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 83:626-631.
- Sandi C, Woodson JC, Haynes VF, Park CR, Touyarot K, Lopez-Fernandez MA, Venero C, Diamond DM (2005) Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 57:856-864.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7:284-301.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21:55-89.
- Savu L, Zouaghi H, Carli A, Nunez EA (1981) Serum depletion of corticosteroid binding activities, an early marker of human septic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 102:411-419.
- Schiestl M, Stangler T, Torella C, Cepeljnik T, Toll H, Grau R (2011) Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 29:310-312.
- Schlechte JA, Hamilton D (1987) The effect of glucocorticoids on corticosteroid binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 27:197-203.
- Schmidt TJ, Meyer AS (1994) Autoregulation of corticosteroid receptors. How, when, where, and why? *Receptor* 4:229-257.

- Schotte CK, Van Den BB, De Doncker D, Claes S, Cosyns P (2006) A biopsychosocial model as a guide for psychoeducation and treatment of depression. *DepressAnxiety* 23:312-324.
- Schwabe L, Wolf OT (2010) Learning under stress impairs memory formation. *NeurobiolLearnMem* 93:183-188.
- Schwabe L, Wolf OT, Oitzl MS (2010a) Memory formation under stress: quantity and quality. *NeurosciBiobehavRev* 34:584-591.
- Schwabe L, Schachinger H, de Kloet ER, Oitzl MS (2010b) Corticosteroids operate as a switch between memory systems. *JCogn Neurosci* 22:1362-1372.
- Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I (2009) Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoSOne* 4:e4326.
- Scrocchi LA, Hearn SA, Han VK, Hammond GL (1993a) Corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the mouse liver and kidney during postnatal development. *Endocrinology* 132:910-916.
- Scrocchi LA, Orava M, Smith CL, Han VK, Hammond GL (1993b) Spatial and temporal distribution of corticosteroid-binding globulin and its messenger ribonucleic acid in embryonic and fetal mice. *Endocrinology* 132:903-909.
- Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Harbuz MS, Lightman SL (2004a) Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *JNeuroendocrinol* 16:989-998.
- Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Harbuz MS, Lightman SL (2005a) Postnatal masculinization alters the HPA axis phenotype in the adult female rat. *JPhysiol* 563:265-274.
- Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Lightman SL, Harbuz MS (2005b) Organizational role for testosterone and estrogen on adult hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the male rat. *Endocrinology* 146:1973-1982.
- Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Bate E, Lightman SL, Ingram CD, Jessop DS, Harbuz MS (2004b) Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *JNeuroendocrinol* 16:516-524.
- Sébédio JL, Juanéda P (1991) Quantitative lipid analyses using the new latroscan TLC-FID system. *J Planar Chrom* 4:35-41.

- Seckl JR (1997) Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. *Steroids* 62:89-94.
- Seckl JR (2004) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr Opin Pharmacol* 4:597-602.
- Seckl JR, Walker BR (2001) Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142:1371-1376.
- Seligman ME, Maier SF (1967) Failure to escape traumatic shock. *JExpPsychol* 74:1-9.
- Selye H (1937) The Significance of the Adrenals for Adaptation. *Science* 85:247-248.
- Selye H (1973) The evolution of the stress concept. *AmSci* 61:692-699.
- Seralini GE, Smith CL, Hammond GL (1990a) Rabbit corticosteroid-binding globulin: primary structure and biosynthesis during pregnancy. *MolEndocrinol* 4:1166-1172.
- Seralini GE, Berube D, Gagne R, Hammond GL (1990b) The human corticosteroid binding globulin gene is located on chromosome 14q31-q32.1 near two other serine protease inhibitor genes. *HumGenet* 86:73-75.
- Seralini GE, Underhill CM, Smith CL, Nguyen VT, Hammond GL (1989) Biological half-life and transfer of maternal corticosteroid-binding globulin to amniotic fluid in the rabbit. *Endocrinology* 125:1321-1325.
- Shors TJ, Chua C, Falduto J (2001) Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus. *JNeurosci* 21:6292-6297.
- Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW (1982) The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res* 38:457-510.
- Sivukhina EV, Jirikowski GF, Bernstein HG, Lewis JG, Herbert Z (2006) Expression of corticosteroid-binding protein in the human hypothalamus, co-localization with oxytocin and vasopressin. *HormMetab Res* 38:253-259.
- Slavinski EA, Jull JW, Auersperg N (1976) Steroidogenic pathways and trophic response to adrenocorticotrophin of cultured adrenocortical cells in different states of differentiation. *J Endocrinol* 69:385-394.

- Smith AW, Baum A, Wing RR (2005) Stress and weight gain in parents of cancer patients. *Int J Obes (Lond)* 29:244-250.
- Smith CL, Hammond GL (1991a) An amino acid substitution in biobreeding rat corticosteroid binding globulin results in reduced steroid binding affinity. *J Biol Chem* 266:18555-18559.
- Smith CL, Hammond GL (1991b) Ontogeny of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the rat. *Endocrinology* 128:983-988.
- Smith CL, Power SG, Hammond GL (1992) A Leu---His substitution at residue 93 in human corticosteroid binding globulin results in reduced affinity for cortisol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42:671-676.
- Solberg LC, Baum AE, Ahmadiyeh N, Shimomura K, Li R, Turek FW, Takahashi JS, Churchill GA, Redei EE (2006) Genetic analysis of the stress-responsive adrenocortical axis. *Physiol Genomics* 27:362-369.
- Solomon MB, Herman JP (2009) Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. *Physiol Behav* 97:250-258.
- Solomon MB, Foster MT, Bartness TJ, Huhman KL (2007) Social defeat and footshock increase body mass and adiposity in male Syrian hamsters. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 292:R283-R290.
- Sousa N, Cerqueira JJ, Almeida OF (2008) Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Res Rev* 57:561-570.
- Spencer RL, Miller AH, Moday H, Stein M, McEwen BS (1993) Diurnal differences in basal and acute stress levels of type I and type II adrenal steroid receptor activation in neural and immune tissues. *Endocrinology* 133:1941-1950.
- Spencer RL, Miller AH, Moday H, McEwen BS, Blanchard RJ, Blanchard DC, Sakai RR (1996) Chronic social stress produces reductions in available splenic type II corticosteroid receptor binding and plasma corticosteroid binding globulin levels. *Psychoneuroendocrinology* 21:95-109.
- Sterling P, Eyer J (1988) Allostasis : A new paradigm to explain arousal pathology. In: *Handbook of Life Stress, Cognition and Health* (In Fisher S RJe, ed), pp pp 629-649. Chichester: John Wiley.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85:367-370.

- Strel'chyonok OA, Avvakumov GV (1983) Evidence for the presence of specific binding sites for transcortin in human liver plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 755:514-517.
- Strel'chyonok OA, Avvakumov GV (1991) Interaction of human CBG with cell membranes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:795-803.
- Stroud LR, Salovey P, Epel ES (2002) Sex differences in stress responses: social rejection versus achievement stress. *Biol Psychiatry* 52:318-327.
- Takuma K, Matsuo A, Himeno Y, Hoshina Y, Ohno Y, Funatsu Y, Arai S, Kamei H, Mizoguchi H, Nagai T, Koike K, Inoue M, Yamada K (2007) 17beta-estradiol attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction induced by chronic restraint stress in ovariectomized rats. *Neuroscience* 146:60-68.
- Tapp WN, Holaday JW, Natelson BH (1984) Ultradian glucocorticoid rhythms in monkeys and rats continue during stress. *Am J Physiol* 247:R866-871.
- Thoeringer CK, Sillaber I, Roedel A, Erhardt A, Mueller MB, Ohl F, Holsboer F, Keck ME (2007) The temporal dynamics of intrahippocampal corticosterone in response to stress-related stimuli with different emotional and physical load: an in vivo microdialysis study in C57BL/6 and DBA/2 inbred mice. *Psychoneuroendocrinology* 32:746-757.
- Tinnikov AA, Legan MV, Sheveluk NA, Cvetovskaya GA, Naumenko SE, Sidelnikov SG (1996) Corticosteroid and immune responses to cardiac surgery. *Steroids* 61:411-415.
- Torpy DJ, Ho JT (2007) Corticosteroid-binding globulin gene polymorphisms: clinical implications and links to idiopathic chronic fatigue disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:161-167.
- Torpy DJ, Lundgren BA, Ho JT, Lewis JG, Scott HS, Mericq V (2011) CBG Santiago: a Novel CBG Mutation. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Torpy DJ, Bachmann AW, Grice JE, Fitzgerald SP, Phillips PJ, Whitworth JA, Jackson RV (2001) Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3692-3700.
- Torpy DJ, Bachmann AW, Gartside M, Grice JE, Harris JM, Clifton P, Easteal S, Jackson RV, Whitworth JA (2004) Association between chronic fatigue syndrome and the corticosteroid-binding globulin gene ALA SER224 polymorphism. *Endocr Res* 30:417-429.
- Touma C, Fenzl T, Ruschel J, Palme R, Holsboer F, Kimura M, Landgraf R (2009) Rhythmicity in mice selected for extremes in stress reactivity: behavioural,

endocrine and sleep changes resembling endophenotypes of major depression. *PLoSOne* 4:e4325.

Touma C, Bunck M, Glasl L, Nussbaumer M, Palme R, Stein H, Wolferstatter M, Zeh R, Zimbelmann M, Holsboer F, Landgraf R (2008) Mice selected for high versus low stress reactivity: a new animal model for affective disorders. *Psychoneuroendocrinology* 33:839-862.

Trainer PJ (2002) Corticosteroids and pregnancy. *Semin Reprod Med* 20:375-380.

Tronche C, Pierard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Beracochea D (2010) Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem* 93:343-351.

Tschop M, Lahner H, Feldmeier H, Grasberger H, Morrison KM, Janssen OE, Attanasio AF, Strasburger CJ (2000) Effects of growth hormone replacement therapy on levels of cortisol and cortisol-binding globulin in hypopituitary adults. *EurJEndocrinol* 143:769-773.

Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *JPsychosomRes* 53:865-871.

Tsigos C, Kyrou I, Chrousos GP, Papanicolaou DA (1998) Prolonged suppression of corticosteroid-binding globulin by recombinant human interleukin-6 in man. *JClinEndocrinolMetab* 83:3379.

Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *NatRevNeurosci* 10:397-409.

Underhill DA, Hammond GL (1989) Organization of the human corticosteroid binding globulin gene and analysis of its 5'-flanking region. *Mol Endocrinol* 3:1448-1454.

Van Baelen H, Brepoels R, De Moor P (1982) Transcortin Leuven: a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol-binding affinity. *J Biol Chem* 257:3397-3400.

Van Baelen H, Power SG, Hammond GL (1993) Decreased cortisol-binding affinity of transcortin Leuven is associated with an amino acid substitution at residue-93. *Steroids* 58:275-277.

van Gaalen MM, Steckler T (2000) Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behav Brain Res* 115:95-106.

- van Haarst AD, Oitzl MS, Workel JO, de Kloet ER (1996) Chronic brain glucocorticoid receptor blockade enhances the rise in circadian and stress-induced pituitary-adrenal activity. *Endocrinology* 137:4935-4943.
- Wald C, Wu C (2010) Biomedical research. Of mice and women: the bias in animal models. *Science* 327:1571-1572.
- Walker EA, Stewart PM (2003) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends Endocrinol Metab* 14:334-339.
- Weiser MJ, Handa RJ (2009) Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience* 159:883-895.
- White T, Ozel B, Jain JK, Stanczyk FZ (2006) Effects of transdermal and oral contraceptives on estrogen-sensitive hepatic proteins. *Contraception* 74:293-296.
- Wiegatz I, Kutschera E, Lee JH, Moore C, Mellinger U, Winkler UH, Kuhl H (2003) Effect of four different oral contraceptives on various sex hormones and serum-binding globulins. *Contraception* 67:25-32.
- Windle RJ, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD (1998a) The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology* 139:4044-4052.
- Windle RJ, Wood SA, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (1998b) Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139:443-450.
- Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jonsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C, Fratiglioni L, Jennum P, Lieb R, Maercker A, van Os J, Preisig M, Salvador-Carulla L, Simon R, Steinhausen HC (2011) The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:655-679.
- Wolf G, Armstrong EG, Rosner W (1981) Synthesis in vitro of corticosteroid-binding globulin from rat liver messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 108:805-811.
- Wust S, Federenko IS, van Rossum EF, Koper JW, Kumsta R, Entringer S, Hellhammer DH (2004) A psychobiological perspective on genetic determinants of hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity. *AnnNYAcadSci* 1032:52-62.

- Wyrwoll CS, Holmes MC, Seckl JR (2011) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Front Neuroendocrinol* 32:265-286.
- Yabaluri N, Bashyam MD (2010) Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* 35:473-484.
- Yau JL, Olsson T, Morris RG, Meaney MJ, Seckl JR (1995) Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: relationship with spatial learning in young and aged rats. *Neuroscience* 66:571-581.
- Young EA, Abelson J, Lightman SL (2004) Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front Neuroendocrinol* 25:69-76.
- Yu CY, Mayba O, Lee JV, Tran J, Harris C, Speed TP, Wang JC (2010) Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis. *PLoS One* 5:e15188.
- Zhao H, Friedman RD, Fournier RE (2007) The locus control region activates serpin gene expression through recruitment of liver-specific transcription factors and RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 27:5286-5295.
- Zhou A, Wei Z, Stanley PL, Read RJ, Stein PE, Carrell RW (2008) The S-to-R transition of corticosteroid-binding globulin and the mechanism of hormone release. *J Mol Biol* 380:244-251.
- Zhou J, Cidlowski JA (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70:407-417.
- Zucker I, Beery AK (2010) Males still dominate animal studies. *Nature* 465:690.

RESUME

Une grande diversité dans la réponse adaptative au stress est observée entre les individus favorisant une sensibilité variable face aux stressseurs et pouvant conduire à une vulnérabilité à développer divers troubles et pathologies. Cette diversité est sous tendue par les caractéristiques propres de chaque individu, déterminées par le patrimoine génétique en interaction avec les facteurs environnementaux. Des études génétiques menées au laboratoire ont permis de placer le gène de la *Cbg* comme un candidat important influençant les réponses de stress. L'équipe a alors développé un modèle de souris déficiente pour le gène *Cbg* (k.o. total). La CBG est une glycoprotéine plasmatique responsable de la biodisponibilité et du transport jusqu'à leur cible des glucocorticoïdes, produits finaux de l'axe corticotrope.

A l'aide de ce modèle original, l'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier les conséquences fonctionnelles de la déficience en CBG sur les réponses de stress. Nous avons ainsi analysé l'activité et la réactivité de l'axe corticotrope ainsi que les comportements émotionnels des mâles et des femelles k.o. *Cbg* dans des conditions de repos, de stress aigu et dans un contexte mimant l'effet d'un style de vie occidentale (modélisé par une alimentation enrichie en gras, associée à un stress chronique). Nous présentons ainsi un modèle murin unique d'hypo-réponse des glucocorticoïdes au stress associé à une réponse comportementale adaptative ralentie au niveau émotionnel et cognitif. L'ensemble de ces travaux contribue à placer la CBG et son gène comme acteur majeur de la variabilité individuelle des réponses de stress.

Mots clés : transcortine, CBG, axe corticotrope, glucocorticoïdes, stress, comportement émotionnel

ABSTRACT

A great diversity in the adaptive response to stress is observed between individuals favoring a variable sensitivity to face stressors and leading to a vulnerability to develop various disorders and diseases. This diversity is due to the characteristics of each individual, as determined by the genetic background in interaction with environmental factors. Genetic studies conducted in the laboratory demonstrated that the *Cbg* gene is an important candidate influencing stress responses. The team then developed a mouse model deficient for the gene *Cbg* (total k.o.). CBG is a plasma glycoprotein responsible for the bioavailability and the transport of glucocorticoids, the final products of the HPA axis, to their target.

Using this original model, the objective of my thesis was to study the functional consequences of CBG deficiency on responses to stress exposure. We have analyzed the activity and reactivity of the HPA axis and the emotional behaviors of males and females k.o. *Cbg* in resting conditions, acute stress and in a context that mimics the effect of a Western life style (modeled by a high fat diet, associated with chronic stress). We present an unique mouse model of glucocorticoid hyposignaling in response to stress associated with behavioral responses slowed down at the emotional and cognitive levels. Overall, this work contributes to place CBG and its gene as major actor of individual variability to stress.

Key words : transcortin, CBG, HPA axis, glucocorticoids, stress, emotional behavior