



502THV-2

République Algérienne
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD Dahleb Blida

Faculté des sciences Agro-Vétérinaire et Biologique
Département des Sciences Vétérinaires

Projet de fin d'études en vue de l'obtention
du Diplôme de Docteur vétérinaire

Thème :

Influence de la leptine sur le cycle œstral
chez la rate Wistar

Présenté par :

GAOUAOUI Hayat

&

SMAINI Farida

Devant le jury composé de :

<i>Dr KAIDI R...</i>	<i>Professeur</i>	<i>USDB</i>	<i>Président</i>
<i>Mme KADI A</i>	<i>Docteur</i>	<i>USDB</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mme HADJ BEKKOPUCHE F.</i>	<i>Professeur</i>	<i>USTHB</i>	<i>Co-Promotrice</i>
<i>Mme GHOURI I.</i>	<i>Maître Assistante</i>	<i>USDB</i>	<i>Promotrice</i>

Année Universitaire : 2010 - 2011

Chapitre I : **Généralités sur la leptine**

1. Qu'est-ce que la Leptine ?

La leptine, du terme grec *leptos* qui signifie « mince », est une hormone qui régule les réserves de graisses dans l'organisme ainsi que l'appétit en contrôlant la sensation de satiété. Génétiquement, la leptine est codée par le gène *ob*, dont la mutation qui a été étudiée en laboratoire chez certaines souris est à l'origine d'obésité [6].

La leptine est une protéine non glycosylée de 16 kDa, constituée de 146 acides aminés. Essentiellement sécrétée par les adipocytes, de façon proportionnelle à la masse corporelle adipeuse, elle est également produite, en plus faible quantité par l'estomac, les muscles squelettiques et le placenta [52]. Les sujets obèses présentent en effet des taux sériques de leptine plus élevés que les sujets de poids normal [16]. En outre, une réduction du poids corporel est associée à une diminution des taux sériques de leptine [21].

2. Historique et découverte

Dès 1950, un modèle animal de souris obèse est découvert : ces souris *ob/ob* sont diabétiques et stériles et pèsent 50% de plus que les souris type sauvages [48]. Un second type de modèle de souris est découvert plus tard, elle est appelée *db/db* (pour diabète), puisque celle-ci est hyperglycémique avec un excès de gras et stériles.

La parabiose (expérience de circulation croisée) entre des souris normales, des souris *ob/ob* et des souris *db/db* a montré que la circulation du sang de souris normales chez des souris *ob/ob* diminue la prise alimentaire et le poids corporel alors qu'elle est sans effet chez les souris *db/db* [78].

Ces résultats laissent penser qu'il existe une hormone présente chez les souris normales et active chez les souris déficientes génétiquement, capable de réguler la prise alimentaire ainsi que l'accumulation des réserves lipidiques.

En 1958, Hervey démontre l'existence d'une hormone régulatrice du poids corporel *via* l'hypothalamus par une expérience de circulation croisée ou parabiose chez le rat. Hervey en déduit l'existence d'un facteur de satiété agissant par l'intermédiaire de l'hypothalamus [5, 43].

Ce n'est qu'en 1994, que le gène *ob* est identifié ainsi que sa protéine [82], ce qui a permis sa synthèse un an plus tard [16]. Cette découverte valide l'existence d'un facteur adipocytaire satiétogène. Le produit du gène *ob* est nommé « leptine » [39].

Les résultats obtenus ces dernières années suggèrent que la leptine est capable d'adapter le comportement alimentaire (les souris *ob/ob* et *db/db* sont hyperphagiques) et la thermogénèse en fonction de la balance énergétique de l'organisme [35].

3. Leptine : gène, promoteur, récepteurs & régulation

3.1. Gène

Le gène, « *ob* », codant pour la leptine, a été identifié pour la première fois chez la souris, sur le chromosome 6 [82]. Il contient 3 exons et 2 introns. Il est porté par la région q31.3 du chromosome 7 chez l'homme [5].

Chaque espèce a son propre gène qui code pour la leptine mais avec une homologie très importante. L'homologie des précurseurs du gène entre la souris et le rat est de 96%, et est de 83% entre la souris et l'homme [54].

La souris *ob/ob* présente un défaut du gène «*ob*» codant pour la leptine, alors que la souris *db/db* présente un défaut dans le gène «*db*» codant pour le récepteur de la leptine.

Sa mutation chez les souris *ob/ob* ou chez le rat *fa/fa* (animaux homozygotes n'exprimant pas la leptine par inactivation des gènes concernés) atteint d'une obésité morbide a permis d'identifier des formes monogéniques d'obésité [54].

Le premier à avoir cloné ce gène est Friedman en 1994, à partir d'ADN extrait d'adipocytes de la souris *ob/ob* qui présente un syndrome proche de l'obésité morbide humaine [5].

3.2. Promoteur

L'expression du gène de la leptine est sous la dépendance de son promoteur qui présente plusieurs sites de régulation. Cette régulation est fonction de la masse grasse et de différentes hormones comme l'insuline et les glucocorticoïdes [10].

3.3. Récepteurs

Les récepteurs de la leptine (*Ob-R*) sont ubiquitaires. Ils sont particulièrement nombreux au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Ils appartiennent à la famille des récepteurs transmembranaires des cytokines. Le domaine extra-cellulaire d'*Ob-R* est constitué de 816 acides aminés et contient deux domaines de liaison. Le domaine intra-cellulaire peut être court ou long et une forme soluble a été mise en évidence. Il existe six isoformes de ce récepteur, dont la fonction n'a pas encore été élucidée [54]

Le récepteur avec un domaine intra-cellulaire long (302 acides aminés) possède une voie de signalisation mettant en œuvre les protéines tyrosine-kinases de la famille des JAK (Just Another Kinase) et la famille de transcription de la famille des STAT (Signal Transducteur et Activateur de la Transcription). Ce récepteur est exprimé surtout dans l'hypothalamus [10, 54]. Le récepteur avec un domaine intra-cellulaire court (32 à 40 acides aminés) est présent dans le système nerveux central au niveau des plexus choroïdiens et serait responsable du transport de la leptine à travers la barrière neuro-méningée vers le système nerveux central. D'autres mettent en jeu les enzymes de la famille des MAPK (Mitogene Activated Protein kinase) qui sont impliquées dans la multiplication et la différenciation cellulaire [54].

3.4. Régulation

L'apport de nutriments diminue la transcription du gène de façon rapide alors qu'une période de jeûne augmente cette dernière. Il existe aussi un effet des glucocorticoïdes et de l'insuline sur la production de l'ARN messager et de protéine de la leptine [54].

Chez la souris, l'injection intracérébrale de leptine au niveau du troisième ventricule ou du ventricule latéral produit une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids. Ceci confirme un effet direct central de la leptine [54].

4. Mode d'action de la leptine

La leptine agit sur l'homéostasie générale (Fig.1) au niveau de l'hypothalamus, régulateur des centres de la satiété et de la faim, et ce par un mécanisme de "rétrocontrôle". En effet, la leptine est inhibitrice de l'expression du gène codant pour le neuropeptide Y (NPY) puissant stimulateur de l'appétit [29]. Ce dernier stimule, chez les rongeurs et les ruminants, la prise alimentaire et inhibe la sécrétion de GnRH. Sa concentration augmente nettement dans le liquide céphalo-rachidien lors de

sous-nutrition. Cette augmentation est susceptible de bloquer la libération de la GnRH [34], diminue la thermogénèse, augmente l'insulinémie et augmente la cortisolémie par l'intermédiaire des récepteurs β_3 adrénergiques du Système Nerveux Sympathique. La leptine provoque donc une réduction de la prise alimentaire, une augmentation de la thermogénèse et une augmentation du métabolisme basal ce qui conduit à une perte de poids corporel [5, 27, 46].

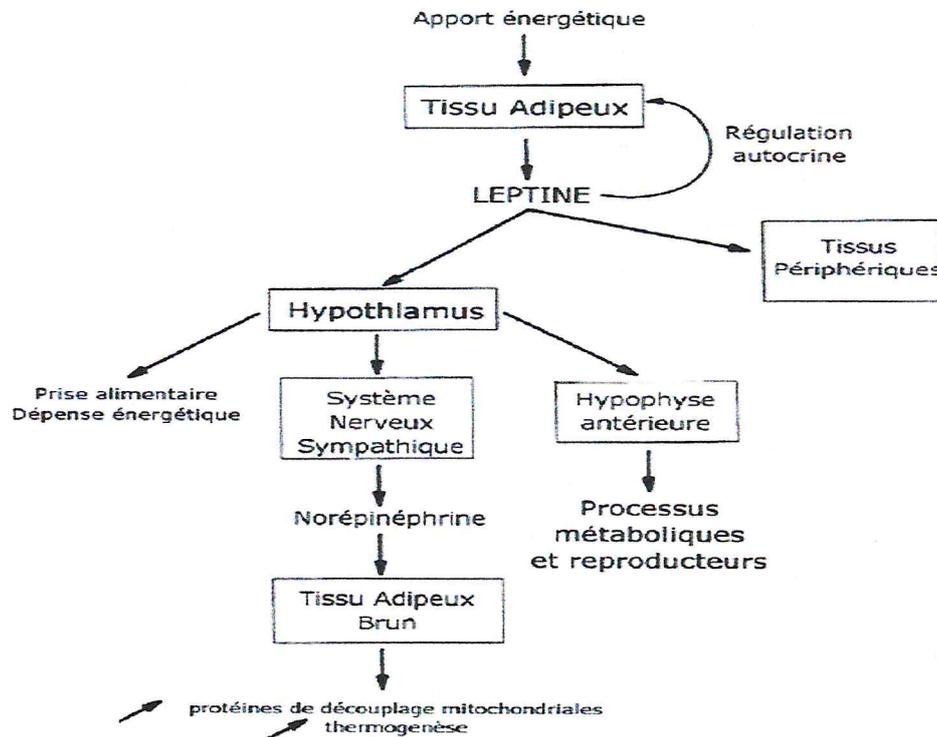


Figure 1 : Mode d'action de la leptine [46].

4.1. Leptine et prise alimentaire

Le rôle de la leptine le plus étudié chez les mammifères concerne la régulation de la prise alimentaire (fig. 2). Chez l'Homme et les rongeurs, l'hyperphagie peut être un symptôme de déficience en leptine ou d'une défaillance de la voie de signalisation de cette hormone.

La sécrétion de la leptine par les adipocytes est principalement régulée par la quantité de masse adipeuse [66]. Le taux de la leptine plasmatique augmente avec la masse corporelle (et la masse adipeuse) et baisse lors d'une perte de poids chez un animal donné [12, 21, 33, 57, 58, 67, 73].

La prise alimentaire stimule la sécrétion de la leptine pendant 3 à 4 heures [79, 55]. Cependant, le type d'alimentation ne semble pas avoir d'effet à court terme [2]. L'action de la leptine à très court terme est une diminution de la prise alimentaire ; c'est plus tard que l'on observe des effets métaboliques sur la glycémie, l'insulinémie et la noradrénaline. Les effets de la leptine sur la

régulation de l'expression des gènes du NPY, de la Pro Opio Mélano Cortine et du CRH sont tardifs : ce n'est qu'après quelques semaines que l'on observe un changement sur la composition corporelle et le poids [5].

4.2. Leptine et insuline

Que ce soit chez des sujets minces, obèses ou diabétiques, la leptine ne varie pas en période *post prandiale* et ne semble pas stimulable par une sécrétion aiguë d'insuline (pas de réponse en hyperglycémie provoquée). Toutefois, 72 heures d'hyperinsulinisme entraînent une augmentation de leptinémie dans les 24 dernières heures (Fig. 2). On sait bien maintenant que les glucocorticoïdes et la glycémie régulent la sécrétion de leptine [5]. Enfin, la synthèse de leptine augmente en réponse aux infections aiguës et à la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1, le TNF α et le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) [40, 50, 65, 70, 80, 83].

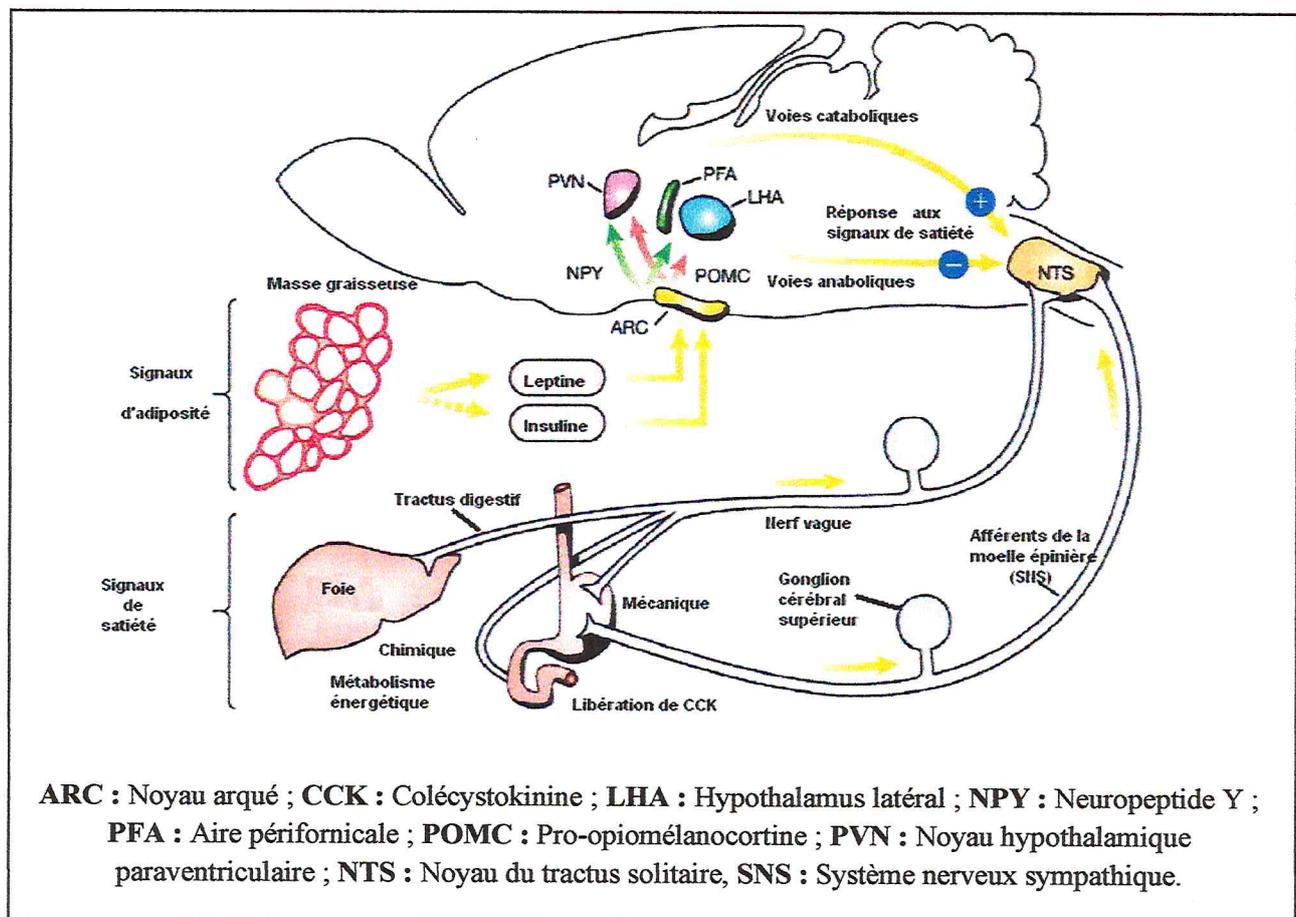


Figure 2 : Effet de la leptine et de l'insuline sur les centres régulateurs de la prise alimentaire et la dépense énergétique [71].

4.3. Leptine et thyroïde

L'administration de leptine atténue la diminution de TSH induite par le jeûne chez la souris [5].

4.4. Leptine et hormones gonadiques

La leptine atténue les chutes de LH et de Testostérone induites par le jeûne chez le mâle et empêche le retard d'ovulation induit par le jeûne chez la femelle. Les souris *ob/ob* dépourvues de leptine sont stériles ; cette anomalie est corrigée par l'injection de leptine [5]. La sécrétion de leptine est inhibée par la testostérone alors qu'elle est augmentée par les œstrogènes [16, 28].

Les études sur son mode d'action et sur ses récepteurs ont permis d'établir qu'elle agit aussi bien sur l'hypothalamus où elle règle la sécrétion pulsatile de la LH-RH et module sa sensibilité à l'oestradiol, sur l'hypophyse où elle module la sécrétion des gonadotropines que directement sur les gonades (Fig.3) [10, 27].

4.5. Leptine et hormones surrénaliennes

Chez la souris, l'administration de leptine atténue l'augmentation de l'ACTH et de la corticostérone induite par le jeûne. Le traitement aux **glucocorticoïdes** entraîne une augmentation rapide et dose-dépendante des ARNm codant pour la leptine dans le tissu adipeux blanc [25].

4.6. Leptine et tissu vasculaire

A la suite de la découverte de la leptine, la question s'est posée de savoir si le développement du lit vasculaire du tissu adipeux pouvait être lié au nombre et à la taille des adipocytes et donc si la leptine pouvait avoir un rôle directement angiogénique [22]. La leptine exerce un effet angiogénique *in vitro* et *in vivo* (effet angiogénique sur la cornée de rat et angiogénèse sur la membrane chorioallantoïdienne). Elle a comme particularité d'entraîner une fenestration des capillaires dans les sites de production. Elle agit de façon synergétique avec le VEGF et le FGF2 [8, 62].

4.7. Autres facteurs

A l'inverse de l'insuline, une exposition au froid (+4°C) de 24 heures engendre une diminution de la leptine circulante [40]. Cette diminution est liée à la stimulation du système sympathique. En effet, l'administration de noradrénaline à des animaux laissés à température ambiante engendre une diminution rapide et importante de la sécrétion de la leptine [80]. On retrouve cette suppression de l'expression du gène *ob* chez l'homme suite à un traitement à base d'adrénaline [15].

Enfin, les cytokines (Tumor-Necrosis-Factor ; IL-1, InterLeukine-1) modulent positivement la sécrétion de leptine par les adipocytes [49].

Chapitre II : **Leptine et reproduction**

1. Régulation par la leptine de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

1.1. Leptine et puberté

L'activité endocrine des gonades, qui commence à la puberté, est placée sous le contrôle de l'axe hypothalamo-adéno-hypophysaire (Fig. 3). Elle permet le développement des caractères sexuels secondaires et comportementaux. Les facteurs de déclenchement de la puberté sont encore mal connus. La nutrition joue un rôle puisque l'âge d'apparition de la puberté est retardé en cas de mal nutrition [66].

Chez beaucoup d'espèces, le démarrage de la puberté est lié beaucoup plus au stade de développement, au poids vif, à la composition corporelle qu'à l'âge de l'animal. Des corrélations étroites ont en effet été établies entre fertilité et quantité de tissu adipeux périphérique. Ses effets sont à mettre en relation avec les observations courantes que :

- la puberté est plus précoce chez les femelles (dont le tissu adipeux se développe plus précocement) que chez le male.
- la première menstruation chez la femme va de pair avec l'acquisition d'une adiposité suffisante.

Même si le signal déclenchant la puberté reste inconnu, il aboutit à une chute de la sensibilité du rétrocontrôle négatif de l'œstradiol sur l'axe hypothalamus-hypophysaire et à une augmentation de la fréquence des pulses de GnRH, donc de LH, ainsi qu'au développement de follicules oestrogéniques chez la femelle. Dans toutes les espèces, une sous-nutrition chez le jeune aboutit à un ralentissement de croissance et à un retard dans le déclenchement de la puberté [35]. Les facteurs impliqués dans les interactions nutrition / reproduction sont les facteurs de croissance, l'insuline, le glucose et la leptine [35].

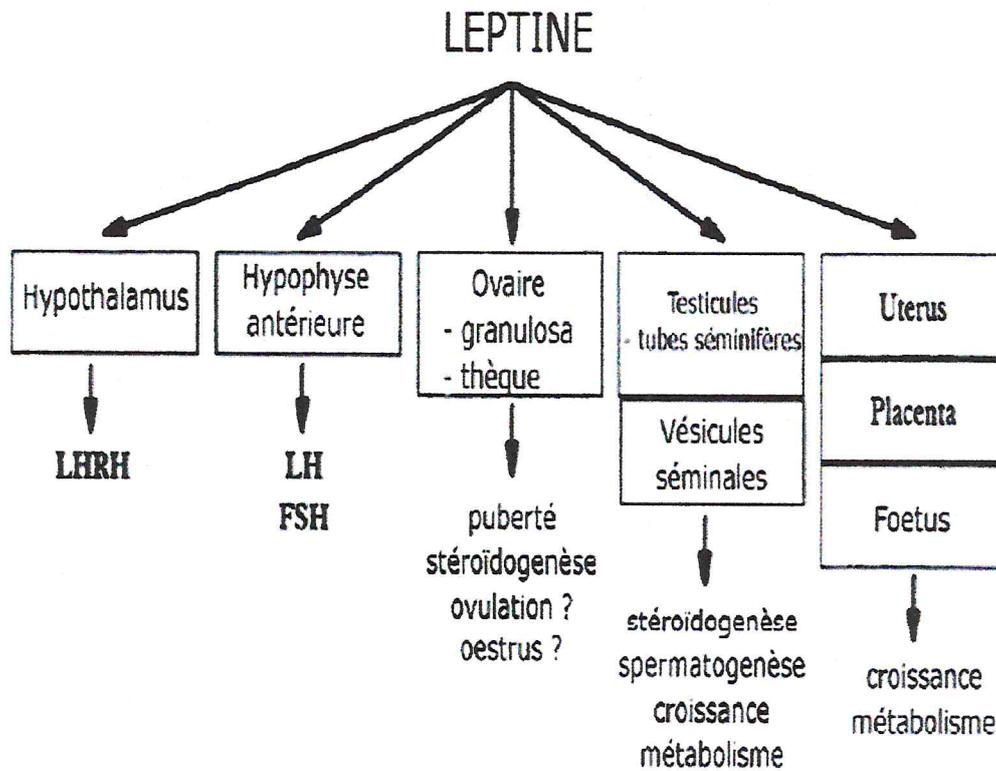


Figure 3 : Schéma général des effets de la leptine sur la fonction de reproduction [46].

En effet, depuis le début des années 1990, il a été mis en évidence l'importance de l'intervention de la leptine selon un rythme pulsatile et circadien [66]. Outre son action directe au niveau des cellules gonadotropes de l'hypophyse et des gonades, la leptine peut également agir directement au niveau de l'hypothalamus (plus spécifiquement sur les neurones du noyau arqué) pour stimuler la sécrétion de GnRH. Cette augmentation des taux de GnRH induite par la leptine peut stimuler la sécrétion d'hormones lutéinisante (LH) et folliculostimulante (FSH) par l'adénohypophyse et ainsi influencer l'ovulation ou la spermatogénèse (Fig.4).

Des injections de leptine à des souris *ob/ob* provoquent non seulement une perte de poids mais également une reprise de la cyclicité. Rappelons que les souris *ob/ob* sont stériles avec un hypogonadisme [35].

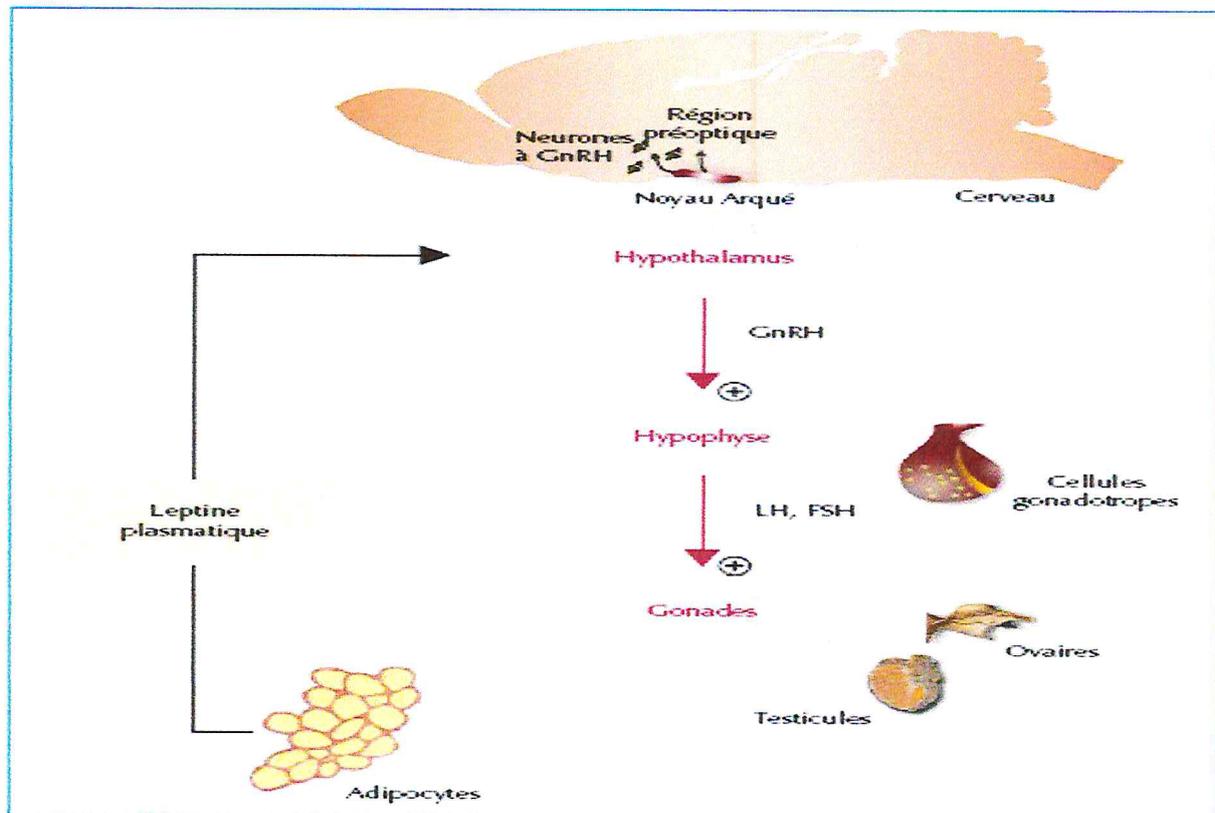


Figure 4 : Régulation par la leptine de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique lorsque les conditions nutritionnelles et métaboliques sont adéquates [9].

Chez les rongeurs [20], les concentrations plasmatiques de leptine augmentent à la puberté. La leptine semble rendre possible la sécrétion pulsatile de GnRH au niveau de l'hypothalamus. À la puberté, la concentration de récepteurs solubles diminue ce qui augmente la biodisponibilité à la leptine sans augmenter sa synthèse [59]. Mais la leptine seule n'est pas capable d'induire la puberté ; une infusion de leptine chez des primates de 5 ans n'induit pas de puberté [4]. La leptine apparaît comme un facteur permissif plus que déclencheur. Elle serait le signal métabolique nécessaire au déclenchement de la puberté.

A noter par ailleurs que le stress entraîne l'activation de la fonction corticotrope qui induit une inhibition des sécrétions gonadotropes. Les corticoïdes inhibent les sécrétions hypophysaires : GH, LH et ACTH [35].

1.2. Leptine et saisonnalité

Depuis sa découverte en 1994, le nombre de publications sur le sujet n'a pas cessé de croître, et les premières publications concernant les équidés datent du début des années 2000 [11,32].

Les concentrations plasmatiques de leptine sont significativement corrélées chez les équidés, avec la note de l'état corporel [11]. La sécrétion de leptine est abaissée de 6.0 ng/ml à 2.4 ng/ml chez des juments traitées par un agoniste adrénergique, le clenbuterol pendant environ un mois [61].

La précocité de l'œstrus saisonnier observée chez les jeunes juments serait liée à des taux faibles de leptine dans le plasma sanguin [32]. Mais l'injection par voie veineuse de leptine n'a aucun effet ni sur la prise alimentaire ni sur la fonction de reproduction. Dans le sang, la leptine est effectivement liée à des protéines spécifiques de transport « Serum Leptin Interactive Proteins » (SLIP), de haute affinité [19] et ses concentrations plasmatiques évaluées par dosage radioimmunologique (RIA), ne sont pas un bon indicateur de son efficacité au niveau central. La leptine circulante est reconnue par des récepteurs spécifiques de la barrière hémato-encéphalique qui permettent le passage actif de la leptine du sang vers le système nerveux central en liaison avec la saison [1].

La leptine semble être impliquée dans la reprise de l'activité ovarienne chez la jument. Il semble que les juments à activité ovarienne continue ont des leptinémies plus élevées que celles ayant un œstrus hivernal [31]. Inversement, les juments plus âgées et plus grasses ont plus facilement des œstrus en hiver que les juments jeunes et maigres [32] ; or la leptinémie est plus élevée chez les juments plus grasses et plus vieilles.

De même, on a pu montrer que, chez des juments lusitaniennes, la transition entre la période d'activité ovarienne et l'œstrus est précédé d'une chute de la leptinémie [17].

En revanche, en 2006, une étude de Waller a montré que chez des juments très grasses (avec des indices de masse corporelle entre 6,0 et 8,5), le fait d'avoir des leptinémies basses (inférieures à 5 ng/ml) ou élevées (supérieures à 10 ng/ml) ne modifiait pas la date de première ovulation. Cela ne modifie pas non plus la durée de l'anoestrus saisonnier, ni les profils de LH, de FSH et de progestérone. L'auteur estime donc que les perturbations de la leptinémie chez les juments grasses ne modifient pas l'activité ovarienne au moins pendant l'hiver et la période de transition (période pendant laquelle l'étude a été réalisée).

On a également montré que la mélatonine intervenait dans le déterminisme de l'anoestrus saisonnier. Néanmoins, ce signal est modifié par les concentrations plasmatiques de leptine [32].

Au printemps, la concentration plasmatique de leptine des juments est plus élevée quand les juments sont cyclées que lorsqu'elles sont en anœstrus [31].

Ce phénomène a également été observé pour d'autres espèces. La reprise de l'activité ovarienne semble nécessiter une valeur seuil de leptinémie. La leptine serait le signal pour le système neuroendocrinien qui inhiberait l'activité sexuelle en cas de manque de réserve. Chez le mouton [1] et le hamster [26] les mêmes conclusions ont été obtenues.

Chez la brebis, les variations de la leptinémie dues à la photopériode pourraient jouer un rôle dans l'adaptation aux contraintes environnementales : en jours courts, une faible leptinémie basale pourrait accroître la sensibilité de l'animal à une diminution des ressources alimentaires, qui abaisserait la leptinémie au-delà d'un seuil critique pour la reproduction [7].

2. Leptine et gonades

2.1. Leptine et ovaire

Le taux circulant de leptine est diminué par une réduction de la prise alimentaire, et ceci est dû, en partie à la baisse de l'insulinémie. Cette hypo-leptinémie pourrait constituer le signal informant l'organisme d'un état de sous nutrition. La leptine pourrait être un signal métabolique, dont la diminution stimulerait l'appétit et diminuerait la dépense énergétique, tout en inhibant la reproduction [7, 24]

Liefers *et al.* (2003) ont suggéré que la leptine pouvait servir de signal métabolique au système reproducteur via une action directe sur l'ovaire. Les auteurs ont en effet montré que les récepteurs à la leptine étaient exprimés dans les ovaires bovins et plus particulièrement dans les follicules quelle que soit leur taille [75]. Par contre, les corps jaunes ne présentent pas ces récepteurs [7].

La leptine aurait également un effet local dans l'ovaire, en régulant la taille des follicules et certainement la qualité des ovocytes [64]. Toutefois, le rôle de la leptine dans le fonctionnement ovarien est complexe et doit être précisé chez les ruminants [7].

L'injection de leptine à des souris femelles *ob/ob*, qui ont un déficit congénital en leptine et sont infertiles, augmente le taux de gonadotropines circulantes, induit un développement folliculaire ovarien normal et restaure la fertilité [18].

Chez plusieurs espèces animales, il semble que la leptine constitue un signal nécessaire au système nerveux central pour déclencher, en fonction de l'état des réserves adipeuses, la puberté et les premières ovulations chez les jeunes.

In vitro, la leptine induit une libération de la LH à partir d'explants de complexes hypothalamo-infundibulaires et de cultures de cellules hypophysaires [84], et exerce un effet direct sur la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa et de thèque [74].

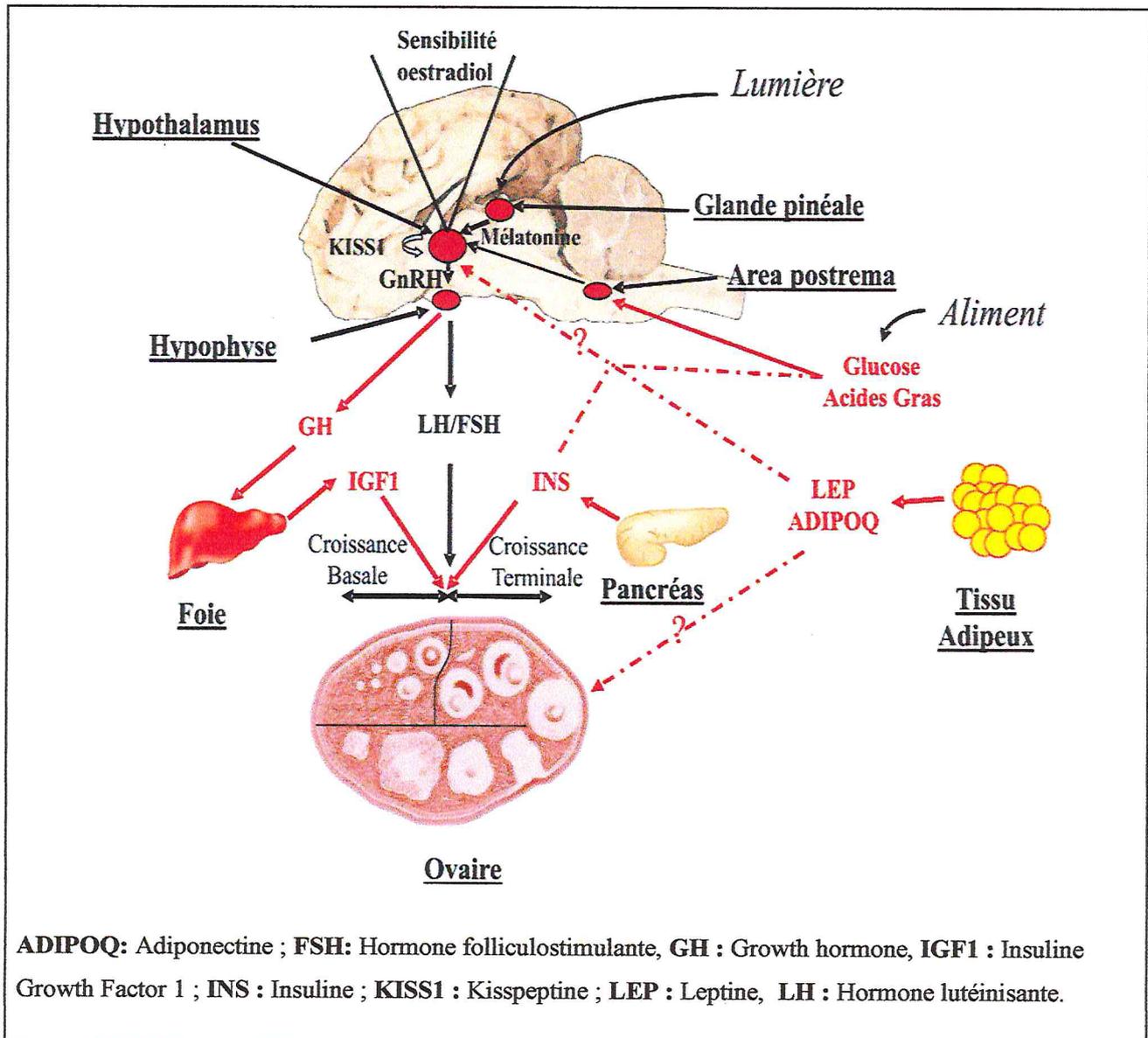


Figure 5 : Implications des facteurs endocriniens, nutritionnels et saisonniers dans la régulation des fonctions ovariennes [63].

2.2. Leptine et testicule

Le récepteur de la leptine *Ob-R* est mis en évidence dans les testicules, au niveau des cellules spermatiques de souris et dans les cellules de Leydig. Le passage de la leptine de la circulation sanguine vers le testicule est possible grâce à un transport passif insaturable [44].

Dans des cultures primaires de cellules de Leydig de rats adultes et des lignées de cellules de Leydig tumorales, la leptine exerce une inhibition rapide et dose dépendante sur la production de testostérone, stimulée par la LH [14]. La diminution de sécrétion de la testostérone après stimulation par l'hCG s'accompagne en parallèle d'une diminution du taux d'androsténédione et d'une augmentation des métabolites précurseurs de la 17-OH progestérone, de la progestérone et de la pregnolone, ce qui est comparable avec des lésions de lyse leptine-induite [14]. D'autres études révèlent que la leptine inhibe la sécrétion de testostérone dans des coupes des testicules de rat adulte, mais ce résultat n'est pas retrouvé avec des testicules de rats prépubères [77]. Ces observations indiquent que la leptine a le potentiel de moduler le réseau paracrine qui contrôle la production des stéroïdes sexuels par stimulation des gonadotrophines dans les testicules [36] de la même manière que dans les ovaires.

L'effet inhibiteur de la leptine sur la production de testostérone apparaît à des concentrations comprises dans la gamme de leptinémie mesurée chez les hommes obèses : ils présentent des taux élevés de leptine dans le sang et des taux faibles d'androgènes [76]. Il semble que cette diminution des concentrations en androgènes soit corrélée avec l'augmentation de la masse graisseuse et du taux de leptine [81].

Chapitre III :

Description, alimentation et reproduction du rat Wistar

1. Historique

Le rat de laboratoire ou de compagnie, *Rattus norvegicus*, est un rongeur de la famille des Muridés. Son ancêtre, le rat sauvage, est originaire d'Asie centrale. Malgré son nom, il n'a pas d'origine norvégienne. Il s'est propagé en Europe, à partir du Moyen-âge, le long des routes commerciales et militaires. Il a également envahi les différents continents en s'introduisant sur les bateaux [6, 30, 41, 53].

C'est seulement au milieu du XIX^{ème} siècle qu'on a commencé à élever le rat en captivité à des fins expérimentales, d'abord en Europe puis aux Etats-Unis. Les laboratoires américains auraient commencé à utiliser le rat albinos après la visite d'un scientifique allemand, Adolf Meyer en 1890. Le plus célèbre de ces laboratoires est l'institut Wistar de Philadelphie qui a donné son nom à une souche albinos sélectionnée au sein de cet institut [53, 68].

2. Description

Le rat *Wistar* dérive d'une souche non consanguine qui est produite à partir de deux grandes colonies où les accouplements se font au hasard entre mâles et femelles non apparentés (c'est-à-dire n'appartenant pas à la même lignée), de façon à minimiser la consanguinité [68, 86, 88].

Ces souches sont considérées comme génétiquement hétérogènes. Parmi ces souches, on trouve le **Sprague-Dawley**, le **Wistar** et le **Long Evans**. Le wistar est un rat blanc albinos avec une tête plus large et une queue plus courte que le corps [37,41, 47, 53, 60].

3. Comportement

Les rats sont des animaux dociles et faciles à manipuler surtout si on les habitue dès leur plus jeune âge. Cependant, il peut arriver qu'ils mordent si on les surprend ou si on les manipule rudement. Ils ont un caractère prudent mais curieux. Ainsi peuvent-ils parfois sortir de leur cage mais ils y retournent vite après une courte période d'exploration. Leur intelligence et leur mémoire en font des animaux de compagnie très faciles à dresser et la richesse de leur répertoire comportemental les rend particulièrement intéressants et attachants. Entre eux, ils sont en général peu agressifs et sociables.

On peut donc les élever en groupe sans problème, à condition qu'il n'y ait pas de surpopulation. Même les mâles s'entendent bien mais il faut veiller à séparer les femelles allaitant une portée car elles sont souvent agressives envers leurs congénères. D'autre part, on peut observer du cannibalisme des adultes sur les jeunes [47, 53, 88].

4. Alimentation

Le rat est omnivore. Pour 100 g de poids vif, il consomme environ 5 à 6 g de nourriture et boit 10 ml d'eau par jour. En outre, il est cæcotrophe c'est-à-dire qu'il ingère ses excréments afin de pouvoir digérer complètement la cellulose. En laboratoire, l'alimentation est standardisée et on utilise des régimes complets commercialisés par les grands groupes d'alimentation animale (Fig. 6). Ces régimes sont composés principalement d'une source de protéines, (la caséine ou poudre de lait écrémé), d'une source de glucides (qui représentent plus de 60% de la ration) sous forme de saccharose ou d'amidon de maïs et enfin de minéraux et vitamines en plus faibles quantités [41, 47, 69, 72]. (Fig. 6).



Figure 6 : Aliment pour rat.

5. Reproduction

5.1. Maturité sexuelle

- Chez le mâle

Les mâles atteignent leur maturité sexuelle entre 65 et 110 jours [41], c'est à-dire entre 2 et 4 mois environ, quand les mâles pèsent au moins 300 grammes et la reproduction cesse vers 12-18 mois [88]. Le mode de reproduction est le plus souvent monogame. Dans ce cas un mâle et une femelle sont élevés dans la même cage et on enlève chaque portée après le sevrage [6, 47].

▪ Chez la femelle

Les femelles aussi atteignent leur maturité sexuelle entre 65 et 110 jours [41], quand les femelles pèsent au moins 250 g et la reproduction cesse vers 12-18 mois [88].

5.2. Âge conseillé à la reproduction

Selon Hafez (1970), l'âge de la puberté chez la ratte est de 42 jours plus ou moins 7 jours mais la rate ne devient apte à la reproduction qu'à l'âge de 65 jours.

5.3. Durée de la gestation

La durée de gestation est de 21 à 23 jours mais peut être rallongée de 3 à 7 jours si la femelle allaite encore une portée précédente pendant la gestation [47, 88].

5.4. Nombre moyen de petits par portée

Les portées comprennent 6 à 12 petits environ car il existe des variations en fonction des souches et de l'âge des parents. Les petits naissent aveugles et sans poils dans le nid préparé par la mère. Ils sont sevrés à l'âge de 21 jours. [88].

5.5. Cycle œstral

Le cycle œstral de la femelle dure 4 à 5 jours et l'ovulation est spontanée. L'œstrus *post-partum* est fécond [47, 88].

La muqueuse vaginale se renouvelle à chaque cycle oestrien. Les modifications tissulaires reflètent les variations cycliques de l'activité de l'ovaire chez la rate. L'état de la muqueuse vaginale est apprécié à partir de l'examen des frottis de la muqueuse qui représente chez cette espèce une technique de choix pour apprécier le moment du cycle [35].

Au début de la phase folliculaire, la muqueuse ne comprend que quelques assises cellulaires. Par suite des divisions cellulaires sous l'action de l'oestradiol, cette muqueuse s'épaissit. Les cellules des assises superficielles (*stratum granulosum*) se kératinisent au stade proestrus. Sous l'influence de la progestérone, les divisions cessent, le *stratum mucosum* se détache mettant à nu le *stratum granulosum*. Les cellules kératinisées deviennent superficielles et desquament au stade oestrus. Les leucocytes envahissent la lumière vaginale et détruisent les cellules kératinisées [35].

Par conséquent, la composition cellulaire du frottis témoigne du stade du cycle (Fig. 7).

- Stade dioestrus : Présence de leucocytes en très grand nombre
- Début du proestrus : Disparition des leucocytes, frottis composé seulement de cellules rondes nucléés (cellules épithéliales) qui proviennent du *stratum mucosum* qui se détache rapidement [35].
- Début oestrus : Présence de cellules kératinisées anuclées remplacent les cellules épithéliales après la décharge ovulante de LH/FSH. La présence des seules cellules kératinisées indique le début de l'acceptation du mâle qui débute au cours des dernières heures de la soirée du proestrus et persiste pendant les premières heures du jour de l'oestrus [35].
- Estrus : présence de cellules kératinisées en gros paquets
- Metooestrus : présence de cellules kératinisées et de leucocytes .Dès que quelques leucocytes apparaissent, au milieu des cellules kératinisées dans la matinée de l'oestrus, l'ovulation a eu lieu et les œufs sont toujours retrouvés dans les premières anses de l'ampoule tubaire [35].

C'est seulement chez la ratte que ces changements sont suffisamment tranchés pour permettre de reconnaître les périodes où ont eu lieu l'ovulation. Dans les frottis des autres espèces mammifères, il n'y a pas de populations cellulaires parfaitement homogènes pour identifier le stade du cycle. On peut observer une variation de la proportion des types cellulaires qui n'a qu'une valeur indicative grossière de l'activité ovarienne [35].

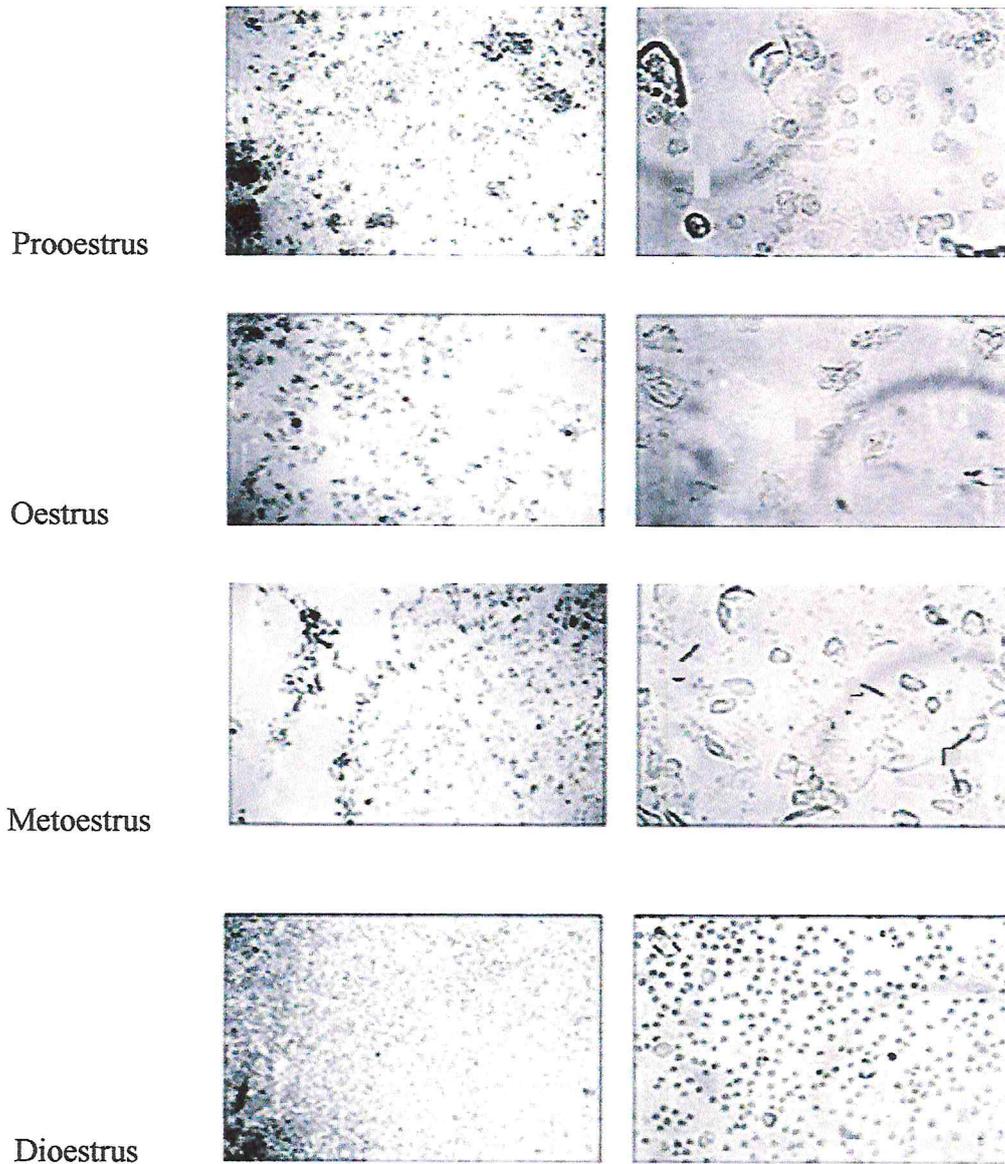


Figure 7 : Composition cellulaire du frottis vaginal de la rate au cours des différentes phases du cycle œstral [35].

Partie expérimentale

Partie I :

Etude préliminaire

1. Objectif

Chez beaucoup d'espèces, le démarrage de la puberté est lié beaucoup plus au stade de développement, au poids vif, à la composition corporelle qu'à l'âge de l'animal. La nutrition joue donc un rôle important puisque l'âge d'apparition de la puberté est retardé en cas de mal nutrition [66].

L'aliment granulé pour « Rats & Souris » retrouvé dans le commerce présente une faible valeur nutritive et ne permet pas d'atteindre un poids optimal à la puberté qui est d'environ 160 à 190 g pour la rate *Wistar* [42].

Le rat étant une espèce omnivore, un aliment pour « Chiens » sous forme de croquettes de consistance beaucoup plus dure que l'aliment pour « Rats et Souris », mais de meilleure valeur nutritive est testé.

L'objectif de cette étude préliminaire est de définir un aliment qui permet d'améliorer la courbe de croissance des animaux, par l'incorporation de croquettes à 26% de protéines à l'aliment de base (d'une valeur protéique inférieure à 15%) et ce afin de palier aux problèmes de poids corporel à l'âge de 60 jours.

2. Matériel & Méthodes

L'étude est réalisée sur trois rates de race *Wistar*, sevrées et âgées de 37 jours.

L'eau est distribuée *ad libitum*.

Deux aliments sont utilisés (Annexe A) :

- *Aliment A* : Il s'agit d'un aliment granulé destiné aux rats et aux souris. Sa valeur protéique est inférieure à 15 %.
- *Aliment B* : Il s'agit de croquettes pour chiens à 26% de protéines.

La quantité d'aliment distribuée aux rates est similaire et est égale à 40 g par jour :

- La rate 1 reçoit exclusivement l'aliment A.
- La rate 2 reçoit un mélange de l'aliment A à raison d'2/3 associé à 1/3 de l'aliment B.
- La rate 3 reçoit un mélange de l'aliment A à raison d'1/3 associé à 2/3 de l'aliment B.

Les animaux sont pesés chaque jour jusqu'à l'âge de 60 jours.

La quantité d'aliment ingéré ainsi que le volume d'eau pris sont retenus.

3. Résultats

3.1. Volume d'eau absorbé

Les résultats de la quantité d'eau prise sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : Résultats du volume d'eau absorbé (en ml) par les rates.

Âge (J)	Rate 1	Rate 2	Rate 3
37	20	10	15
38	25	10	20
39	15	10	15
40	12	12	20
41	18	18	20
42	20	15	20
43	20	20	20
44	20	15	30
45	25	25	20
46	20	15	25
47	15	10	20
48	15	15	20
49	20	15	20
50	20	20	20
51	15	10	20
52	20	25	30
53	30	30	25
54	25	25	20
55	15	20	15
56	15	15	20
57	25	25	25
58	30	25	30
59	20	20	25
60	25	25	30
Moyenne ± Ecart Type	19,59 ± 4,85	17,91 ± 5,99	21,87 ± 4,52

Le tableau I montre que la moyenne de la quantité d'eau prise par les rates est assez proche mais est légèrement plus élevée pour la rate 3.

3.2. Quantité d'aliment ingéré

Les résultats des quantités journalières d'aliment ingéré par les rates sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : Résultats des quantités d'aliment (en g) ingérés par les rates.

Âge (J)	Rate 1	Rate 2		Rate 3	
	Aliment A	Aliment A	Aliment B	Aliment A	Aliment B
36	09	03	05	04	04
37	12	10	00	12	01
38	11	09	01	10	03
39	11	08	02	11	04
40	14	11	02	09	04
41	12	13	01	06	08
42	09	11	02	04	10
43	09	18	01	13	03
44	13	12	03	13	04
45	11	12	02	10	10
46	12	11	03	08	13
47	12	12	02	06	15
48	10	11	03	07	07
49	14	12	03	07	09
50	12	12	04	06	10
51	13	13	06	04	13
52	15	12	04	09	03
53	13	10	02	12	02
54	11	09	03	12	01
56	14	12	06	07	10
57	12	15	05	05	12
58	13	15	01	05	13
59	13	17	05	05	12
60	12	15	07	10	04
Moyenne ± Ecart Type	11,95 ± 1,59	11,79 ± 2,99	3,04 ± 1,85	8,12 ± 2,96	7,29 ± 4,33
Total	11,95 ± 1,59	14,83 ± 3,65		15,41 ± 2,91	

On remarque que les quantités moyennes d'aliment prises par les rates 2 et 3 sont plus importantes comparées à la rate 1 nourrie exclusivement de l'aliment A.

3.3. Courbe de croissance

Les résultats de l'évolution du poids corporel des rates de l'étude préliminaires est présentée dans le tableau III et la figure 8.

Tableau III : Résultats de l'évolution du poids corporel des rates.

Âge	Rate 1	Rate 2	Rate 3
36	86	85	83
37	86	88	83
38	85	89	86
39	88	93	90
40	91	98	94
41	94	103	97
42	97	107	101
43	99	109	107
44	102	110	110
45	104	116	113
46	104	118	116
47	105	120	119
48	107	122	124
49	109	125	129
50	112	126	133
51	114	127	137
52	118	132	141
53	120	135	144
54	121	133	143
55	117	130	140
56	126	146	150
57	126	147	152
58	129	152	158
59	129	153	158
60	131	155	160

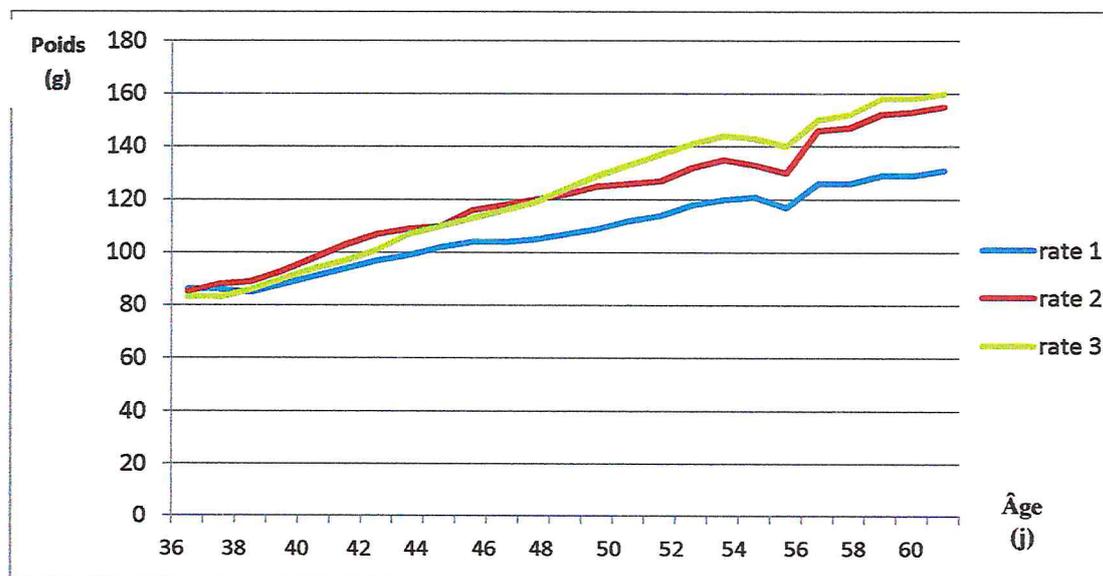


Figure 8 : Evolution du poids corporel des rates.

Le tableau III et la figure 8 montrent une nette amélioration de la courbe de croissance des rates 2 et 3 par rapport à la rate 1. La rate 3 ayant reçu un mélange de l'aliment A à raison d'1/3 associé à 2/3 de l'aliment B présente la meilleure courbe de croissance et le meilleur poids corporel final à l'âge de 60 jours qui est de 160 g.

4. Discussion

L'étude préliminaire a permis de tester un aliment sous forme de croquettes incorporées dans la ration des rates *Wistar*.

Il ressort de cette étude que l'incorporation d'un aliment à 26 % de protéines sous forme de croquettes dans la ration alimentaire de rates *Wistar* âgées de 37 jours a permis d'améliorer sensiblement l'ingestion des rates 2 et 3 par rapport à la rate 1 recevant exclusivement un aliment pour rat. Cela pourrait être expliqué par le fait que l'aliment B est beaucoup plus appétant et présente une meilleure qualité gustative comparé à l'aliment A.

Par ailleurs, l'étude des courbes de croissance a montré que l'incorporation de l'aliment B dans la ration alimentaire des rates 2 et 3 a permis d'améliorer leur courbe de croissance pour atteindre un poids corporel à l'âge de 60 jours de 155 g et 160 g respectivement, comparativement à la rate 1 dont le poids final était de 131 g .

Ces résultats seraient dus au fait que l'aliment B présente un meilleur apport énergétique et protéique et est enrichi en vitamines et oligoéléments (Annexe A) par rapport à l'aliment A. Ceci permet de subvenir aux besoins d'entretien des animaux tout en leur assurant une meilleure croissance. En effet, l'ingestion de protéines a un effet positif sur l'anabolisme musculaire *in vitro* [23] aussi bien qu'*in vivo* [87].

Il existe dans le commerce toute une panoplie d'aliments destinés aux carnivores, de valeurs nutritives très variées, avec un taux protéique atteignant les 35%. Le choix d'un aliment à 26% de protéines n'est pas aléatoire, il permet de corriger la formule alimentaire de l'aliment de base tout en évitant les risques de problèmes métaboliques engendrés par un aliment trop protéique [51].

Nos résultats ne nous permettent pas de nous prononcer sur le volume d'eau moyen absorbé par les rates qui paraît assez proche mais légèrement plus élevé pour la rate 3, probablement parce que cette dernière a consommé une quantité d'aliment plus importante que les deux autres.

5. Conclusion

L'étude préliminaire a montré que l'incorporation d'un aliment à 26% de protéines sous forme de croquettes à l'aliment de base permet d'améliorer la prise alimentaire des rates *Wistar*.

La formule alimentaire composée de l'association de l'aliment pour « Rats et Souris » et de croquettes pour « Chien » à 26% de protéines permet d'obtenir une courbe de croissance optimale et un poids corporel final idéal à l'âge de 60 jours. Cette distribution est par conséquent retenue pour l'étude expérimentale proprement dite.

Partie II :
Etude expérimentale proprement dite

1. Objectifs

La puberté et la fertilité sont étroitement régulées par la nutrition et la disponibilité en réserves énergétiques. Ainsi, les hormones adipocytaires comme la leptine tiennent une place centrale dans la mise en place et la régulation de la fonction de la reproduction [45].

L'objectif de cette partie de notre étude est d'évaluer l'effet de la leptine sur la prise alimentaire et hydrique, d'une part et d'étudier son effet sur le cycle œstral de rate *Wistar*, d'autre part.

2. Matériel & Méthodes

L'étude est réalisée au niveau du Laboratoire d'Endocrinologie de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.

2.1. Au niveau de l'animalerie

2.1.1. Animaux

L'étude est réalisée sur quatre rats femelles adultes de race *Wistar*, âgés de 37 jours et pesant entre 95 et 115 g.

Un biberon gradué d'une contenance de 250 ml est placé par cage.

L'aliment distribué est composé d' $\frac{2}{3}$ d'aliment A et de $\frac{1}{3}$ d'aliment B, à raison de 40 g par jour et par rate (Cf. Etude préliminaire).

Le volume d'eau pris, la quantité d'aliment ingéré (Annexe B) ainsi que le poids corporel sont mesurés quotidiennement.

2.1.2. Frottis vaginaux

Afin de mesurer l'influence de la leptine sur la durée du cycle œstral normalement de 4 à 5 jours chez la rate, des frottis vaginaux sont réalisés quotidiennement et à la même heure à 10 heures pendant 15 jours (3 cycles) sur quatre rates.

2.1.2.1. Matériel

- Becher.
- Eau physiologique.
- Nacl à 0,9 %.
- Compte-goutte.
- Gant de contention.
- Lames.

2.1.2.2. Technique de prélèvement

- Contentionner l'animal à l'aide d'un gant (Fig.9).
- Déposer quelques gouttes d'eau physiologique dans le vagin de la rate à l'aide d'un compte-goutte (Fig. 10).
- Patienter quelques secondes.
- Aspirer la solution injectée à l'aide du compte-goutte et la déposer sur une lame (Fig. 11).
- Acheminer au laboratoire.



Figure 9 : Contention de la rate



Figure 10 : Injection et aspiration du Nacl



Figure 11 : Dépôt de la goutte sur lame

2.2. Au niveau du laboratoire

Une fois au laboratoire, les lames peuvent être observées soit directement, ou après coloration après séchage à l'air libre ou dans une étuve.

2.2.1. Coloration au MGG (May-Grünwald Giemsa)

2.2.1.1. Matériel (Fig. 12)

- Colorant MGG (May-Grünwald Giemsa) (b)
- Bac de coloration (d)
- Des pipettes (c)
- Erlen meyer (a)
- Microscope optique (e)

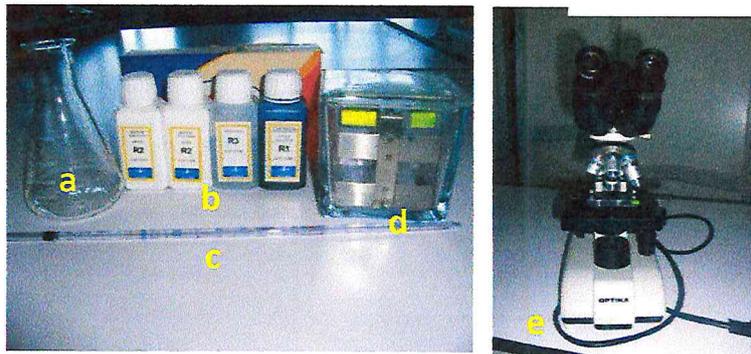


Figure 12 : KIT de coloration et d'observation

2.2.1.2. Principe de la coloration

Elle repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres et sur l'affinité des éléments cellulaires pour des colorants acides ou basiques.

Le May-Grünwald fixe le frottis par son méthanol et colore les éléments acidophiles et les granulations différenciées, spécifiques des leucocytes.

Le Giemsa sur-colore les noyaux et colore les granulations azurophiles.

2.2.1.3. Technique de la coloration

- Placer la lame sur un support horizontal situé au-dessus d'un bac de coloration.
- Déposer du méthanol pour fixer le frottis.
- Laisser agir pendant 5 minutes.
- Mettre les lames dans un bac de coloration contenant du Giemsa dilué au 5^{ème} et laisser agir pendant 45 minutes.
- Rincer la lame à l'eau courante pendant 30 secondes.

- Laisser sécher la lame en position inclinée à l'air ambiant ou dans l'étuve.
- Observer le frottis coloré à l'objectif 100 avec une goutte d'huile à immersion.

2.2.2. Injection de leptine et du Nacl 9%

A partir du 60^{ème} jour d'âge, les rates vont recevoir des injections quotidiennes de leptine pendant 4 jours. Les animaux sont pesés avant chaque injection et un frottis vaginal est réalisé.

2.2.2.1. Constitution des lots d'animaux

Les animaux sont repartis en deux lots (lot A et lot B) de deux rates (témoin et expérimentale) ; de façon que les animaux de chaque lot aient un poids corporel similaire :

- Lot 1 : Rate témoin (T1) + Rate expérimentale (E1)
- Lot 2 : Rate témoin (T2) + Rate expérimentale (E2)

2.2.2.2. Dose de leptine à injecter

Avant d'être utilisée, la leptine est diluée dans du Nacl à 9 %.

La dose à injecter est de : 8 µg / 100 g de poids vif.

2.2.2.3. Rythme des injections

Les injections sont réalisées quotidiennement, pendant 4 jours, à la même heure, par la même personne, par voie intra péritonéale (Fig. 13), après désinfection à l'aide d'alcool chirurgical :

- Injections de leptine diluée dans du Nacl à 9 % aux rates E1 et E2.
- Injections du même volume de la solution Nacl à 9 % aux femelles témoins T1 et T2.



Figure 13 : Injection intra péritonéale de leptine.

2.2.3. Sacrifice des animaux

Le sacrifice est réalisé par saignée (transfixion bilatérale des veines jugulaires et des artères carotides (Fig. 14).

Les rates T1 et E1 ont été sacrifiées à J61. Les rates T2 et E2 ont été gardées une semaine de plus que les rates E1 et T1. Elles ont été sacrifiées à 68 jours d'âge.



Figure 14 : Sacrifice des rates par transfixion bilatérale des veines jugulaires et des artères carotides.

2.2.4. Récupération des organes

Le tractus génital est retiré (Fig. 15,16, et 17). Les ovaires, les oviductes et les cornes utérines ainsi que le vagin sont pesés (Fig. 18).

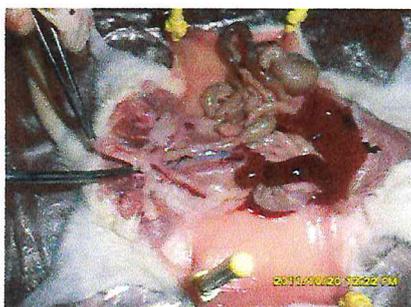


Figure 15 : Récupération du vagin.

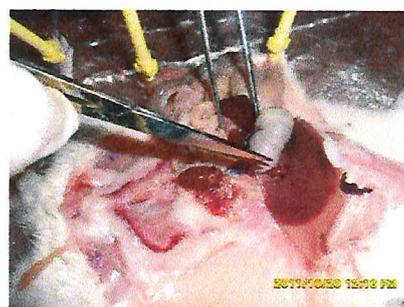


Figure 16 : Récupération des cornes utérines.



Figure 17 : Récupération des ovaires.



Figure 18 : Pesée des organes.

3. Résultats

Le nombre d'animaux de l'étude étant très réduit, les résultats n'ont pas pu être traités à l'aide d'un test statistique. Aussi, les résultats obtenus feront l'objet d'une simple comparaison entre les rates témoins et les rates ayant été traitées avec la leptine.

3.1. Volume d'eau absorbé

Les résultats des volumes d'eau absorbés par les rates au cours de l'étude expérimentale sont présentés dans les tableaux IV et V et illustrés dans les figures 19 et 20.

Tableau IV : Résultats du volume d'eau absorbé (en ml) par les rates T1 et E1 avant et pendant le traitement.

Âge (j)	T1	E1
37	20	25
38	25	30
39	20	25
40	20	25
41	20	35
42	25	30
43	25	30
44	30	30
45	30	30
46	25	30
47	25	25
48	30	30
49	30	30
50	20	32
51	25	25
52	30	30
53	25	25
54	20	25
55	25	30
56	30	25
57	20	20
58	35	30
59	30	35
60	35	40
61	25	25

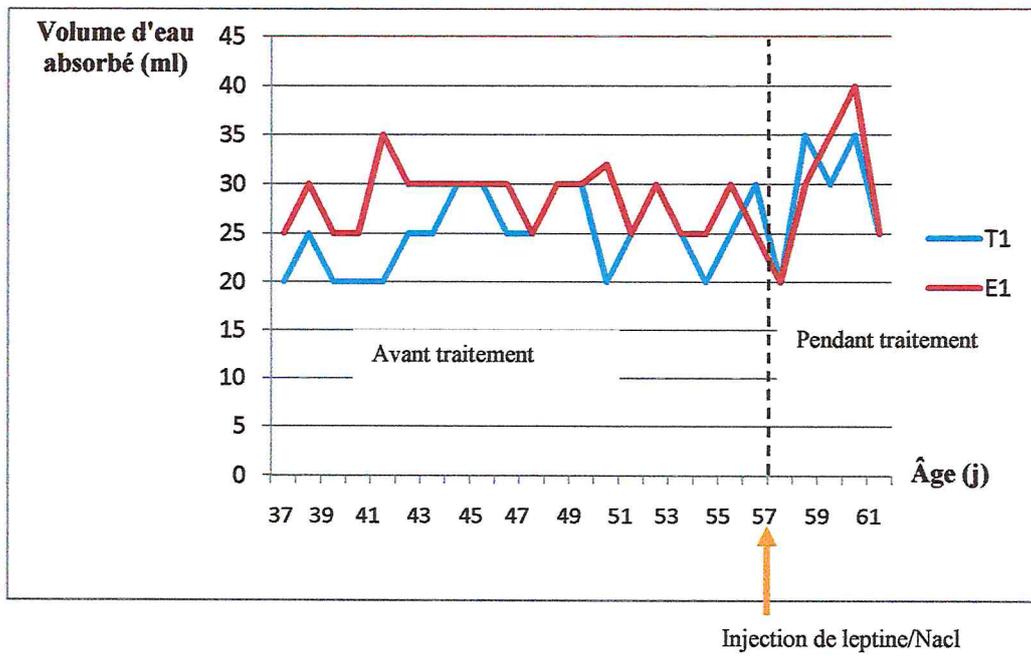


Figure 19: Volume d'eau absorbé par les rates T1 et E1
avant et pendant traitement

Tableau V : Résultats du volume d'eau absorbé par les rates T2 et E2 avant et pendant le traitement.

Âge (j)	T2	E2
37	25	35
38	25	35
39	14	25
40	20	29
41	16	36
42	20	30
43	20	30
44	20	40
45	15	25
46	20	35
47	20	30
48	25	40
49	20	32
50	23	35
51	20	30
52	25	40
53	25	35
54	20	30
55	15	25
56	25	40
57	25	40
58	30	35
59	20	35
60	25	30
61	15	25
62	20	35
63	20	30
64	20	35
65	20	30
66	15	25
67	20	15
68	20	30

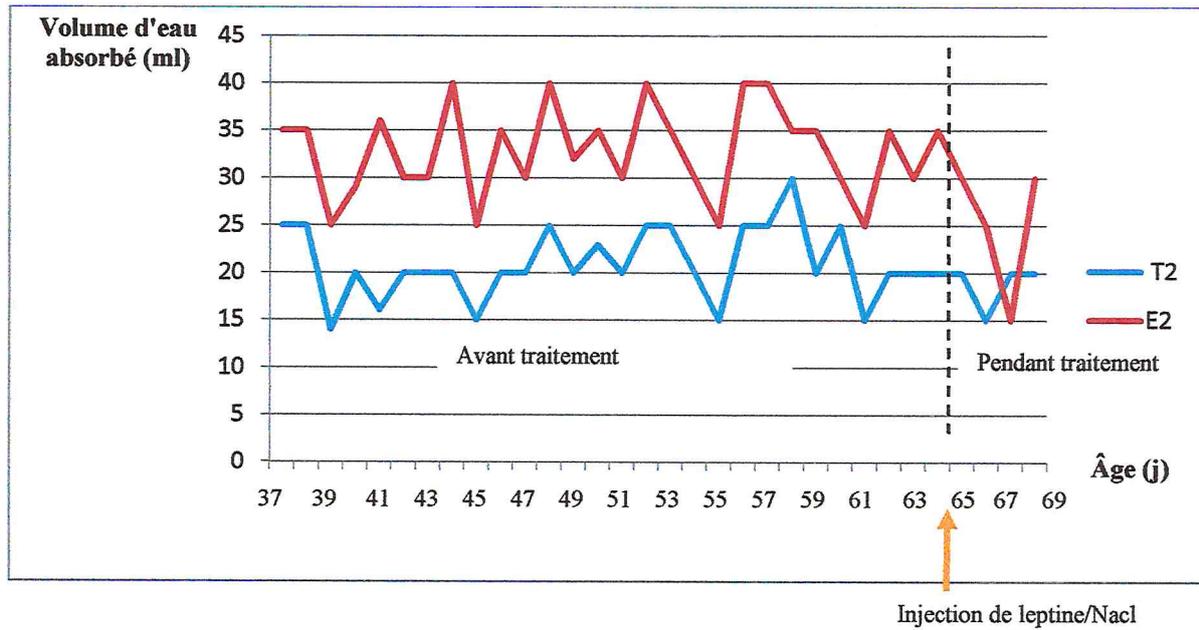


Figure 20: Volume d'eau absorbé par les rates T2 et E2 avant et pendant traitement.

Les figures 19 et 20 montrent que les rates ayant été traitées avec la leptine ont consommé plus d'eau que les rates témoins.

3.2. Quantité d'aliment ingérée

Les quantités d'aliments ingérées par les rates de notre étude avant et pendant le traitement à la leptine sont présentées dans le tableau VI et VII et illustrées dans les figures 21 et 22.

Tableau VI : Résultats de la quantité d'aliment ingérée (g) par les rates T1 et E1.

Âge (Jours)	T1		E1	
	Aliment A	Aliment B	Aliment A	Aliment B
37	09	05	10	04
38	08	04	12	05
39	11	03	11	05
40	12	04	10	05
41	13	03	12	06
42	12	02	11	06
43	14	01	13	04
44	15	03	14	07
45	14	02	13	06
46	13	03	14	04
47	12	05	12	06
48	13	06	11	09
49	10	06	09	06
50	14	04	12	07
51	10	08	09	07
52	10	09	09	11
53	11	07	12	09
54	13	05	11	04
55	12	08	11	05
56	10	09	08	10
57	09	03	09	02
58	15	07	10	09
59	15	06	08	11
60	15	08	07	13
61	14	02	10	06

Tableau I : Résultats du volume d'eau absorbé (en ml) par les rates.....	22
Tableau II : Résultats des quantités d'aliment (en g) ingérés par les rates	23
Tableau III : Résultats de l'évolution du poids corporel des rates	24
Tableau IV : Résultats du volume d'eau absorbé (en ml) par les rates T1 et E1 avant et pendant le traitement	32
Tableau V : Résultats du volume d'eau absorbé par les rates T2 et E2 avant et pendant le traitement	34
Tableau VI : Résultats de la quantité d'aliment ingérée (g) par les rates T1 et E1	36
Tableau VII : Résultats de la quantité d'aliment ingérée (en g) par les rates T2 et E2 avant et pendant la période de traitement.....	38
Tableau VIII : Résultats de l'évolution du poids corporel des rates T1 et E1 avant et pendant traitement	40
Tableau IX : Résultats de l'évolution du poids corporel des rates T2 et E2 avant et pendant traitement.....	42
Tableau X : Gain pondéral des rates après la période de traitement	43
Tableau XI : Résultats des poids des organes (en grammes) du tractus génital des rates T1 et E1	46

Introduction

La fertilité est étroitement régulée par la nutrition et la disponibilité des réserves énergétiques. Ainsi, les hormones adipocytaires comme la leptine tiennent une place centrale dans la mise en place et la régulation de la fonction de la reproduction [9].

La leptine, découverte en 1994, comme produit du gène d'obésité *ob* chez la souris [82], apparaît comme une hormone clé pour renseigner le cerveau sur l'état des réserves énergétiques et ainsi sur leur compatibilité avec la menée à terme d'une gestation et d'une lactation ultérieure [9].

La littérature scientifique ne manque pas de références sur cette hormone et ce document a pour objectif de présenter une synthèse bibliographique sur la leptine, axée principalement sur les particularités et le métabolisme de cette hormone ainsi que son rôle dans divers aspect de la reproduction (puberté, saisonnalité, gonades : ovaire et testicule).

Une partie expérimentale est réalisée sur des rates *Wistar* afin de mieux cerner les effets de la leptine sur la prise alimentaire et le déroulement du cycle œstral.

Partie bibliographique

liste des tableaux

«On ne va jamais aussi loin que lorsque l'on ne sait pas où l'on va »
Christophe Colomb (1451 - 1506)

Dedicaces



*Je dédie ce modeste travail en
premier lieu à mes chers
parents qui ont su me
communiquer leur passion et
m'encourager à chaque étape
et pas de ma vie.*

*A mes grands-mères paternelle et maternelle et ainsi que ma tante
A mon cher frère Djamel et mes chères sœurs Nedjwa, Fatima et Khalida
que j'aime beaucoup*

Vous êtes tout le temps avec moi.

*A mon binôme Hayat, avec laquelle j'ai réalisé ce travail et avec qui j'ai
vécu toutes les difficultés et à toute sa famille.*

*A toutes mes cousines paternelle et maternelles ; Rachida, Nadia, Malika,
Souhila , Hafidha, Hassina et Samia H., Hassina et Samia K., Kawtar et Zina
S., Aldjia K. et cousins aussi ; Mouhand, Farid, Mouloud, Ali , Habib et Eyes
et à leurs familles et à ceux qui restent sans exception.*

*Sans oublier mes amis : Farida, Ouahiba, Ferroudja, Fatima, Sonia, Latifa, en
particulier Dyhia ; Djilali, Salem et Tarik ainsi que Toufik, Amel et Fateh.*

Sans oublier aussi M^r ISSAADI B. à qui je dirai mabrouk pour son magister.

Et je le dédie aussi à tous ceux qui m'ont aidé de loin et de près.

Merci à vous tous

Je vous aime

Et Dieu merci

FARIDA

Je dédie ce travail à :

A mon père, l'avenir de tes enfants a toujours été au centre de tes préoccupations. Et en tant que père tu n'as cessé de m'encourager dans mes études. À tes enfants Tu nous as montré l'essentiel dans la vie. Papa réjoui toi, j'y suis arrivé. Ce modeste travail est le résultat d'une affection paternelle permanente, sois remercié. Je t'aime Papa.

A ma mère, femme de dévouement et de volonté. Tu es pour moi en plus d'une mère, la grande sœur qui n'a cessé de m'encourager, de m'assister et de me soutenir, sache que tu es aussi la cheville ouvrière de ce travail. J'en profite pour t'exprimer tout mon amour, ma reconnaissance et ma fierté d'avoir une mère comme toi. Je t'aime maman.

*A mon tendre frère,
Amar, à notre complicité qui est toujours présente et j'espère restera à jamais,
merci d'être toujours là.*

A mes sœur Fahima, Lynda et Lili pour les bons moments passés ensemble, et ce n'est pas fini !

A mes deux chère neveux Rezak et Amine ainsi ma petite poupée Ania je vous aime.

A la mémoire de ma grand-mère Aini, que dieu ait son âme.

A toute la famille GAOUAOUI.

A tout la famille BENZIANE en particulier dada Meziane, ainsi toute la famille AOUALI en particulier dada Samir.

A toute la famille AIT RAMDANE en particulier mon oncle Khlifa et sa femme Ouahiba sans oublier mon oncle Amar

A mes cousins et cousine en particulier Dyhia

A mon chère et unique amie Abderrahmane qui a toujours cru on moi, merci pour ta présence.

A tout la famille SMAINI en particulier mon binôme Farida.

Hayat

RESUME

Les intermédiaires métaboliques mis en jeu dans les interactions nutrition/ reproduction restent encore mal connus mais les travaux réalisés ces dernières années suggèrent que la leptine qui est une hormone adipocytaire pourrait être l'un des facteurs capable de réaliser le lien entre l'équilibre énergétique et la reproduction.

Une étude préliminaire a montré que l'incorporation de croquettes à 26% de protéines dans la ration alimentaire de rates *Wistar* a permis d'améliorer leur courbe de croissance, leur permettant ainsi d'atteindre un poids corporel optimal à la puberté.

Les résultats de l'étude expérimentale proprement dite ont montré que l'injection intrapéritonéale de leptine à des rates *Wistar* adultes réduisait la prise alimentaire et par conséquent le poids corporel des rates traitées par rapport aux femelles témoins.

L'étude des frottis vaginaux a montré une réduction de la durée du cycle œstral des rates traitées à la leptine par rapport à celles non traitées, et ce par avancement, en quelques heures, de la durée des stades « proœstrus » et « œstrus ».

Mots clés : *Leptine, rate Wistar, poids corporel, cycle œstral, frottis vaginal.*

Summary

The metabolic intermediates into play in interactions nutrition / reproduction are still poorly understood but travaux made in recent years suggest that leptin is an adipocyte hormone to be one of the factors that can make the link between energy balance and reproduction.

A preliminary study has shown that the incorporation of kibble 26% protein in the diet of *wistar* rats has improved their growth curve, allowing them to reach an optimal body weight at puberty.

The results of the experimental study itself showed that intraperitoneal injection of leptin in adult *Wistar* rats reduced food intake and consequently body weight of treated rats compared to control females.

The study of vaginal smears showed a reduction in the length of the estrous cycle of rats treated with leptin compared to untreated, and by the progress in a few hours, the duration of stages "proœstrus" and "estrus" .

Keywords: Leptin, Wistar rats, body weight, estrous cycle, vaginal smear.

ملخص

وسيطرة الأيضية في اللعب في التفاعلات الغذائية / الاستنساخ لا تزال غير مفهومة ولكن الاعمال المنجزة في السنوات الأخيرة تشير إلى أن هرمون اللبتين هو خلية شحمية ليكون واحدا من العوامل التي يمكن أن تجعل العلاقة بين الطاقة والتوازن الاستنساخ.

وقد أظهرت دراسة أولية بأن إدماج اطحن 26 % من البروتين في النظام الغذائي للفئران ويستار تحسن منحنى نموها، والسماح لهم للوصول إلى وزن الجسم المثالي في سن البلوغ.

وأظهرت نتائج الدراسة التجريبية نفسها أن الحقن داخل الصفاق من هرمون اللبتين في فئران ويستار الكبار انخفاض الاستهلاك الغذائي ووزن الجسم وبالتالي من الفئران المعالجة مقارنة للسيطرة على الإناث.

وأظهرت دراسة مسحات مهبلية انخفاض في طول دورة دقي من الفئران تعامل مع اللبتين بالمقارنة مع غير المعالجة، والتقدم المحرز في بضع ساعات، ومدة مراحل "البروستروس" و "شيق".

الكلمات الرئيسية : اللبتين، فئران ويستار، ووزن الجسم، ودورة ودقي، اللطاخة المهبلية.

Remerciements

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire d'Endocrinologie de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, dirigé par Professeur **HADJ BEKKOUCHE.F.***

*Nos sincères remerciements s'adressent à Madame **HADJ BEKKOUCHE.F** pour nous avoir accueillies dans son laboratoire et d'avoir encadré notre travail en temps que Co-Promotrice.*

On tient particulièrement à exprimer notre profonde gratitude,

*A Docteur **Ghourri Imane** promotrice, qui nous a initié au travail de recherche. On tient ici à la remercier pour sa très grande disponibilité, ses encouragements, ses conseils et critiques dont elle a su faire preuve à notre égard, à son expérience dont elle n'a jamais manqué de nous faire profiter.*

*Nous tenons également à exprimer notre grande reconnaissance et profonde gratitude à l'égard de Monsieur le président de juré Professeur **Kaidi R.** qui nous a fait l'honneur de corriger ce travail, Hommage respectueux.*

*Ainsi qu'à madame **Kaidi A.** pour l'attention qu'elle a apporté à l'examen de ce travail.*

On tient à remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire d'endocrinologie, secrétaires, chercheurs, techniciens et étudiants, ainsi que toute personne qui nous a aidés de près et de loin.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur la leptine

1. Qu'est-ce que la Leptine ?.....	2
2. Historique et découverte	2
3. Leptine : gène, promoteur, récepteurs & régulation	3
3.1. Gène	3
3.2. Promoteur.....	3
3.3. Récepteurs.....	4
3.4. Régulation	4
4. Mode d'action de la leptine.....	4
4.1. Leptine et prise alimentaire.....	5
4.2. Leptine et insuline	6
4.3. Leptine et thyroïde	7
4.4. Leptine et hormones gonadiques	7
4.5. Leptine et hormones surrénaliennes.....	7
4.6. Leptine et tissu vasculaire.....	7
4.7. Autres facteurs	8

Chapitre II : Leptine et reproduction

1. Régulation par la leptine de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.....	9
1.1. Leptine et puberté.....	9
1.2. Leptine et saisonnalité.....	12
2. Leptine et gonades	13
2.1. Leptine et ovaire.....	13
2.2. Leptine et testicule	15

Chapitre III : Description, alimentation et reproduction de la rate Wistar

1. Historique.....	16
2. Description.....	16
3. Comportement.....	16
4. Alimentation.....	17
5. Reproduction.....	17
5.1. Maturité sexuelle	17
• Chez le male.....	17
• Chez la femelle.....	18
5.2. Âge conseillé à la reproduction.....	18
5.3. Durée de la gestation.....	18
5.4. Nombre moyen de petits par portée.....	18
5.5. Cycle œstral.....	18

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie I : Etude préliminaire

1. Objectifs.....	22
2. Matériel & Méthodes	22
3. Résultats.....	23
3.1. Volume d'eau pris.....	23
3.2. Quantité d'aliment ingéré.....	23
3.3. Poids des animaux à 60 jours / Courbe de croissance.....	24
4. Discussion	25
5. Conclusion	26

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE PROPREMENT DITE

1. Objectifs.....27

2. Matériel & Méthodes27

3. Résultats.....32

4. Discussion.....41

5. Conclusion42

RECOMMANDATIONS.....49

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des abréviations

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH: Hormone Adrénocorticotropine

ADN: Acide Désoxyribo-Nucléique

ARNm: Acide Ribo-Nucléique messenger

CRH: Cotricotropin-Releasing hormone

db/db : Souris diabetes

FGF2: Fibroblast Growth Factor 2

FSH: Hormone FiliculoStimulante.

g: gramme

GH: Growth Hormone.

IL1: InterLeukine 1.

JAK: Just Another Kinase.

KDa: Kilo Dalton.

LH : Hormone Lutéinisante.

MAPK: Metogene Activated Protein Kinase.

NPY: Neuropeptide Y

Ng: Nano garmme

ob/ob : Souris obèses

ObR : Récepteur de la leptine

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

SLIP: Serum Leptin Interactive Proteins.

STAT: Signal Transducteur et Activateur de Ila Transcription.

TNF: Tumor-Necrosis-Factor.

TSH: Hormone thyroïdienne

Liste des figure

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mode d'action de la leptine [46]	5
Figure 2 : Effet de la leptine et de l'insuline sur les centres régulateurs de la prise alimentaire et la dépense énergétique [71].	6
Figure 3 : Schéma général des effets de la leptine sur la fonction de reproduction [46].....	10
Figure 4 : Régulation par la leptine de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique lorsque les conditions nutritionnelles et métaboliques sont adéquate [9].....	11
Figure 5 : Implications des facteurs endocriniens, nutritionnels et saisonniers dans la régulation des fonctions ovariennes [63].....	14
Figure 6 : Aliment pour rat	17
Figure 7 : Composition cellulaire du frottis vaginal de la rate au cours des différentes phases du cycle œstral [35].....	20
Figure 8 : Evolution du poids corporel des rates	24
Figure 9 : Contention de la rate.....	28
Figure 10 : Injection et aspiration du Nacl.....	28
Figure 11 : Dépôt de la goutte sur lame.....	28
Figure 12 : KIT de coloration et d'observation	29
Figure 13 : Injection intra péritonéale de leptine.....	30
Figure 14 : Sacrifice des rates par transfixion bilatérale des veines jugulaires et des artères carotides.....	31
Figure 15 : Récupération du vagin.....	31
Figure 16 : Récupération des cornes utérines	31
Figure 17 : Récupération des ovaires.....	31
Figure 18 : Pesée des organes	31
Figure 19 : Volume d'eau absorbé par les rates T1 et E1 avant et pendant traitement	33
Figure 20 : Volume d'eau absorbé par les rates T2 et E2 avant et pendant traitement	35

Figure 21: Evolution de la quantité d'aliment ingérée par les rates T1 et E1 avant et pendant traitement	37
Figure 22: Evolution de la quantité d'aliment ingérée par les rates T2 et E2 avant et pendant traitement	39
Figure 23 : Evolution du poids corporel des rates T1 et E1 avant et pendant le traitement.	41
Figure 24 : Evolution du poids corporel des rates T2 et E2 avant et pendant traitement	43
Figure 25 : Fin de prooestrus	44
Figure 26 : Œstrus.....	44
Figure 27 : Metœstrus.....	44
Figure 28 : Dioestrus	44
Figure 29 : Présentation schématique des trois cycles œstraux des rates T1 et E1	45
Figure 30 : Présentation schématique des quatre cycles œstraux des rates T2 et E2	45

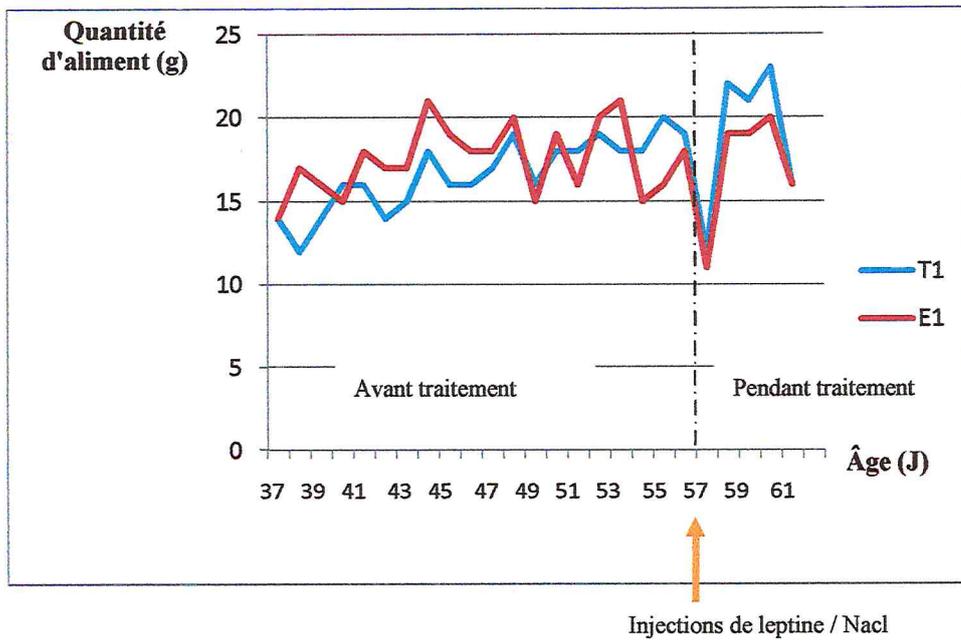


Figure 21: Evolution de la quantité d'aliment ingérée par les rates T1 et E1 avant et pendant traitement.

Tableau VII : Résultats de la quantité d'aliment ingérée (en g) par les rates T2 et E2 avant et pendant la période de traitement.

Âge (Jours)	T2		E2	
	Aliment A	Aliment B	Aliment A	Aliment B
37	13	01	14	01
38	13	00	14	03
39	11	02	13	03
40	13	02	13	04
41	12	02	14	03
42	10	02	13	04
43	12	02	14	03
44	12	0	15	01
45	13	04	14	02
46	11	03	13	03
47	09	05	13	04
48	09	06	11	07
49	08	06	15	02
50	10	04	15	05
51	09	06	12	04
52	09	08	12	09
53	13	08	10	10
54	10	05	07	03
55	08	02	13	02
56	09	07	15	07
57	11	06	12	09
58	12	06	08	12
59	13	04	06	12
60	11	03	15	03
61	10	05	12	06
62	12	07	10	08
63	13	06	13	05
64	09	08	08	10
65	07	08	09	07
66	12	05	07	05
67	10	05	09	06
68	13	03	14	04

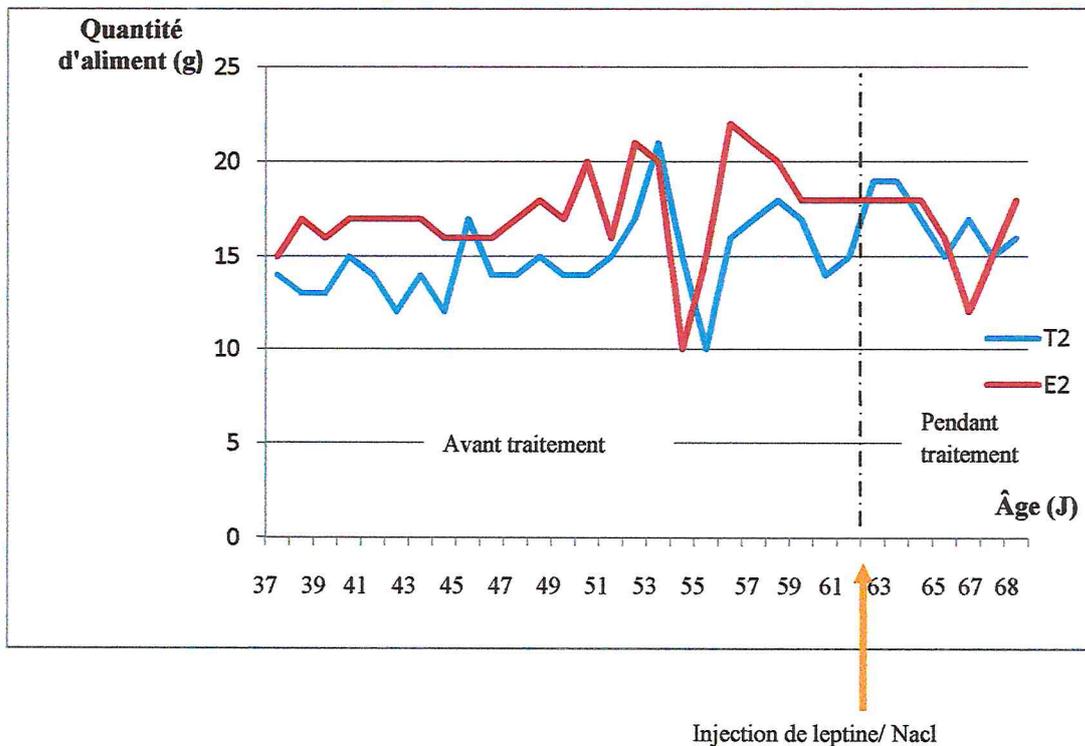


Figure 22: Evolution de la quantité d'aliment ingérée par les rates T2 et E2 avant et pendant traitement.

Les figures 21 et 22 montrent une diminution de la prise alimentaire des rates E1 et E2 pendant la durée de traitement par la leptine par rapport aux rates témoins.

3.3. Evolution du poids corporel

Les résultats des pesées du poids des rates T1, E1, T2 et E2 avant et pendant traitement sont représentés dans les tableaux VIII, IX et figures 23 et 24.

Tableau VIII : Résultats de l'évolution du poids corporel des rates T1 et E1 avant et pendant traitement.

Âge(j)	T1	E1
36	104	115
37	115	105
38	110	118
39	113	123
40	117	127
41	120	133
42	124	136
43	129	137
44	132	142
45	135	148
46	138	152
47	141	157
48	146	160
49	152	163
50	155	164
51	154	166
52	155	168
53	158	172
54	159	173
55	156	169
56	157	170
57	156	169
58	164	179
59	166	177
60	168	180
61	170	178

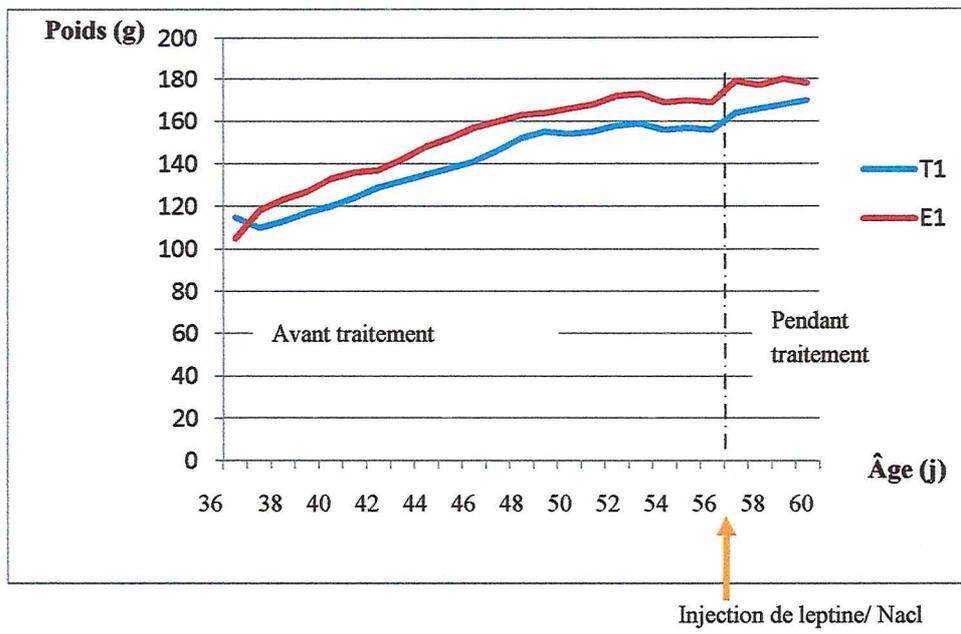


Figure 23 : Evolution du poids corporel des rates T1 et E1 avant et pendant le traitement.

Tableau IX : Résultats de l'évolution du poids corporel des rates T2 et E2 avant et pendant traitement.

Âge(j)	T2	E2
36	95	102
37	96	104
38	100	110
39	104	114
40	110	119
41	114	122
42	117	126
43	118	130
44	121	131
45	127	133
46	129	137
47	131	140
48	133	144
49	136	147
50	140	149
51	141	151
52	143	151
53	149	155
54	145	157
55	143	153
56	151	159
57	152	162
58	154	164
59	155	162
60	157	165
61	160	168
62	162	170
63	161	168
64	162	170
65	159	169
66	160	172
67	163	172
68	164	170

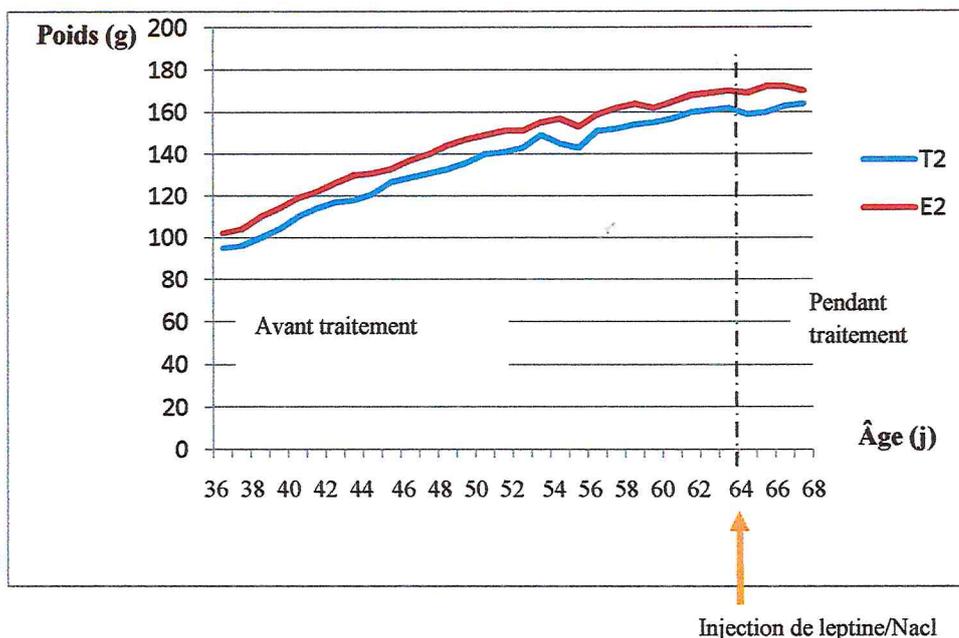


Figure 24 : Evolution du poids corporel des rates T2 et E2 avant et pendant traitement.

3.4. Gain pondéral

Tableau X : Gain pondéral des rates après la période de traitement.

	T1	E1	T2	E2
Poids de départ (g)	156	169	162	170
Poids final (g)	170	178	164	170
Gain pondéral (g)	14	9	2	0

On remarque une diminution du gain pondéral de la rate E1 et une stabilisation du poids de la rate E2 par rapport aux rates témoins T1 et T2.

3.4. Frottis vaginaux

Nous avons procédé à la réalisation des frottis vaginaux sur les quatre rates tous les jours jusqu'au jour du sacrifice. Les résultats détaillés sont présentés dans l'Annexe C.

L'observation des lames au microscope optique à l'objectif à immersion a permis de déterminer la phase du cycle œstral (Fig. 25, 26, 27 et 28).

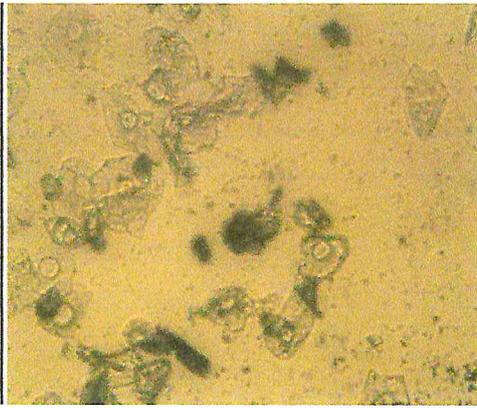


Figure 25 : Fin de proœstrus.



Figure 26 : Œstrus.

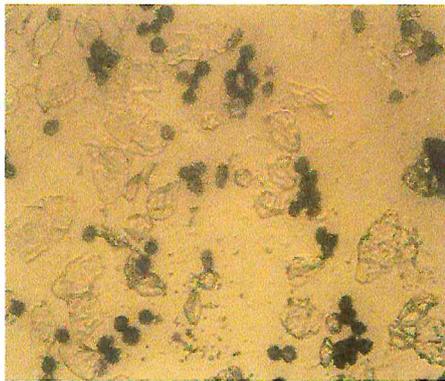


Figure 27 : Metœstrus.

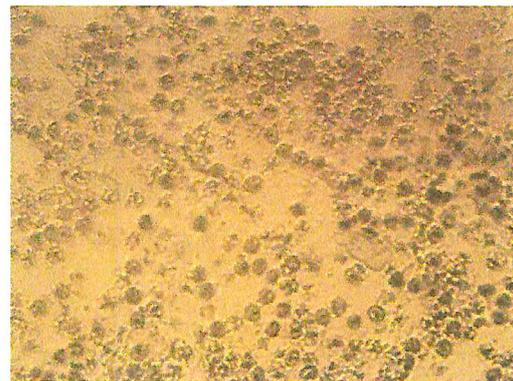
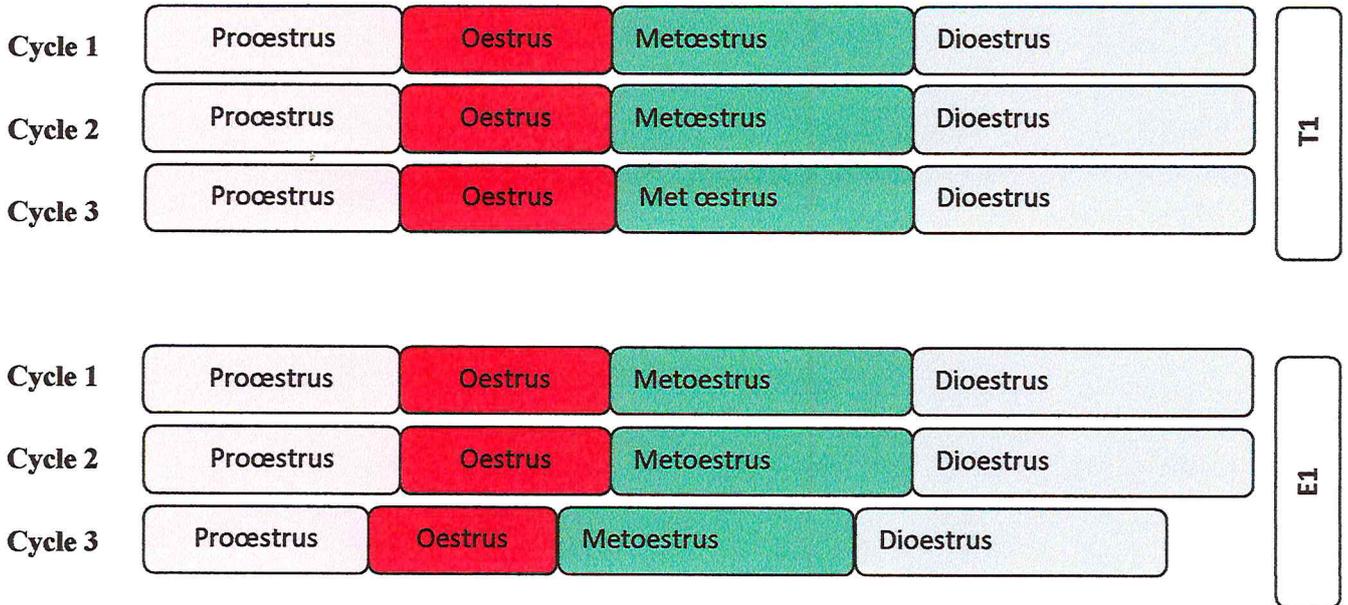
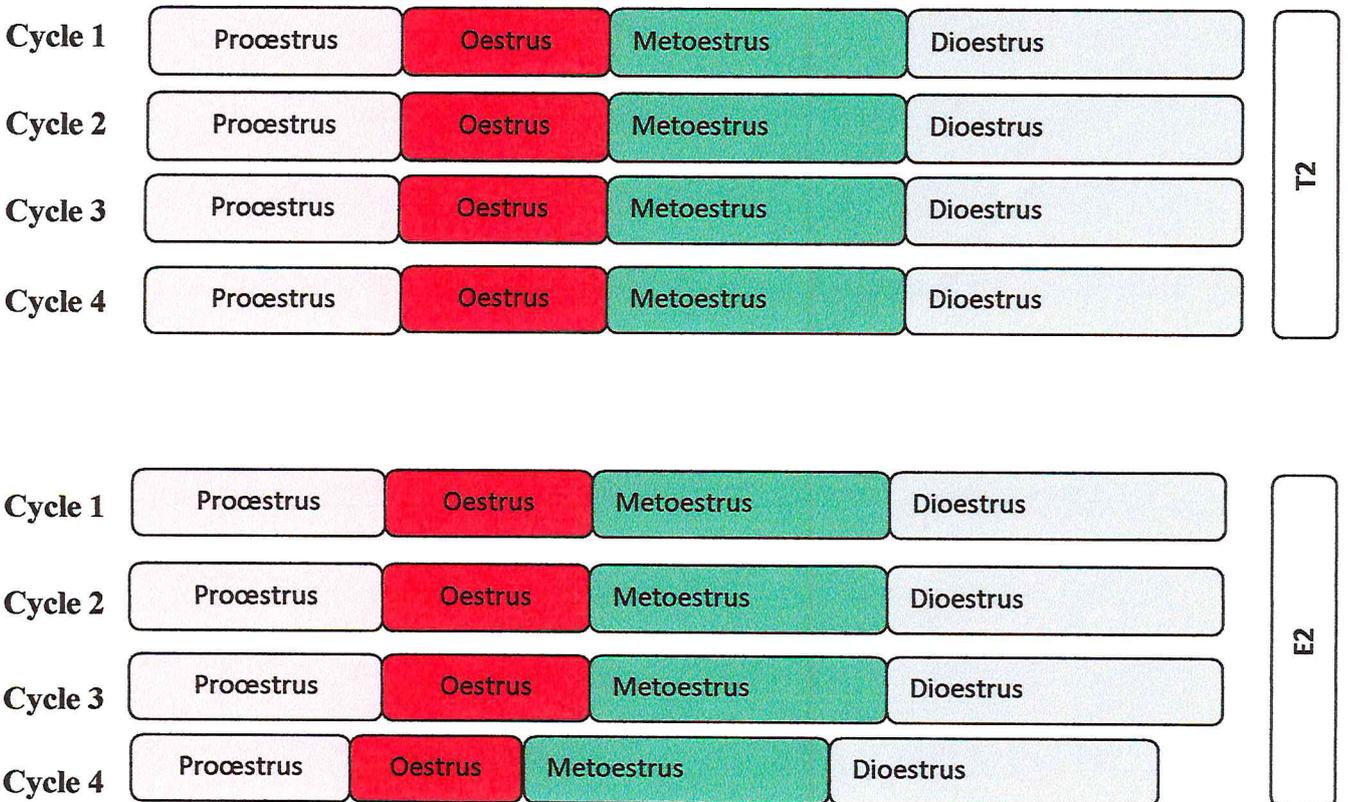


Figure 28 : Dioestrus.

Les rates T1 et E1 ayant été sacrifiées à l'âge de 61 jours, trois cycles œstraux ont été étudiés pour ces rates. Ils sont représentés dans la figure 29.

Les rates T2 et E2 ayant été sacrifiées à l'âge de 68 jours, quatre cycles œstraux ont été étudiés pour ces rates. Ils sont représentés dans la figure 30.

L'étude des frottis vaginaux (Annexe C) a montré que l'apparition du proœstrus et de l'œstrus survenait quelques heures plus tôt (après 4 jours de traitement à la leptine) comparativement aux cycles précédents (avant traitement), et ce aussi bien chez la rate E1 que E2. La durée du cycle œstral est par conséquent réduite de quelques heures chez les rates traitées.

Figure 29 : Présentation schématique des trois cycles œstraux des rates T1 et E1.**Figure 30** : Présentation schématique des quatre cycles œstraux des rates T2 et E2.

3.5. Poids des organes du tractus génital

Le poids des organes du tractus génital des rates est représenté par les tableaux XI.

Tableau XI : Résultats des poids des organes (en grammes) du tractus génital des rates T1 et E1.

Organe \ Rate	T1	E1	T2	E2
Ovaire droit	0.0759	0.0948	0.1345	0.0878
Ovaire gauche	0.0900	0.1067	0.0974	0.0671
Corne utérine droite	0.1458	0.1345	0.1985	0.1464
Corne utérine gauche	0.1808	0.1524	0.1849	0.1813
Utérus	0.1599	0.2097	0.1296	0.1837
Vagin	0.0203	0.0948	0.0230	0.1980
Poids total (g)	0.5209	0.7929	0.7679	0.8643

Même s'il paraît difficile de comparer le poids de chaque organe, on remarque d'une manière générale une augmentation du poids du tractus génital des rates E1 et E2 par rapport aux rates témoins T1 et T2.

4. Discussion

En raison du nombre très faible d'animaux étudiés, les tests statistiques n'ont pas pu être utilisés. Nos résultats ont été exprimés en moyennes et des comparaisons ont été faites entre les rates témoins et les rates traitées à la leptine.

A noter que cette dernière est une hormone récemment introduite en Algérie et les travaux la concernant sont encore en cours notamment chez la femelle. Son coût reste très élevé.

Initialement, le protocole expérimental portait sur 5 jours de traitement à la leptine, le 6^{ème} jour étant le jour du sacrifice. L'impossibilité d'accès à l'animalerie et au laboratoire durant les week-ends a malheureusement limité le nombre des injections à 4 jours à compter du dimanche, le jeudi étant le jour du sacrifice. De même que dans ces conditions il nous a été difficile d'avoir des animaux à un âge déterminé (60 jours précisément) en début de semaine.

La manipulation des rates a montré que ces dernières étaient souvent agitées. En effet, leur manipulation quotidienne pour la pesée, le frottis vaginal et l'injection aussi bien de leptine que de NaCl constituaient une source de stress aussi bien pour les rates témoins que les rates traitées.

Même s'il est admis que le stress entraîne l'activation de la fonction corticotrope [35], ce qui induit l'inhibition des sécrétions gonadotropes (Les corticoïdes inhibent les sécrétions hypophysaires : GH, LH et ACTH), il n'a pas beaucoup interféré avec nos résultats.

L'injection intra-péritonéale de leptine aux rates E1 et E2 a diminué leur consommation d'aliment. Ce résultat confirme que la leptine inhibe la prise alimentaire. Elle agirait par l'intermédiaire de son interaction avec ses récepteurs spécifiques situés au niveau de l'hypothalamus [45].

Par ailleurs, une diminution du gain pondéral pour rate E1 et une stabilisation du poids de la rate E2 par rapport aux rates témoins ont été notées. En effet, la leptine en plus de la diminution de la prise alimentaire est connue pour augmenter les dépenses énergétiques [13].

Notre étude a montré une augmentation du poids du tractus génital des rates E1 et E2 (par rapport aux rates témoins T1 et T2) après quatre jours de traitement à la leptine. Selon Zieba un traitement avec de la leptine à des rates au 21^{ème} jour post-naissance permettrait d'avancer de 1 à 4 jours l'ouverture du col vaginal, d'augmenter le poids des organes de la reproduction (ovaires, utérus, oviductes) et de raccourcir le délai pour la première saillie.

L'étude des frottis a montré que la durée moyenne du cycle œstral avant traitement chez les rates était de 4 à 5 jours, ce qui est considéré comme une durée moyenne physiologique chez cette espèce. Nos résultats sont en accord avec les observations faites par Hrapkiewicz (1998) ainsi que par Wolfensohn (1998) chez la même espèce.

L'étude des stades du cycle œstral des rates avant traitement a montré que le stade du proœstrus avait une durée de moins de 24 heures, l'œstrus une durée de 1 à 2 jours, le metoœstrus une durée de 0,5 à 2 jours et le dioœstrus une durée de 1 à 3 jours. Des durées identiques de ces phases ont été rapportées par Arthur *et al.* (1973) chez la souris.

L'étude des frottis a aussi montré qu'après 4 jours de traitement avec la leptine, le proœstrus et l'œstrus des rates E1 et E2 était avancé de quelques heures et ce, par rapport aux cycles précédents (sans traitement). Ce résultat rejoint les conclusions d'Almog *et al.* (2001) qui a lui aussi noté l'avancement de l'œstrus des rates *Wistar* traitées avec la leptine.

5. Conclusion

Notre étude a concerné quatre rats *Wistar* femelles adultes. Elle a permis de déterminer les effets de la leptine sur la prise alimentaire et la durée du cycle œstral.

L'injection intrapéritonéale de cette hormone à des rats femelles à raison de 8 $\mu\text{g}/100$ g de poids vif pendant 4 jours a permis d'obtenir une diminution de la prise alimentaire ainsi que l'avancement du proœstrus et de l'œstrus de quelques heures pendant la période de traitement par rapport aux cycles précédents, comparées aux femelles témoins.

RECOMMANDATIONS

L'étude préliminaire a permis de constater que l'incorporation d'un aliment sous forme de croquettes dans la ration alimentaire des rats permet d'améliorer leur courbe de croissance. Aussi, nous recommandons une analyse plus complète de l'aliment destiné à cette espèce et qui est disponible dans le commerce, afin de définir sa valeur nutritionnelle exacte et de proposer des formules alimentaires adaptées en fonction des besoins et du stade de développement des animaux.

A la fin de notre travail et de notre recherche bibliographique nous pouvons dire que la leptine est une hormone intéressante qui mérite d'être étudiée sur un échantillon plus important et chez les grandes espèces notamment celles à activité sexuelle saisonnières.

Par ailleurs, des coupes histologiques sur les différents organes de l'appareil génital, ainsi que des dosages hormonaux pourraient mieux déterminer les effets de la leptine au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysio-ovario-utérin.

L'utilisation de la leptine devrait être envisagée dans l'avenir afin de palier aux problèmes de stérilité chez la femme et d'anoestrus saisonnier chez la jument et la brebis.

Annexe A
Fiche technique des aliments distribués

Aliment «A» : Aliment « La Production Locale » pour « Souris et Rats »

Composition :

- Mais
- Son
- Remoulage
- Tourteau de soja
- Complément Minéralo-Vitaminique

Aliment «B» : Croquettes « CON POLO » pour « Chiens »

Valeur nutritive :

- Protéines brutes 26%
- Matières grasses : 10%
- Fibres brutes 3%
- Vitamines
- Oligoéléments

Annexe B

Fiche journalière des résultats des pesées, des prises alimentaire et hydrique, et de l'observation des frottis vaginaux des rates

Date	Rate	Poids (g)	Quantité d'aliment ingéré (g/j)	Volume d'eau pris (ml/j)	Frottis vaginal				Phase du cycle	Autres observations
					PN	C.V.K	C.epi	autre		
	T1									
	E1									
	T2									
	E2									

T : Témoin

E : Expérimental

PN : Polynucléaires

C.V.K. : Cellules Vaginales Kératinisées.

C. épi : Cellules épithéliales.

Annexe C

Résultats des stades des cycles œstraux des rates T1 et E1 avant et pendant le traitement.

Tableau I : Identification des stades du cycle œstral des rates T1 et E1.

Jours	Frottis vaginal de T1				Frottis vaginal de T2			
	Cellules épith.	C.V.K	Polynucl.	Stade du cycle	Cellules épithéliales	C.V.K	Polynucl.	Stade du cycle
1	++++	/	/	Proœstrus	+++++			Pro œstrus
2	++++	+	/	Proœstrus	+++	++	/	Fin de pro œstrus et début d'œstrus
3	++	+++	/	Proœstrus	/	+	++++	Dicœstrus
4	/	+++	++	Fin d'œstrus	/	+	++++	Dicœstrus
5	/	++	+++++	Dicœstrus	++++	+	+	fin de di œstrus et début de pro œstrus
6	/	+/-	+++++	Di œstrus	+	+/-	+++	Fin di œstrus
7	+++	+	/	Proœstrus	+++++	/	/	Proœstrus
8	+/-	+++	/	Début œstrus	+	+++++	/	œstrus
9	/	+++++	/	œstrus	/	+++	+++++	Dicœstrus
10	/	+	+++	Fin d'œstrus	++	+	+++++	Dicœstrus
11	+++	+/-	/	Début œstrus	+++	/	+++	Dicœstrus
12	/	++	+++	Fin œstrus et début de dicœstrus	++	/	++	Fin de di-œstrus début de pro-œstrus
13	/	+	++++	Dicœstrus	+++++	+++	/	proœstrus
14	+++	+	/	Proœstrus	/	+++++	/	œstrus
15	/	++++	+	œstrus (fin)	/	++++	++	Metoœstrus

Tableau II : Identification des stades du cycle œstral des rates T2 et E2.

Jours	Frottis vaginal de T1				Frottis vaginal de T2			
	Cellules épithéliales	C.V.K	Poly-nucléaires	Stade du cycle	Cellules épithéliales	C.V.K	Poly-nucléaires	Stade du cycle
1	++++	+++	/	Pro œstrus	+++	+++	/	Début d'œstrus
2	++	+++++	/	œstrus	+	++++	/	œstrus
3	/	++	++++	Fin œstrus début di œstrus	/	++	++	Début di œstrus
4	/	+	+++++	Di œstrus	+	+	++++	Di œstrus
5	/	/	+++	Di œstrus	+++	/	+++	Fin di œstrus
6	++	+	++++	Di œstrus , début pro œstrus	+	/	++++	Finœstrus, début di œstrus
7	++++	+	/	Pro œstrus	+++	/	++	Di œstrus
8	+	++++	/	œstrus	+++++	+	/	Pro œstrus
9	/	+	++++	Fin œstrus, début di œstrus	++	++++	/	Fin pro-œstrus, début œstrus
10	/	/	++++	Di œstrus	/	++	+++++	Fin œstrus, début di œstrus
11	/	+	++++	Di œstrus	++	++++	/	fin œstrus
12	+++	/	++	Fin di œstrus , début pro œstrus	/	++	++++	Di œstrus
13	+++++	+	/	Pro œstrus	/	+	++++	Di œstrus,
14	++	++++	/	œstrus	++	+	++++	Di œstrus, début pro œstrus
15	+	++	++++	Début pro œstrus	+++	+	+/-	Pro œstrus
16	++	++++	/	œstrus	/	+	+++	début de di- œstrus
17	/	++	+++	début di œstrus	/	/	+++++	Di œstrus
18	/	++	++++	Di œstrus	++	+	+++	Fin de di-œstrus, début pro-œstrus
19	+	+	+++	Di œstrus	/	+	++++	Pro-œstrus
20	+++	/	++	Début pro œstrus	+	++++	/	œstrus

References bibliographiques

1. **Adam C.L., Finley P.A., Miller D.W.** «Blood-brain leptin transport and appetite and reproductive neuroendocrine responses to intracerebroventricular leptin injection in sheep: influence of photoperiod», *Endocrinology*, (2006), 147, 4589-4598.
2. **Ainslie DA., Proietto J., Fam BC., Thorburn AW.** « Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats », *Am. J. Clin. Nutr.*, (2000), 71, 438-442.
3. **Almog B., Gold R., Tajima K., Dantes A., Salim K., Rubinstein M., Barka D., Homburg R., Lessing J.B., Nevo N., Gertler A., Amsterdam A.** « Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats », *Molecular and Cellular Endocrinology*, 183, (2001), 179-191.
4. **Barker-Gibb M.L., Sahu A., Pohl C.R., Plant T.M.** « Elevating circulating leptin in prepubertal male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) does not elicit precocious gonadotropin-releasing hormone release, assessed indirectly» . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2002), 87 : 4976 –4983.
5. **Baudin G.** « La leptine. Description, rôle physiologique Utilité diagnostique et», *Revue de l'ACOMEN*, V.6, n°1, (2000), 28-32.
6. **Beynon P.H., Cooper J.E.** « *Manuel of exotic pets- New edition: Small Animal Veterinary Association*», (1991), pages 91-92.
7. **Bocquier F., Bonnet, M., Faulconnier Y., Guerre-Millo M., Martin P., Chilliard Y.** «Effects of photoperiod and feeding level on adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe», *Reprod. Nutr. Dev.*, (1998), 38, 489-498.
8. **Bouloumié A., Drexler HC.** « Lafontan M, Busse R Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis », *Circ. Res.*, (1998), 83, 1059-66.
9. **Bouret S.G., Caron É., Steculorum S., Ishii Y., Sachot C.** « Leptine et contrôle hypothalamique de la reproduction ». *MT / médecine de la reproduction, gynécologie et endocrinologie*. Volume 10, Numéro 2, 74-84, Mars-Avril 2008.
10. **Bruneau G., Vaisse C., Caraty A., Monget P.** «La leptine: une clé pour la reproduction», *Médecine/sciences*, (1999),15, 191-196.
11. **Buff P.R., Dodds A.C., Morrison C.D., Whitley N.C., McFadin E.L., Daniel J.A., Djiane, J., Keisler D.H.** «Leptin in horses: tissue localisation and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition», *J.Anim. Sci.*, (2002) 80, 2943–2948.
12. **Caprio S., Tamborlane W.V., Silver D., Robinson C., Leibel R., McCarthy S., Grozman A., Belou A., Maggs D., Sherwin R.S.** « Hyperleptinemia : an early sign of juvenile obesity. Relations to body fat depots and insulin concentrations», *Am. J. Physiol.*, (1996), 271, E626-630.

13. **Caprio M., Fabbrini E., Isidori A. M., Aversa A., Fabbri A.**, « Leptin in reproduction ». *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* (2001), Vol.12 No.2 March.
14. **Caprio M., Isidori A.M., Carta A.R., Moretti C., Dufau M.L., Fabbri A.** «Expression of functional leptin receptor in rodent Leydig cells». *Endocrinology*, (2002), 140, 4939-4947.
15. **Carulli L., Ferrari S., Bertolini M., Tagliafico E., Del Rio G.** « Regulation of ob gene expression : evidence for epinephrine-induced suppression in human obesity ». *J. Clin. Endocrinol Metab.*, (1999), 84, 3309-3312.
16. **Chauvineau A.** « Rôles de la leptine et du vasoactive intestinal peptide Au cours des repenses inflammatoires : étude de leurs effets sur les fonctions et l'apoptose des polynucléaires neutrophiles humains», (2006).
17. **Cebulj-Kadunc N., Cestnik V., Kosec M.**« Onset of puberty and duration of seasonal cyclicality in Lipizzan fillies». *Equine veterinary journal* (2006); 38(4): 350-3.
18. **Chehab F., Mounzih K., Lu R. & Lim M.E.** «Early onset of reproductive function in normal mice treated with leptin» . *Science* (1996) ; 275, 88–90.
19. **Chen K., Li F., Li J., Cai H., Strom S., Bisello A., Kelley D.E., Friedman-Einat M., Skibinski G.A., McCrory M.A.** «Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin Nature Medicine», (2006), 12, 425–432.
20. **Cheung C.C., Thornton J.E., Kuijper J.L., Weigle D.S., Clifton D.K. & Steiner R.A.** Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1997 ; 138 855–858.
21. **Considine R.V., Sinha M.K., Heiman M.L., Kriauciunas A., Stephens T.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Marco C.C., McKee L.J., Bauer T.L., and Caro J.F.** « Serum immunréactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans», *N. Engl. J. Med.*, (1996),334, 292-295.
22. **Corvol P., Houhard X., Monnot C., Dive. V. and Pagano M.** «Vascular smooth muscle cells efficiently activate a new proteinase cascade involving plasminogen and fibronectin», *j. cell. Biochem.*, (2003), 88: 1188-1201.
23. **Dardevet D., et al.** «Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age» *J. Nutr.*, (2000), 130(11): 2630-5.
24. **Delavaud C., Ferlay A., Faulconnier Y., Bocquier F., Kann G., Chilliard Y.** «Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake», *im. Sci*, (2002), 80(5), 1317-28.
25. **De Vos P., Saladin R., Auwerx J., Staels B.** « Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompagned by body weight loss and reduced food intake », *J. Biol. Chem.*, (1995), 270, 15958-15961.

26. **Drazen Deborah L., Gregory E., Damas and Randy J., Nelson.** «Leptine effects on immune function and energy balance are photoperiod dependent in siberian Hamsters» . *Endocrinology*, (2000), 142 (7) : 2768-2775.
27. **Druet V.P.A.** «Influence des facteurs environnementaux sur la reproduction de la jument», (2005).
28. **Elbers JM., Asscheman H., Seidell, JC., Frolich M., Meinders AE., Gooren LJ.** «Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, (1997), 82, 3267-3270.
29. **Erickson J.C., Clegg K.E., Palmiter R.D.** « Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking NPY », *Nature*, (1996), 381, 415-418.
30. **Fallon M.T.** «Rats and Mice- In: LABER-LAID, SWINDLE, FLECKNELL -*Handbook of rodent and rabbit medicine*-Pergamon», (1996), Chap 1, 1-12.
31. **Ferreira-Dias G., Claudino F., Carvalho H., Agricola R., Alpoim-Moreira J., Robalo-Silva J.** «Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status», *Domest. Anim. Endocrinol.*, (2005), 29:203–13.
32. **Fitzgerald B.P., McManus C.J.** «Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare», *Biol. Reprod.*, (2000), 63: 335–340.
33. **Frederich R.C., Hamann A., Anderson S., Lollmann B., Lowell B.B., Flier J.S.** « Leptin levels reflect body lipid content in mice : evidence for diet-induced resistance to leptin action». *Nat. Med.*, (1995), 1, 1311-1314.
34. **Gazal O.S., Leshin LS., Stanko L., Thomas M.G., Keisler D.H., Anderson L.L., Williams GL.** «Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y», *Biol. Reprod.*, (1998), 59, 676-683.
35. **Gayrard V.** «Physiologie de la reproduction», Septembre (2007), page 60, ENVT.
36. **Gnessi L., Fabbri A., Spera G.** « Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis : an integrated system with hormones and local environment». *Endocr. Rev.* 1997, 18(4), 541-609.
37. **Gretillat S., Mattei X., Marchand B.** «Une rickettsiale nouvelle. (*Ehrlichiae*) des leucocytes du sang du rat de Gambie (*Cricetomys gambianus*) au Sénégal: *Cytoecetes kamtchoulia n sp*», *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop*, (1981), 391-396.
38. **Hafez (E.S.E.) in Perry T. cupps.** « Reproduction in animal farm». *Lea Febriger*, 3^e éd. : 480 p.

39. **Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chair B.T.** « Weight-reducing effect of the plasma protein encoded by the obese gene », *Scienc.*, (1995), 269, 543-549.
40. **Hardie L.J., Rayner D.V., Holmes S., Trayhurn P.** « Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA », *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996), 223, 660-665.
41. **Harkness J.E., Wagner J.E.** « The biology and medicine of Rabbits and Rodents- 4 Edition- Philadelphia: Lea and Febiger », (1994), pages 65-73, 93-96, 130-136.
42. **Hedrich H.J.** « History, strains and models- In: KRINKE, G.J.- *The laboratory Rat, The handbook of experimental Animal-* Academic press », (2000), Chap 1, 3-16.
43. **Hervey GR.** « The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats ». (1958). *J. Phys.*, 145, 336-352.
44. **Hoggard N., Mercer J.G., Rayner D.V., Moar K., Trayhurn P., Williams L.M.** « localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and *in situ* hybridization ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997), 232, 383-387.
45. **Holness M.J., Munns M.J., Sugden M.C.** « Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function », *Molecular and Cellular Endocrinology.* (1999), 157 11–20
46. **Hossner K.L.** « Cellular, molecular and physiological aspects of leptin : potential application in animal production », *Can. J. Anim. Sci.*, (1998), 78, 463-472.
47. **Hrapkiewicz K., Medina L., Holmes D.D.** « Clinical medicine of small mammals and primates », *2nd Edition*, (1998), Chap 2, Rats, 31-39.
48. **Ingalls A.M., Dickie M.D., Snell GD.** « Obese, new mutation in the mouse », *J. Hered.*, (1950), 41, 317- 318.
49. **Kirchgessner T.G., Uysal K.T., Wiesbrock SM., Marino M.W., Hotamisligil G.S.** « Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes », *J. Clin Invest.*, (1997), 100, 2777-2782.
50. **Koopmans S.J., Frolich M., Gribnau EH., Westendorp R.G., DeFronzo R.A.** « Effect of hyperinsulinemia on plasma leptin concentrations and food intake in rats », *Am. J. Physiol.*, (1998), 247, E998-E1001.
51. **Lacroix M.** « Variations qualitatives & quantitatives de l'apport en protéines laitières chez l'animal & l'homme : implications métaboliques », thèse pour l'obtention de grade de docteur en AgroParisThec, (22 septembre 2008).
52. **La Cava A., Matarese G.** « The weight of leptin in immunity », *Nat. Rev. Immunol.*, (2004), 371-379.

53. **Laroche M.J., Rousselet F.** « Les animaux de laboratoire », *Ethique et bonnes pratiques-Masson*, (1990), Chap 7, 167-187.
54. **Lenoble C.** « l'influence du surpoid sur les taux de succès en fécondation in-vitro », thèse pour le doctorat en médecine, université rene Descartes, (2007).
55. **Levy J.R., LeGall-Salmon E., Santos M., Pandak W.M., Stevens W.** « Effect of enteral versus parenteral nutrition on leptin gene expression and release into the circulation », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1997), 237, 98-102.
56. **Liefers, S.C., Veerkamp, R.F., Te Pas, M.F., Delavaud, C., Chilliard, Y. et van der Lende, T.**, «Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in dairy cows», *J. Dairy Sci*, (2003), 86(3),799-807.
57. **Lonnqvist F., Wennlund A., Arner P.** « Relationship between circulating leptin and peripheral fat distribution in obese subjects », *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, (1997), 21 , 255-260.
58. **Maffei M., Fei H., Lee G.H., Dani C., Leroy P., Zhang Y., Proenca R., Negrel R., Ailhaud G., Friedman J.M.** « Increased expression in adipocyte of ob RNA in mice with lesions of hypothalamus and with mutations at db locus ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995), 92 , 6957-6960.
59. **Mann M.R., Lee S.S., Domerty A.S. , et al.** «selective to ss or imprinting in the placenta following preimplantation development in culture» . *Development*, (2004) ; 131 : 3727-35.
60. **Marit G.B., Young S.M., Hadick C.L.** « Anatomic and physiologic characterisation of the WF/PmWp-"fz" (fuzzy) rat », *Lab. Anim.Sci.*, (1998), 45, 2, 184-190.
61. **McManus C.J., Fitzgerald B.P.** «Effect of daily clenbuterol and exogenous melatonin treatment on body fat, serum leptin and the expression of seasonal anoestrus in the mare», *Anim. Reprod. Sci.*, (2003), 76:217–230.
62. **Miranville A., Lafontan M., Bouloumié A.** « La leptine et l'angiogenèse », *Mini-revueSang Thrombose Vaisseaux*, (2004), 16, n° 5 , 243–7.
63. **Monniaux D., Caraty A., Clément F., Dalbiès-tran R., Dupont J., Fabre S., Gérard N., Mermillod P., Monget P., Uzbekova S.** «Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères», *Inra. Prod. Anim.*, (2009), 22 (2), 59-76.
64. **O'Callaghan D., Boland M.P.** «Nutritional effets on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants», *Animal Science*, (1999), 68, 299-314.
65. **Otero M., Lago R., Lago F., Casanueva F., Dieguez C., Gomez-Reino J.J.and Gualillo O.** « Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights », *FEBS Letters*, (2005), 295-301.

66. Perret J.P. « Physiologie de la reproduction », I.U.T.A. Génie biologique 1^{ère} Année, (2005), page07.
67. Perrin D. « Caractérisation de la balance énergétique et de son contrôle monoaminergique central et périphérique chez un modèle de rat ne développant pas d'obésité le rat Lou/c », thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat présenté devant l'université Claude Bernard lyon1 (2003).
68. Rao G.N., Boorman G.A. «History of the Fisher Rat- In: BOORMAN, EUSTIS,ELWEL, MONTGOMERY Jr, Mac KENZIE», *Pathology of the Fisher rat: reference and atlas- Academic Press*, (1990), Chap 2, 5-7.
69. Rao J., Jagadeesan V. «Development of rat model for iron deficiency and toxicological studies: comparison among Fisher 344, Wistar, and Sprague-Dawley strains», *Lab. Anim. Sci*, (1995), 45, 4, 393-397.
70. Saladin R., De Vos P., Guerre-Millo M., Leturque A., Girard J., Steals B., Auwerx J. « Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration », *Nature*, (1995), 377, 527-529.
71. Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D.JR., Seeley R.J., Baskin D.G. « Central nervous system control of food intake » *Nature*. (2000). 404:661-671.
72. Sei A. « Experimental *Rhazya Stricta* toxicosis in rats», *Vet. Human. Toxicol.*, (1999), 41,1, 5-8.
73. Shimizu H., Ohtani K., Tsuchiya T., Takahashi H., Uehara Y., Sato N., Mori M. « Leptin stimulates insulin secretion and synthesis in HIT-T 15 cells », *Peptides*, (1997), 18, 1263-1266.
74. Spicer L.J. «Leptin : a possible metabolic signal affecting reproduction». *Dom. Anim. Endoc.*, (2001) 21 : 251-270
75. Tartaglia L.A. «The leptin receptor», *J. Biol. Chem.*, (1997), 272, 6093-6096.
76. Tchernof A., Despres J.P., Belanger A., Dupont A., Prud'homme D., Moorjani S., Lupien P.J, Labrie F. « Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men » . *Metabolism*. (1995), 513-519.
77. Tena-sampere M., Pinilla L., Gonzalez L.C., Dieguez C., Casanueva F.F., Aguilar E. «leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis *in vitro*». *J. Endocrino*. (1999), 161(2), 211-218.
78. Thomas J., Thomas E., Gaultier JJ. « Cures thermales pour obésité et leptine note préliminaire », *Presse thermale et climatique* (2001), 138, 131-137.

79. **Thompson MP.**, « Meal-feeding specifically induces obese mRNA expression », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1996), 244, 332-337.
80. **Trayhurn P., Duncan JS., Rayner DV.** « acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice : mediation by the sympathetic system », *Biochem. J.*, (1995), 311, 729-733.
81. **Vettor R., De Pergola G., Pagano C., Engalaro P., Laudadio E., Giorgino F., Blum W.F., Giorgino R., Federspil G.** « Gender differences in serum leptin in obese people: relationship with testosterone, body fat distribution and insulin sensitivity ». *Eur. J. Clin. Invest.* (1997), 27 (12), 1016-1024.
82. **Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M.** «Positional cloning of mouse obese gene and its human homologue», (1994), *Nature*, 372, 425-432.
83. **Zheng D., Jones JP., Usala SJ., Dohm GL.** « Differential expression of ob mRNA in rat adipose tissues in response to insulin », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1996), 218, 434-437.
84. **Zieba D.A., Amstalden M., Williams G.L.** «Regulatory roles of leptin in reproduction
85. and metabolism: a comparative review» . *Domest. Anim. Endocrinol.*, (2005), 29, 166-185.
86. **Weisbroth S.H.** «The origin of the Long-Evans rat and a review of the inheritance of coat colors in rats (*rattus norvegicus*)», *Lab. Anim. Care*, (1969), 19, 5, 733-737.
87. **Wenzel E., et al.** «Effect of heat-treated proteins on selected parameters of the biotransformation system in the rat», *Ann. Nutr. Metab.*, (2002), 46(1): 9-16.
88. **Wolfensohn S., Lloyd M.** «Handbook of laboratory animal: Management and Welfare», 2nd Edition, (1998), section 2, 179-184.