

UNIVERSITE DE BLIDA - 1
Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

en Sciences Vétérinaires

INFLUENCE DE LA LEPTINE SUR LA FONCTION OVARIENNE
CHEZ LE RAT FEMELLE WISTAR

Par

Imane GHOURI

devant le jury composé de :

N. MENOUEI	Professeur, U. de Blida - 1	Président
Z. BOUMAHDJ - MERAD	Maître de Conférences A, U. de Blida - 1	Examinatrice
K. MIROUD	Maître de Conférences A, U. d'El Tarf	Examineur
B. KHIATI	Professeur, U. de Tiaret	Examineur
R. KAIDI	Professeur, U. de Blida - 1	Co-Directeur de thèse
F. HADJ-BEKKOUCHE	Professeur, U.S.T.H.B., Alger	Directrice de thèse

Blida, 2019

RESUME

La leptine est une hormone peptidique essentiellement produite par le tissu adipeux. Elle intervient principalement au niveau du métabolisme énergétique et a été la première adipokine faisant le lien entre l'état nutritionnel et la fonction reproductive. Le présent travail a pour objectif d'étudier l'effet d'un traitement par la leptine sur les structures de l'ovaire au cours du développement chez les rats femelles Wistar. Deux lots sont constitués : le premier comprend des femelles âgées de 30 jours, le second des femelles de 60 jours. La leptine diluée dans du NaCl à 9‰ est injectée quotidiennement et pendant 5 jours par voie intrapéritonéale à la dose de 8 µg / 100 g de poids corporel. Le même volume de la solution NaCl est injecté aux femelles témoins. Le poids corporel et la quantité d'aliment consommée sont mesurés quotidiennement. Un frottis vaginal est réalisé au moment du sacrifice sur les femelles adultes. Les animaux sont sacrifiés 24 heures après la dernière injection par décapitation. Le sang est recueilli dans un tube sec additionné d'EDTA à 2% puis centrifugé. Le plasma est récupéré et congelé pour le dosage hormonal. Les ovaires droits sont prélevés puis fixés dans du formaldéhyde à 10% pour une étude histologique. Les dosages hormonaux sont réalisés à l'aide de kits IRMA pour les gonadotropines et RIA pour l'œstradiol et la progestérone. Les résultats montrent une baisse significative du poids corporel (150.50 ± 4.02 vs 157.78 ± 3.51 g, $p < 0.05^*$) ainsi qu'une diminution très significative de la quantité d'aliment ingéré (14.75 ± 0.31 vs 16.33 ± 1.22 g, $p < 0.01^{**}$) chez les femelles de 60 jours traitées par la leptine par rapport aux témoins. Les résultats révèlent par ailleurs une augmentation non significative des poids moyens absolus et relatifs des ovaires droits et gauches chez les femelles traitées par la leptine comparés aux témoins et ce, pour les deux âges. L'examen des frottis vaginaux ne révèle pas de stade *œstrus* après traitement. Le dénombrement des follicules ovariens met en évidence sur les ovaires de 30 jours, un nombre plus important de follicules atrétiques comparés

aux follicules normaux après traitement par la leptine, notamment les follicules pré-ovulatoires (62 vs 35, $p < 0.01^*$), ce qui permet de suggérer que la leptine stimulerait l'apoptose cellulaire à l'âge immature. L'étude histologique descriptive met en évidence une accélération de la lutéinisation des cellules de la granulosa chez les femelles adultes après traitement par la leptine, cette dernière semble suspendre l'ovulation et induire une vasodilatation capillaire au niveau du tissu lutéal. Le dosage des hormones gonadotropes révèle une augmentation non significative du taux de LH à 30 jours d'âge après traitement (0.310 ± 0.026 vs 0.247 ± 0.030 UI/L, $p > 0.05$) mais significative à 60 jours (0.301 ± 0.032 vs 0.189 ± 0.020 UI/L, $p < 0.05^*$). Quant à la FSH, la différence entre les témoins et les traitées n'est pas significative pour les deux âges ($p > 0.05$). Le dosage des hormones stéroïdiennes montre que la leptine n'affecte pas les niveaux d'œstradiol chez les femelles adultes (2931.867 ± 24.599 vs 2922.524 ± 39.909 ng/mL, $p > 0.05$). Le dosage de la progestérone révèle une augmentation non significative à 30 jours d'âge (18.62 ± 2.84 vs 22.11 ± 3.50 ng/mL, $p > 0.05$) comme à 60 jours (33.39 ± 5.13 vs 41.60 ± 4.58 ng/mL, $p > 0.05$). Ces résultats nous permettent de conclure qu'à la dose de $8 \mu\text{g} / 100 \text{g}$ de poids corporel, la leptine intervient dans la régulation des poids corporel et ovarien ainsi que dans la folliculogénèse ovarienne et le processus ovulatoire par le contrôle des hormones gonadotropes et de la progestérone. Elle semble avoir un effet sur l'atrésie folliculaire en empêchant la survenue d'une ovulation trop précoce, avant la maturation de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien. Elle induit une altération de la folliculogénèse, une suspension de l'ovulation ainsi qu'une accélération de la lutéinisation des cellules de la granulosa à l'âge de 60 jours mais pas à 30 jours, âge auquel les récepteurs à la leptine ne seraient probablement pas encore exprimés. Elle ne semble néanmoins pas avoir d'effet sur le taux circulant d'œstradiol à la dose utilisée.

Mots clés : *Leptine, Poids corporel, Folliculogénèse, Ovulation, Lutéogénèse, LH, FSH, Œstradiol, Progestérone.*

الملخص

اللبتين هرمون بيتيدي يُنتج أساساً من الأنسجة الدهنية، يتدخل بشكل رئيسي في استقلاب الطاقة وهو أول adipokine يربط بين الحالة الغذائية ووظيفة التكاثر. يهدف هذا العمل إلى دراسة تأثير العلاج باللبتين على بنية المبيض أثناء التطور عند الجرذان الإناث Wistar. تم تشكيل مجموعتين: الأولى تضم إناثاً عمرها 30 يوماً، والثانية إناثاً عمرها 60 يوماً. تم حقن اللبتين المخفف في 9% من كلوريد الصوديوم يومياً وذلك لمدة 5 أيام داخل الصفاق بجرعة 8 ميكروغرام / 100 غ من وزن الجسم. تم حقن نفس الحجم من محلول كلوريد الصوديوم للإناث الشهود. تم قياس وزن الجسم وكمية الطعام المستهلك يومياً. كما تم إجراء لطاخة مهبلية أثناء التضحية عند الإناث البالغات. ضحيت الحيوانات 24 ساعة بعد الحقنة الأخيرة وتم جمع الدم في أنبوب جاف مضاف إليه EDTA بنسبة 2%. تم استرداد البلازما وتجميدها للجرعات الهرمونية. تم إزالة المبايض اليمنى وتثبيتها في الفورمالديهايد بنسبة 10% للدراسة النسيجية. تم إجراء فحوصات هرمونية باستخدام مجموعات IRMA لهرمون الغدد التناسلية وRIA للاستراديول والبروجسترون. أظهرت النتائج انخفاضاً محسوساً في وزن الجسم (150.50 ± 4.02 مقابل 157.78 ± 3.51 غ، $p > 0.05$) وانخفاضاً محسوساً جداً في كمية الطعام المستهلك (14.75 ± 0.31 مقابل 16.33 ± 1.22 غ، $p > 0.01$) عند الإناث البالغات من العمر 60 يوماً اللواتي عولجن باللبتين مقارنة بالشهود. كما كشفت النتائج عن زيادة غير محسوسة في متوسط الأوزان المطلقة والنسبية للمبيضين الأيمن والأيسر عند الإناث المعالجة باللبتين مقارنة بالشهود لكلتا الأعمار. لم يكشف فحص المساحات المهبلية عن مرحلة الشبق بعد العلاج. أظهرت عدّ جريبات المبايض ذات 30 يوماً عدداً أكبراً من الجريبات الرتقية مقارنة بالجريبات الطبيعية بعد العلاج باللبتين، وخاصة الجريبات السابقة للإباضة (62 مقابل 35، $p > 0.01$)، مما يسمح للإشارة إلى أن اللبتين قد يحفز موت الخلايا المبرمج قبل سن النضج. أظهرت الدراسة النسيجية الوصفية تسارع وتيرة خلايا الجرانولوزا عند الإناث البالغات بعد العلاج باللبتين، ويبدو أن هذا الأخير يُعَلِّق الإباضة ويقوم بتوسيع الشعيرات الدموية في النسيج الأصفر. كشفت تحاليل الجونادوتروبين زيادة غير معتبرة في مستويات LH في 30 يوماً من العمر بعد العلاج (0.026 ± 0.310 مقابل 0.030 ± 0.247 وحدة دولية / ل، $p < 0.05$) وزيادة معتبرة في 60 يوماً (0.032 ± 0.301 مقابل

الإناث الشهود والإناث المعالجة لكلاً العُمَرَيْن ($p < 0.05$). كما بيَّن تحليل هرمونات الستيروئيد أنَّ اللَّيْبَتَيْن لا يُؤثِّرُ على مُستَوِيَّات الأستِراڊيول عندَ الإناثِ البَالِغَاتِ (2931.867 ± 24.599 مقابل 2922.524 ± 39.909 نانوغرام / مل، $p < 0.05$). من ناحيةٍ أُخرى، كشفَ تحليلُ البروجسترون عن زيادةٍ طفيفَةٍ عندَ عُمُر 30 يومًا (18.62 ± 2.84 مقابل 22.11 ± 3.50 نانوغرام / مل، $p < 0.05$) في 60 يومًا (33.39 ± 5.13 مقابل 41.60 ± 4.58 نانوغرام / مل، $p < 0.05$). هذه النَّتَاج تسمَحُ لنا أن نَسْتنتِجَ أنَّ جُرْعَةَ 8 ميكروغرام / 100 غ من الوزنِ البَدَنِيِّ لِلَّيْبَتَيْن تُساهمُ في تنظيمِ وزن الجسم ووزن المبيض، وفي التكوُّن الجريبِيِّ المَبِيضِي (Folliculogenesis) وَفِي عملية الإباضة وذلك عن طريق التَّحْكَمِ في هرمونات الغُدِّ التَّنَاسُلِيَّةِ وهرمون البروجسترون. كما يبدو أن لها تأثيرًا على الرتق الجريبِي عن طريق منع الإباضة المبكرة، قبل نضج محور المهاد - الغدة النخامية - المبيض. كما أنَّها تستحدثُ تغييرَ تكوين الجريبات، وتعليق الإباضة وتسريع عملية إنبات خلايا الجرانولوزا (Luteogenesis)، كلُّ ذلك في عمر 60 يومًا وليس في عمر 30 يومًا، ممَّا يُرَجِّحُ احتمالية عدم وجود مُستقبِلات اللَّبَتَيْن في هذا العمر الأخير بَعْدُ. كما لا يبدو أن يكون اللَّبَتَيْن أيَّ تأثير على مستوى الأستِراڊيول مع الجُرْعَة المُستخدَمة.

الكلمات المفاتيح: لبَتَيْن، وزن الجسم، Folliculogenesis، إباضة، Luteogenesis، LH، FSH، أَسْتِراڊيول، بروجسترون.

ABSTRACT

Leptin is a peptide hormone primarily produced by adipose tissue. It mainly intervenes in the energy metabolism and was the first adipokine making the link between the nutritional status and the reproductive function. The aim of this study was to investigate the effect of leptin treatment on ovarian structures during development in female Wistar rats. Animals were divided into two groups: 30 and 60-day-old females. Experimental treated females were administrated 8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of body weight intraperitoneal leptin injections daily for 5 days, while control females received the same volume of saline solution (9‰ NaCl). Body weight and food intake were recorded daily. A vaginal smear was performed at the time of the sacrifice on adults. The animals were sacrificed 24 hours after the last injection by decapitation. Blood was collected in a dry tube supplemented with 2% EDTA and centrifuged. Plasma was recovered and frozen for hormonal assays. The right ovaries were removed, weighed and then fixed in 10% formaldehyde for histological study. Hormonal assays were performed using IRMA kits for gonadotropins and RIA for estradiol and progesterone. The results showed a significant decrease in body weight (150.50 ± 4.02 vs 157.78 ± 3.51 , $p < 0.05^*$) and a very significant decrease in food intake (14.75 ± 0.31 vs $16.33 \pm 1.22\text{ g}$, $p < 0.01^{**}$) in 60-day-old females treated with leptin compared to controls. The results also revealed a nonsignificant increase in absolute and relative mean weights of right and left ovaries in leptin-treated females compared to controls in both ages. The examination of vaginal smears did not reveal an estrus stage after leptin treatment. Ovarian follicles enumeration showed a greater number of atretic follicles compared to normal follicles after treatment with leptin, especially preovulatory ones (62 vs 35, $p < 0.01^*$), which allowed to suggest that leptin appears to stimulate cellular apoptosis at immature age. Descriptive histological examination showed an accelerated luteinization of granulosa cells in adult females after leptin treatment, which seems to suspend ovulation and induce a

capillary vasodilatation in the luteal tissue. The gonadotropic hormone assay revealed a nonsignificant increase in LH level at 30 days of age (0.310 ± 0.026 vs 0.247 ± 0.030 IU/L, $p > 0.05$) but significant at 60 days (0.301 ± 0.032 vs 0.189 ± 0.020 IU/L, $p < 0.05^*$). As for FSH, the difference between controls and treated was not significant for both ages ($p > 0.05$). The steroid hormones assays showed that leptin did not affect estradiol levels in adult females (2931.867 ± 24.599 vs 2922.524 ± 39.909 ng/mL, $p > 0.05$). On the other hand, the determination of progesterone revealed an insignificant increase at 30 days of age (18.62 ± 2.84 vs 22.11 ± 3.50 ng/mL, $p > 0.05$) as at 60 days (33.39 ± 5.13 vs 041.60 ± 4.58 ng/mL, $p > 0.05$). These results allow us to conclude that at the dose of $8 \mu\text{g} / 100 \text{g}$ of body weight, leptin is involved in the regulation of body and ovarian weights, ovarian folliculogenesis and the ovulatory process by the control of gonadotropic hormones and progesterone. It seems to have an effect on follicular atresia by preventing the occurrence of too early ovulation, before the maturation of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. It induces an alteration of folliculogenesis, a suspension of ovulation and appears to accelerate the luteinization of granulosa cells and to suspend ovulation at 60 days but not at 30 days, time at which leptin receptors are probably not expressed yet. However, it does not seem to have any effect on the circulating level of estradiol at the dose used.

Key words: *Leptin, Body weight, Folliculogenesis, Ovulation, Luteogenesis, LH, FSH, Estradiol, Progesterone.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Mme HADJ-BEKKOUCHE F., Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques (USTHB, Alger) pour m'avoir proposé le sujet de la présente thèse, pour ses précieux conseils, ses encouragements dans les moments difficiles ainsi que pour les efforts consentis pour la correction minutieuse de ce tapuscrit et des productions scientifiques. Elle fut pour moi une directrice de thèse attentive et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail d'enseignant-chercheur.

Je remercie également mon co-directeur de thèse Mr KAIDI R., Professeur à l'Institut des Sciences Vétérinaires (Université des Blida - 1) qui m'a accompagné durant l'élaboration de cette thèse, pour ses valeureux conseils, ses encouragements dans les moments difficiles et pour sa disponibilité.

J'exprime également tous mes remerciements à l'ensemble des membres du jury : au Pr MENOUERI N., pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse ainsi qu'au Dr BOUMAHDI-MERAD Z., au Dr MIROUD K, et au Pr KHIATI B. pour avoir bien voulu examiner ce travail.

J'adresse toute ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail. Je remercie le Pr ABDELALI M., pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire d'Histologie du Centre Hospitalo-Universitaire d'Hussein Dey (Ex. Parnet, Alger) ainsi que son équipe et pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler.

Je remercie également le Dr KHLILI A. ainsi que le personnel du Centre Nucléaire de Draria (CNDR) pour leur aide dans les dosages hormonaux et pour leur gentillesse.

Un grand et énorme merci à Mme BOUCHEFA H. pour sa grande gentillesse et pour son amitié, pour m'avoir permis de travailler sur ses animaux, pour m'avoir initié au sacrifice, pour la contention des animaux et pour son immense aide dans la partie expérimentale.

Je tiens également à remercier Melle GHOZLANI A., Ingénieur du Laboratoire d'Endocrinologie de la FSB de l'USTHB. Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude pour tout ce qu'elle fait dans ce laboratoire avec les doctorants, les masters et toutes les personnes qui la sollicitent. Je n'aurais jamais pu mener ce travail à terme sans ses encouragements et sa disponibilité.

Je remercie également Djida pour son aide dans la partie statistique et Besma pour son aide dans le dénombrement ainsi que toutes les doctorantes et ingénieurs du LBPO pour leur gentillesse, leur aide et leur amitié.

Un grand merci également au Pr BACHIR-PACHA M., au Pr SAHRAOUI N., au Pr LAFRJ M., au Dr BOUKENAOUI N., au Dr FERROUK M., au Dr BOUBEKRI A., au Dr AKLOUL, au Dr MERDJA, à Mme DJERBOUB et à tous les ingénieurs de Laboratoire, sans oublier Walid, Ahmed et les agents de sécurité de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida.

Les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, en particulier mon cher père adoré, mon frère, mes sœurs, mes beaux-frères, ma belle-sœur, mes neveux et nièces, mes tantes et oncles, mes cousins et cousines.

A toutes mes amies en particulier Sadjia, Lila, Nadia et Naima.

Une pensée pour terminer ces remerciements à toi, ma chère et tendre maman, toi qui n'a pas vu l'aboutissement de mon travail mais je sais que tu en aurais été très fière. A ta mémoire et celle de mon grand-père Baba à la barbe fleurie pour votre affection et vos prières.

Sincères remerciements

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
المخلص.....	3
ABSTRACT.....	5
REMERCIEMENTS.....	7
TABLE DES MATIERES.....	9
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	14
INTRODUCTION	20
1. CHAPITRE 1	
LA LEPTINE : DE LA DECOUVERTE A LA REGULATION	22
1.1. HISTORIQUE & DECOUVERTE.....	22
1.2. STRUCTURE & SYNTHÈSE	24
1.2.1. Gène codant : Gène <i>ob</i>	24
1.2.2. Molécule : Protéine <i>Ob</i>	24
1.3. METABOLISME.....	25
1.3.1. Sécrétion.....	25
1.3.2. Cinétique.....	26
1.3.3. Distribution.....	26
1.3.4. Transport.....	26
1.3.5. Clairance.....	27
1.4. RECEPTEURS & MECANISMES D'ACTION.....	27
1.4.1. Récepteur <i>Ob-R</i>	27
1.4.2. Isoformes naturelles du récepteur <i>Ob-R</i>	28
1.4.3. Distribution tissulaire des récepteurs.....	29
1.4.4. Transfert de la leptine vers le SNC.....	30
1.4.5. Liaison Leptine / <i>Ob-R</i> & Transduction du signal.....	32
1.4.5.1. Voie des JAK/STAT	32

1.4.5.2.	Voie des MAP Kinases (MAPK)	34
1.5.	FACTEURS REGULANT LA SECRETION DE LA LEPTINE.....	35
1.5.1.	<i>Facteurs individuels</i>	35
1.5.1.1.	Masse corporelle	35
1.5.1.2.	Age	36
1.5.1.3.	Sexe.....	36
1.5.2.	<i>Facteurs environnementaux</i>	36
1.5.2.1.	Cycle nycthémeral	36
1.5.2.2.	Photopériode	36
1.5.2.3.	Acclimatation au froid	37
1.5.3.	<i>Facteurs humoraux</i>	37
1.5.3.1.	Insuline	37
1.5.3.2.	Glucocorticoïdes & Neuropeptide Y	37
1.5.3.3.	Agonistes β 3 adrénergiques	38
1.5.3.4.	GH & Facteurs de croissance	38
1.5.3.5.	Nutriments.....	38
1.5.3.6.	Cytokines	39

2. CHAPITRE 2

	SYSTEME REPRODUCTEUR DE LA RATTE : ANATOMIE, PHYSIOLOGIE & REGULATION	39
2.1.	GENERALITES	39
2.2.	APPAREIL REPRODUCTEUR DE LA RATTE	40
2.2.1.	<i>Ovaire</i>	40
2.2.2.	<i>Oviducte</i>	41
2.2.3.	<i>Utérus</i>	41
2.2.4.	<i>Vagin</i>	42
2.2.5.	<i>Vestibule vaginal & Vulve</i>	42
2.3.	PHYSIOLOGIE	43
2.3.1.	<i>Cycle œstral</i>	43
2.3.2.	<i>Fonction ovarienne</i>	44
2.3.2.1.	Ovogénèse	44
2.3.2.2.	Folliculogénèse	44
2.3.2.2.1.	Folliculogénèse basale : Phase non-gonado-dépendante.....	45
2.3.2.2.2.	Folliculogénèse terminale : Phase gonado-dépendante.....	47
2.3.2.2.3.	Maturation ovocytaire & Ovulation	50

2.3.2.3.	Phase lutéale	57
2.3.2.3.1.	Lutéogénèse	57
2.3.2.3.2.	Lutéolyse	57
2.3.3.	Régulation	58
2.3.3.1.	FSH et LH.....	58
2.3.3.1.1.	Régulation cérébrale	58
2.3.3.1.2.	Régulation périphérique	63
2.3.3.2.	Prolactine.....	65
2.3.3.3.	Actions physiologiques de la leptine sur le système reproducteur.....	67

3. CHAPITRE 3

MATERIEL & METHODES	70
3.1. MATERIEL	70
3.1.1. <i>Matériel biologique : Animaux</i>	70
3.1.2. <i>Matériel non biologique</i>	70
3.2. METHODES	70
3.2.1. <i>Constitution des lots</i>	70
3.2.2. <i>Expérimentation</i>	71
3.2.2.1. Préparation de la solution de leptine	72
3.2.2.2. Dose de leptine à injecter & Rythme des injections.....	72
3.2.2.3. Sacrifice & Prélèvements.....	72
3.2.3. <i>Frottis vaginaux</i>	72
3.2.3.1. Principe de la coloration au MGG.....	73
3.2.3.2. Technique de coloration	73
3.2.3.3. Observation	73
3.2.4. <i>Histologie</i>	73
3.2.4.1. Fixation	74
3.2.4.2. Déshydratation & Eclaircissement.....	74
3.2.4.3. Inclusion.....	75
3.2.4.4. Préparation des coupes.....	75
3.2.4.5. Coloration	76
3.2.4.6. Montage	77
3.2.4.7. Observation microscopique.....	77
3.2.5. <i>Dosages hormonaux</i>	79
3.2.5.1. Principe.....	80

3.2.5.2. LH et FSH.....	81
3.2.5.2.1. Procédure	81
3.2.5.2.2. Courbes standard	81
3.2.5.2.3. Performances du dosage.....	83
3.2.5.3. 17 β-œstradiol	84
3.2.5.3.1. Procédure	84
3.2.5.3.2. Courbe standard.....	85
3.2.5.3.3. Performances du dosage.....	86
3.2.5.4. Progestérone	86
3.2.5.4.1. Procédure	86
3.2.5.4.2. Courbe standard.....	87
3.2.5.4.3. Performances du dosage.....	88
3.2.6. <i>Analyse statistique</i>	91
4. CHAPITRE 4	
RESULTATS	92
4.1. ETUDE PONDERALE	92
4.1.1. <i>Poids corporel</i>	92
4.1.2. <i>Poids ovarien</i>	94
4.2. FROTTIS VAGINAUX.....	96
4.3. HISTOLOGIE.....	97
4.3.1. <i>Etude descriptive des ovaires</i>	97
4.3.1.1. Ovaires de 30 jours	97
4.3.1.2. Ovaires de 60 jours	97
4.3.2. <i>Dénombrement des follicules et des corps jaunes</i>	117
4.3.2.1. Ovaires de 30 jours	117
4.3.2.2. Ovaires de 60 jours	119
4.4. DOSAGES HORMONAUX.....	121
4.4.1. <i>LH et FSH</i>	121
4.4.2. <i>17 β-œstradiol</i>	122
4.4.3. <i>Progestérone</i>	123
5. CHAPITRE 5	
DISCUSSION.....	125
CONCLUSION	156

PERSPECTIVES.....	157
APPENDICES	158
APPENDICE A : LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS.....	158
APPENDICE B : COLORATION AU MGG	163
APPENDICE C : COLORATION A L'HEMALUN EOSINE (FICHE TECHNIQUE).....	164
APPENDICE D : COLORATION TOPOGRAPHIQUE AU TRICHROME DE MASSON (FICHE TECHNIQUE)	165
APPENDICE E : MATERIEL NECESSAIRE AU DOSAGE NON FOURNI AVEC LES TROUSSES	166
APPENDICE F : MATERIEL ET REACTIFS FOURNIS AVEC LES TROUSSES	167
APPENDICE G : POIDS CORPOREL ET QUANTITE D'ALIMENT CONSOMME PAR LES FEMELLES T ET E AGEES DE 30 JOURS PENDANT LA PERIODE D'ESSAI.....	170
APPENDICE G' : POIDS CORPOREL ET QUANTITE D'ALIMENT CONSOMME PAR LES FEMELLES T ET E AGEES DE 60 JOURS PENDANT LA PERIODE D'ESSAI.....	171
APPENDICE H : POIDS ABSOLUS ET RELATIFS DES OVAIRES DES FEMELLES T ET E AGEES DE 30 JOURS	172
APPENDICE H' : POIDS ABSOLUS ET RELATIFS DES OVAIRES DES FEMELLES T ET E AGEES DE 60 JOURS	173
APPENDICE I : RESULTATS DU FROTTIS VAGINAL ET STADE ŒSTRAL JUSTE AVANT LE SACRIFICE DES FEMELLES T ET E AGEES DE 60 JOURS	174
APPENDICE J : NOMBRE DE FOLLICULES (NORMAUX ET ATRETIQUES) PAR STADE FOLLICULAIRE ET NOMBRE DE CJ PAR FEMELLE T ET E SUR LES OVAIRES DE 30 JOURS	175
APPENDICE J' : NOMBRE DE FOLLICULES (NORMAUX ET ATRETIQUES) PAR STADE FOLLICULAIRE ET NOMBRE DE CJ PAR FEMELLE T ET E SUR LES OVAIRES DE 60 JOURS	177
APPENDICE K : VALEURS INDIVIDUELLES DE LA LH PLASMATIQUE (EN UI/L) CHEZ LES FEMELLES TEMOINS ET EXPERIMENTALES DE 30 ET 60 JOURS D'AGE	179
APPENDICE L : VALEURS INDIVIDUELLES DE LA FSH PLASMATIQUE (EN UI/L) CHEZ LES FEMELLES TEMOINS ET EXPERIMENTALES DE 30 ET 60 JOURS D'AGE	180
APPENDICE M : VALEURS INDIVIDUELLES DE LA PROGESTERONE PLASMATIQUE (EN NG/ML) CHEZ LES FEMELLES TEMOINS ET EXPERIMENTALES DE 30 ET 60 JOURS D'AGE	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	182

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 : Expériences de circulation croisée ou parabiose entre souris de type sauvage, souris ob/ob et souris db/db.	23
Figure 1.2 : Structure de la leptine [41].	25
Figure 1.3 : Structure du gène db et des différentes isoformes du récepteur Ob-R résultant d'un épissage alternatif du gène [78].	29
Figure 1.4 : Anatomie de l'encéphale de rat.	30
Figure 1.5 : Transport de la leptine via les tanycytes [93].	31
Figure 1.6 : Représentation schématique du récepteur de la leptine de poulet.	32
Figure 1.7 : Activation de la cascade des JAK et des STAT.	34
Figure 1.8 : Leptine et voie ERK.	35
Figure 2.1 : Organes uro-génitaux de la ratte.	40
Figure 2.2 : Durée des différents stades du cycle œstral chez la ratte.	44
Figure 2.3 : Etapes du développement folliculaire [191].	45
Figure 2.4 : Stéroïdogénèse et modèle « 2 cellules, 2 gonadotropines » [215].	48
Figure 2.5 : Changements fonctionnels dans l'ovocyte et les cellules de la granulosa au cours du développement folliculaire.	49
Figure 2.6 : Réactivation de la prophase arrêtée au cours de la première division méiotique de l'ovocyte pré-ovulatoire [224].	52

Figure 2.7 : Cascade d'évènements déclenchés par le pic de LH conduisant à l'ovulation du (des) follicule(s) pré-ovulatoire(s) [190].	56
Figure 2.8 : Régulation hypothalamo-hypophyso-ovarienne de la fonction de la reproduction.	60
Figure 2.9 : Interactions entre les neuropeptides et les hormones impliquées dans la régulation de l'équilibre énergétique et la fertilité.	62
Figure 2.10 : Effet des neuropeptides et des hormones impliqués dans la régulation de l'apport alimentaire et dans l'axe de la fertilité sur les interactions avec les neurones à GnRH en fonction du statut œstrogénique.	64
Figure 2.11 : Concentration en progestérone, prolactine, œstradiol, LH et FSH dans le plasma périphérique pendant le cycle œstral de la ratte.	66
Figure 2.12 : Schéma récapitulatif des régulations centrale et périphérique de la sécrétion de la GnRH (Schéma personnel).	67
Figure 2.13 : Interactions de la leptine avec l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.	69
Figure 3.1 : Différents stades du développement folliculaire.	77
Figure 3.2 : Courbe standard de la LH.	82
Figure 3.3 : Courbe standard de la FSH.	83
Figure 3.4 : Courbe standard du 17 β -œstradiol.	86
Figure 3.5 : Courbe standard de la progestérone.	88
Figure 3.6 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	90
Figure 4.1 : Evolution du poids corporel (à gauche) et de la quantité d'aliment consommé (à droite) chez les femelles témoins et les femelles traitées avec la leptine à 30 et à 60 jours d'âge.	93
Figure 4.2 : Poids absolus (à gauche) et relatifs (à droite) des ovaires chez les femelles témoins et les femelles traitées avec la leptine à 30 et à 60 jours d'âge.	95

Figure 4.3 : Frottis vaginaux.....	96
Figure 4.4 : Coupes transversales de l’ovaire d’une ratte immature traitée par la leptine (a) et d’une ratte immature témoin (b).....	100
Figure 4.5 : Coupes transversales de l’ovaire d’une ratte immature traitée montrant des follicules primordiaux et d’autres follicules à différents stades de développement et à différents grossissements (a, b, c).	101
Figure 4.6 : Coupes transversales de l’ovaire montrant des follicules primordiaux et des follicules primaires chez une ratte adulte traitée (a), une ratte adulte témoin (b) et une ratte immature traitée (c).....	102
Figure 4.7 : Coupes transversales de l’ovaire montrant des follicules secondaires et tertiaires chez une ratte adulte traitée (a), une ratte immature traitée (b) et une ratte immature témoin (c, d).....	103
Figure 4.8 : Coupes transversales de l’ovaire montrant un follicule antral au stade tertiaire.	104
Figure 4.9 : Coupe transversale de l’ovaire montrant un follicule pré-ovulatoire atrétique chez une ratte adulte témoin.	105
Figure 4.10 : Coupes transversales de l’ovaire montrant des follicules polyovocytaires au stade antral chez des rattes adultes traitées (a, b).	106
Figure 4.11 : Coupe transversale de l’ovaire d’une ratte immature traitée montrant un follicule atrétique (a).	107
Figure 4.12 : Coupes transversales montrant une partie de l’ovaire d’une ratte adulte traitée (a) et d’une ratte adulte témoin (b).....	108
Figure 4.13 : Coupe transversale de l’ovaire montrant un CJ d’aspect normal chez une femelle adulte témoin (a).	109
Figure 4.14 : Coupes transversales de l’ovaire montrant l’évolution du CJ en fonction des stades du cycle œstral chez des rattes adultes traitées.	110

Figure 4.15 : Coupes transversales au niveau des ovaires de femelles adultes traitées avec la leptine montrant la lutéinisation précoce des follicules.	111
Figure 4.16 : Coupes transversales au niveau des ovaires de femelles adultes traitées avec la leptine montrant deux CJ désorganisés (a, b).....	112
Figure 4.17 : Coupe transversale de l’ovaire montrant un ovocyte dégénéré emprisonné à l’intérieur d’un corps lutéal chez une femelle adulte traitée (a, b).	113
Figure 4.18 : Coupe transversale de l’ovaire montrant un ovocyte non expulsé emprisonné à l’intérieur d’un corps lutéal à différents grossissements (a, b, c) chez une femelle adulte traitée.....	114
Figure 4.19 : Coupes transversales montrant la vascularisation de l’ovaire chez une femelle adulte témoin (a, b) et chez une femelle adulte traitée avec la leptine (c, d).	115
Figure 4.20 : Coupes au niveau de l’ovaire d’une ratte immature témoin montrant la transformation d’un follicule atrétique en tissu interstitiel.	116
Figure 4.21 : Pourcentage des follicules normaux et atrétiques sur les ovaires T et E de 30 jours.	118
Figure 4.22 : Pourcentage des follicules normaux et atrétiques par stade folliculaire sur les ovaires T et E de 30 jours.....	118
Figure 4.23 : Pourcentage des follicules normaux et atrétiques sur les ovaires T et E de 60 jours.	120
Figure 4.24 : Pourcentage des follicules normaux et atrétiques par stade folliculaire sur les ovaires T et E de 60 jours.....	120
Figure 4.25 : Niveaux plasmatiques de la LH et de la FSH chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine à 30 et 60 jours d’âge.	122
Figure 4.26 : Niveaux plasmatiques de l’œstradiol chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine à 60 jours d’âge.	123

Figure 4.27 : Niveaux plasmatiques de la progestérone chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine à 30 et 60 jours d'âge.	124
Tableau 2.1 : Folliculogénèse chez la ratte et la femme [190,216*].	50
Tableau 3.1 : Nombre d'animaux par expérimentation.	71
Tableau 3.2 : Classification de PEDERSEN et PETERS des différents stades folliculaires et classification retenue dans cette thèse.	78
Tableau 3.3 : Différentes étapes du dosage radioimmunométrique de la LH et de la FSH.	81
Tableau 3.4 : Concentrations (en UI/L) des calibrateurs utilisés pour les courbes standard de la LH et de la FSH.	82
Tableau 3.5 : Performances des dosages de la LH et de la FSH.	84
Tableau 3.6 : Différentes étapes du dosage radioimmunologique de l'œstradiol.	85
Tableau 3.7 : Concentrations (en pmol/L) des calibrateurs utilisés pour la courbe standard de l'œstradiol.	86
Tableau 3.8 : Différentes étapes du dosage radioimmunologique de la progestérone.	87
Tableau 3.9 : Concentrations (en ng/mL) des calibrateurs utilisés pour la courbe standard de la progestérone.	87
Tableau 3.10 : Performances des dosages de l'œstradiol et de la progestérone.	89
Tableau 4.1 : Evolution de la quantité d'aliment consommé et du poids corporel à 30 et 60 jours d'âge.	92
Tableau 4.2 : Poids moyens absolus et relatifs des ovaires chez les femelles témoins et les femelles traitées avec la leptine à 30 et 60 jours d'âge.	94
Tableau 4.3 : Nombre et pourcentage des follicules normaux et atrétiques par stade folliculaire chez les femelles témoins et expérimentales âgées de 30 jours.	117

Tableau 4.4 : Nombre et pourcentage des follicules normaux et atrétiques par stade folliculaire chez les femelles témoins et expérimentales âgées de 60 jours.	119
Tableau 4.5 : Niveaux plasmatiques de la LH et de la FSH chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine (Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM, Signification : α (0.05), > 0.05 ^{NS} , < 0.05*).	121
Tableau 4.6 : Niveaux plasmatiques de l'œstradiol chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine (Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM, Signification : α (0.05), > 0.05 ^{NS}).	122
Tableau 4.7 : Niveaux plasmatiques de la progestérone chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine (Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM, Signification : α (0.05), > 0.05 ^{NS}).	123

INTRODUCTION

Les troubles de la reproduction sont en partie liés aux déséquilibres nutritionnels et aux réserves corporelles. En effet, chez les animaux de rente, le lien entre la note d'état corporelle ou BCS (Body Condition Score) et les performances de la reproduction est prouvé [1]. En Algérie, la baisse de la production laitière et la mauvaise performance reproductive (notamment la baisse du taux de réussite à la première insémination) des vaches laitières importées comparées à leurs performances dans leur pays d'origine est principalement liée à l'alimentation [2–5]. Par ailleurs, chez la vache allaitante, lorsque le statut métabolique n'est pas adéquat au moment de la reprise de la cyclicité alors que les besoins énergétiques liés à la lactation augmentent brusquement, la durée de l'anoestrus *post partum* est allongée [6].

Dans l'espèce humaine, les femmes anorexiques et marathoniennes notamment, qui présentent un bilan énergétique négatif lié à un déficit du poids corporel, de même que les femmes en surpoids ou obèses sont prédisposées aux problèmes de fertilité [7]. L'effet négatif de l'obésité sur la fertilité fut décrit il y a plus de 2 000 ans par HIPPOCRATE, qui a écrit dans son Essai sur les Scythes : « *Un peuple d'une telle constitution ne peut pas être prolifique... L'obésité et la mollesse sont à blâmer !* ». Vu le développement épidémique mondial de l'obésité, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a décidé en 1997 de classer l'obésité comme une « maladie » et place actuellement sa prévention et sa prise en charge comme une priorité dans le domaine de la pathologie nutritionnelle [8,9]. Actuellement, l'obésité est la première maladie non infectieuse de l'Histoire.

La variation de la composition corporelle et plus particulièrement la réserve adipeuse, dans un sens comme dans l'autre a un effet négatif sur la fertilité, et un niveau minimum d'énergie stockée et facilement mobilisable est nécessaire pour assurer l'ovulation et les cycles menstruels ou œstraux [10]. Les mystères relatifs

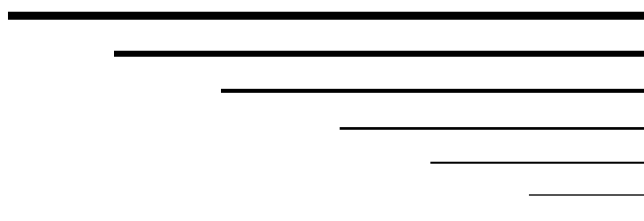
aux intermédiaires métaboliques mis en jeu dans les interactions nutrition / reproduction ont pu en partie être élucidés au cours des dernières années notamment avec la découverte de la leptine. Cette hormone peptidique principalement sécrétée par le tissu adipeux intervient principalement au niveau du métabolisme énergétique et a été la première adipokine faisant le lien entre l'état nutritionnel et la fonction reproductive. En effet, la leptine agit sur l'homéostasie en diminuant la prise alimentaire et en favorisant les dépenses énergétiques et la thermogénèse. Outre ses fonctions métaboliques, la mise en évidence des ARNm ob au niveau du placenta humain en 1997 [11] a renversé le statut de la leptine comme hormone adipocytaire, ce qui a ouvert de nouvelles voies d'études de la leptine en physiologie et en endocrinologie de la reproduction [12–14].

Ce travail est une contribution à l'étude de l'impact de la leptine sur le système reproducteur de la femelle du rat Wistar. Il a été réalisé dans le cadre d'un projet de recherche axé sur les interactions hormonales, engagé par une équipe de l'Endocrinologie du Laboratoire de Biologie et de Physiologie des Organismes (LBPO) de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari BOUMEDIENE (USTHB).

Après avoir abordé les connaissances bibliographiques relatives à la leptine, nous présenterons les actions physiologiques de cette hormone sur le système reproducteur femelle, en passant en revue l'anatomie de l'appareil reproducteur de la ratte et les différentes régulations hormonales.

Un essai d'interprétation et une discussion des résultats obtenus seront comparés avec ceux décrits à travers d'autres études.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE 1

LA LEPTINE : DE LA DECOUVERTE A LA REGULATION

1.1. Historique & Découverte

Dès les années cinquante, deux anomalies génétiques responsables d'une obésité furent identifiées chez la souris. Le premier modèle animal concerna des souris obèses (*ob/ob*), pesant 50% de plus que des souris de type sauvage, avec un excès de tissu adipeux, diabétiques et stériles. Un second type de modèle de souris hyperglycémiques (*db/db*: pour diabète), avec un excès de gras et stériles fut découvert plus tard [15].

En 1953, KENNEDY [16], émit l'*hypothèse lipostatique* selon laquelle les réserves de graisse corporelle communiqueraient avec notre cerveau par l'intermédiaire d'un messager produit par le tissu adipeux et circulant dans notre sang. Quelques années plus tard, l'existence d'une hormone régulatrice du poids corporel *via* l'hypothalamus fut démontrée par une expérience de parabiose chez le rat Zucker *fa/fa* (qui présente une déficience dans la transduction du signal de la leptine, *fa* pour fat) et la souris *ob/ob* [17,18]. La parabiose entre des souris normales, des souris *ob/ob* et des souris *db/db* (Fig. 1.1) montra que la circulation croisée du sang d'une souris normale chez une souris *ob/ob* diminuait la prise alimentaire et le poids corporel alors qu'elle était sans effet chez les souris *db/db*. Ces résultats suggéraient qu'il existerait une hormone présente chez les souris normales et active chez les souris déficientes génétiquement, capable de réguler la prise alimentaire et l'accumulation des réserves lipidiques [19,20]. Mais ce n'est qu'en 1994, grâce aux techniques de clonage moléculaire positionnel que ZHANG, de l'équipe de FRIEDMAN a identifié le gène *ob* (chez la souris puis chez l'homme) dont la mutation est responsable à l'état homozygote de l'obésité des souris *ob/ob* [21], ce qui a permis la synthèse un an plus tard par HALAAS [22], de la même équipe, de la protéine *ob* obtenue à partir de ce gène. Administrée *in vivo*

à des souris *ob/ob*, cette protéine recombinante a un puissant effet amaigrissant. Cette propriété physiologique adipocytaire satiétogène est à l'origine de l'appellation « *leptine* », du Grec « *leptos* » signifiant mince ou *Hormone de la satiété* [22,23]. Bien que l'hypothèse lipostatique de KENNEDY [16] sombra dans l'oubli pendant plus de quarante ans, la découverte de la leptine et les travaux de CABANAC et RICHARD [24] lui ont redonné vie (de la même façon que la température d'une pièce est régulée par un *thermostat*, notre masse adipeuse, serait régulée par un *lipostat*).

Le récepteur de la leptine fut cloné en 1995. En 1997, TARTAGLIA [25] décrit le récepteur hypothalamique de la leptine et MASUZAKI *et al.* [11] mettent en évidence des ARNm *ob* au niveau du placenta humain (majoritairement dans le syncytiotrophoblaste), cependant, le placenta n'est pas la principale source de production de leptine chez les rattes gravides [26].

Entre 1998 et 1999, ELMQUIST *et al.* [27,28] identifient les voies neuronales activées par la leptine dans le système nerveux sympathique, et plus précisément dans les cellules neuronales ventromédiales de l'hypothalamus.

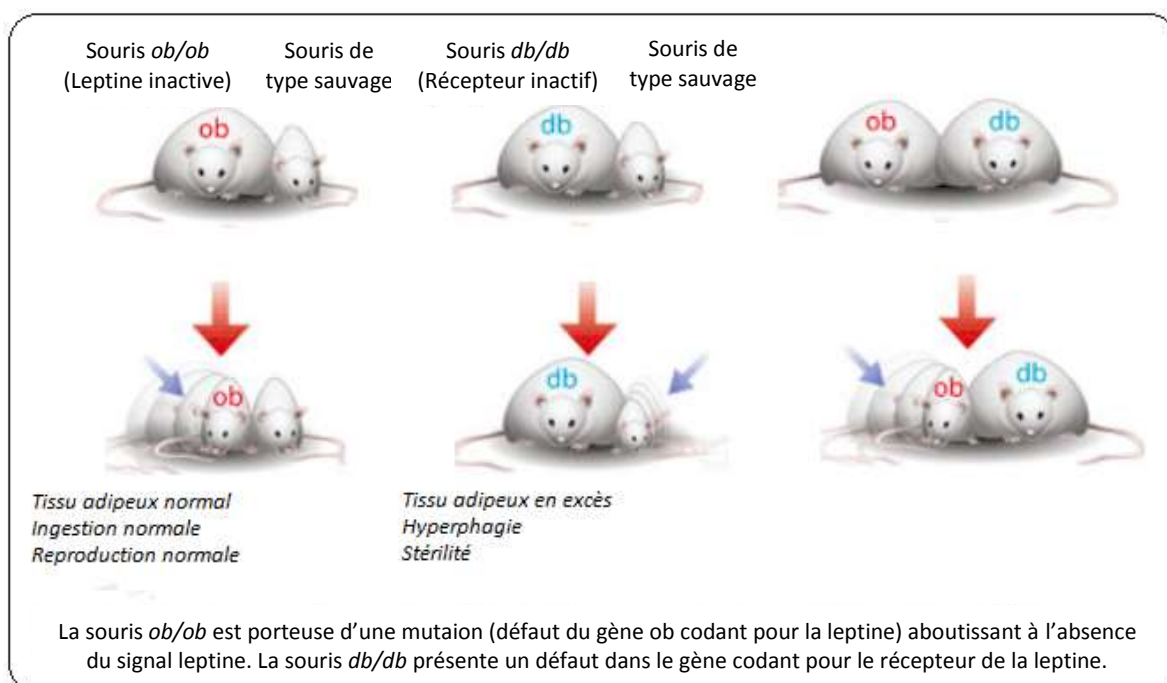


Figure 1.1 : Expériences de circulation croisée ou parabiose entre souris de type sauvage, souris *ob/ob* et souris *db/db*.

Adaptée de [29,30].

1.2. Structure & Synthèse

1.2.1. Gène codant : Gène ob

Le gène ob est localisé sur le chromosome 6 chez la souris, sur le chromosome 4 chez le rat. Il comporte environ 20 kilobases et est formé de trois exons séparés de deux introns. Le premier exon contient une seule séquence de 26 paires de bases non codantes. La région du promoteur mesure environ 3 kb. Cette région d'ADN est située en amont du gène et comporte un site de fixation de l'ARN polymérase qui assure la transcription de l'ADN en ARN. Cette région contient des séquences de régulation. La totalité de la région codante est située dans les exons 2 et 3 [31]. La leptine humaine présente 84% d'homologie avec la leptine de rat et 85% d'homologie avec celle de la souris. Les leptines de rat et de souris partagent 96% d'acides aminés communs [22,32].

Le gène ob code pour une protéine de 167 acides aminés chez la souris et 166 acides aminés chez l'homme. Après traduction, la protéine de 18 kDa perd la séquence signal amino-terminale, un pont disulfure carboxy-terminal se forme et la leptine mature qui est libérée dans la circulation ne comporte plus que 146 acides aminés de 16 kDa, ne subissant aucune modification post-traductionnelle. Chez le rat, une forme de 19 kDa a été identifiée dans des extraits gastriques [33].

L'expression du gène ob est contrôlée de façon opposée par : la protéine C/EBP α (CCAAT / *Enhancer Binding Protein alpha*) et les PPAR γ (récepteurs d'activateurs de la prolifération des peroxyosomes). La protéine C/EBP α se fixe sur une séquence (CCAAT) du promoteur du gène ob et l'active [34–36]. Le promoteur du gène ob présente aussi des éléments de réponse aux PPAR γ membres de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux. Les thiazolidinediones, ligands synthétiques des PPAR γ , réduisent l'expression du gène ob *in vivo* comme *in vitro* [37,38] en antagonisant l'activation du promoteur ob par la protéine C/EBP α [39].

1.2.2. Molécule : Protéine Ob

La séquence ob est compatible avec la structure de la famille des cytokines à hélices impliquées dans la communication intercellulaire [40]. Elle est voisine de

nombreux facteurs de croissance : l'Interleukine-2 (IL-2), l'Hormone de Croissance (GH), le LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) et le G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*). Les faisceaux d'hélices de la leptine, de l'hGH (*human Growth Hormone*), du LIF et du G-CSF sont hautement superposables. La leptine est formée d'un faisceau de quatre hélices α disposées de façon antiparallèles, reliées par des boucles de connexion et une courte hélice (quasiment perpendiculaire aux quatre autres) qui lui confèrent une forme globulaire (Fig. 1.2) [40,41]. La partie N-terminale de la protéine est indispensable à l'activité biologique de la leptine. Elle comporte un pont disulfure entre les cystéines 96 et 146, qui serait important pour la sécrétion, la stabilité et la solubilité de la leptine [42,43].

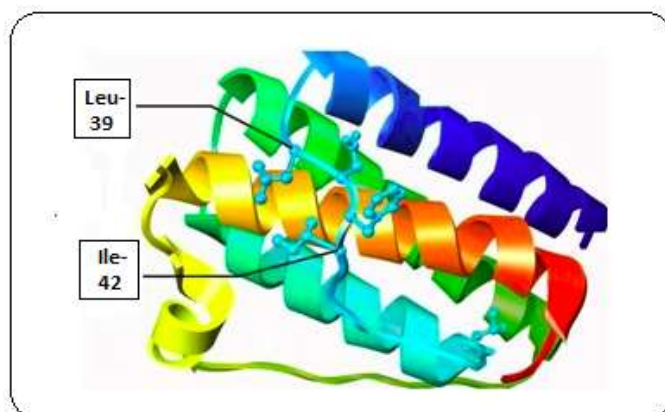


Figure 1.2 : Structure de la leptine [41].

1.3. Métabolisme

1.3.1. Sécrétion

Chez les mammifères, la leptine est principalement produite par le tissu adipeux blanc, et plus faiblement par le tissu adipeux brun [21]. Pour un même individu, les taux d'ARNm ob dans le tissu adipeux varient d'une région à une autre. Le tissu adipeux sous-cutané représente 80% de la totalité des tissus graisseux, il constitue la source majeure de leptine et en sécrète plus que le tissu mésentérique [44]. L'expression du gène ob est induite pendant la différenciation et la maturation des adipocytes [35,45,46]. La concentration plasmatique de leptine dans la veine abdominale qui draine le tissu adipeux sous-cutané est plus élevée que dans l'artère radiale, ce qui suggère que la leptine est sécrétée dans le sang qui s'enrichit en leptine après son passage par le tissu adipeux [47].

La muqueuse fundique du rat [33] et les cellules épithéliales gastriques humaines sécrètent elles aussi la leptine et expriment ses récepteurs [48–50].

L'identification des ARNm ob dans l'hypothalamus humain et l'augmentation des niveaux de leptine dans le retour veineux du cerveau suggèrent que le système nerveux central (SNC) est une source de leptine [51]. Le gène ob est par ailleurs exprimé dans le muscle squelettique des rongeurs [35,52], le foie de gallinacés et les cellules stellaires du foie mises en culture et activées [53,54].

1.3.2. Cinétique

La leptine circulante est un monomère mais pourrait exister sous forme de dimère ou de tétramère. Elle se présente sous forme libre ou liée à des protéines [55]. Sa demi-vie varie entre 25 minutes et 3 heures selon l'espèce [56,57]. Bien que le taux circulant de leptine soit toujours corrélé avec l'Indice de Masse Corporelle (IMC ou *Body Masse Index*) [58–60], la clairance et la demi-vie de l'hormone ne sont pas liées à l'adiposité [56,57]. Une demi-vie de quelques minutes reste comparable à d'autres hormones protéiques, en l'occurrence la GH, ce qui explique que le taux de leptine plasmatique peut varier rapidement en fonction de la balance énergétique [47].

1.3.3. Distribution

Après sa libération dans la circulation, la leptine est rapidement distribuée dans l'espace extracellulaire. Elle s'accumule ensuite dans l'eau cellulaire ou se lie à des tissus ou à une protéine de transport soluble [61].

1.3.4. Transport

Le rapport $[Leptine]_{LCS} / [Leptine]_{plasma}$ (LCS :Liquide Cérébro-Spinal) plus élevé chez les sujets minces par rapport aux sujets obèses (et hyperleptinémiques) suggère la présence d'un système de transport saturable spécifique [57]. Après injection intraveineuse de leptine, celle-ci se localise au niveau du plexus choroïde, l'éminence médiane (ME) et le noyau arqué (ARC), sites de capture de l'hormone. Les capillaires situés dans les *organes circumventriculaires* présents

au niveau de l'éminence médiane du cerveau sont fenestrés, ce qui permet à des molécules de grande taille de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et d'entrer librement dans le LCS sans mécanisme de transport. Il n'est donc pas certain que l'action de la leptine dans le SNC nécessite un système de transport spécifique (*Cf. 1.4.4. Transport de la leptine vers le SNC*).

1.3.5. Clairance

Les poumons, les organes splanchniques (foie, rate et intestin grêle) et les muscles ne sont pas à l'origine d'une clairance significative. Comme pour l'IL-2, 80% de l'élimination de la leptine à partir du plasma se fait par le rein [62]. L'ARNm du récepteur de la leptine étant hautement exprimé dans le rein [63], un transport faisant intervenir le récepteur est nécessaire à la capture et au catabolisme de la leptine [64,65]. La dégradation de la leptine au niveau rénal va de pair avec la disparition de l'hormone du plasma, indépendamment de la filtration glomérulaire [66,67]. La taille moléculaire de la leptine est trop grande pour être filtrée par les glomérules, c'est pourquoi, l'excrétion urinaire est négligeable et l'urine ne dégrade pas cette hormone [66].

1.4. Récepteurs & Mécanismes d'action

1.4.1. Récepteur Ob-R

Le gène *db* code pour le récepteur à la leptine. Les gènes murin et humain du récepteur de la leptine ont été clonés un an après le clonage du gène *ob* dans des cellules COS-7 (lignées cellulaires fibroblaste-like dérivées du tissu rénal de singe) transfectées avec une banque d'ADN complémentaire préparée à partir du plexus choroïde de souris [63]. Les gènes des récepteurs *ob* (*Ob-R*, encore appelés *Lep-R*) ont été cartographiés sur le chromosome 4 chez la souris et le chromosome 5 chez le rat. Ils sont localisés respectivement sur le locus *db* et le locus *fa* [63,68]. L'analyse génomique a montré que les gènes *db*, *fa* et *Ob-R* étaient identiques [69]. Le gène du récepteur *ob* comprend 18 exons :

- les 15 premiers exons codent pour la partie extracellulaire du récepteur ;
- l'exon 16 code pour le domaine transmembranaire ;
- les exons 17, 18a et 18b codent pour les parties intracellulaires [70].

Le récepteur Ob-R est apparenté à la classe I de la super-famille des récepteurs de cytokines. Il possède un seul domaine transmembranaire. La partie intracellulaire du récepteur présente de nombreuses analogies plus particulièrement avec la chaîne gp130, l'un des composants des récepteurs du G-CSF et du LIF [63,71].

1.4.2. Isoformes naturelles du récepteur Ob-R

Le récepteur murin est constitué d'une longue chaîne extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique. Au moins six isoformes résultant d'un épissage alternatif ont été identifiées : Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re (chez la souris) et Ob-Rf (chez le rat). Elles se distinguent par la taille de leur partie intracellulaire (Fig. 1.3). Les récepteurs courts partagent avec la forme longue les domaines extracellulaires, transmembranaires et au moins les 29 premiers acides aminés de la partie intra cytoplasmique. L'isoforme longue Ob-Rb est une protéine transmembranaire contenant des motifs peptidiques nécessaires à l'activation des signaux de transduction [63], ces derniers étant partiellement défectés dans les quatre isoformes courtes Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Rf [68,70,72]. Les récepteurs Ob-Ra, Ob-Rb et Ob-Re lient la leptine avec une affinité de l'ordre du nanomolaire [63,73]. L'isoforme Ob-Ra semble jouer un rôle de transporteur de la leptine du sang vers le LCS ainsi que du placenta vers le fœtus [68,74]. L'isoforme Ob-Re ne possède pas de domaine transmembranaire, c'est la forme soluble du récepteur souvent glycosylée [68,70], elle jouerait probablement un rôle dans l'inactivation de la leptine circulante et son transport [75].

La partie extracellulaire est commune à toutes les isoformes et comprend : deux domaines CK (*Cytokine receptor domain*) « Trp-Ser-X-Trp-Ser » (WSXWSX) et un domaine F3 (*Fibronectin III domain*). Seul le second domaine CK est indispensable pour la liaison de la leptine et l'activation du récepteur Ob-R [76,77].

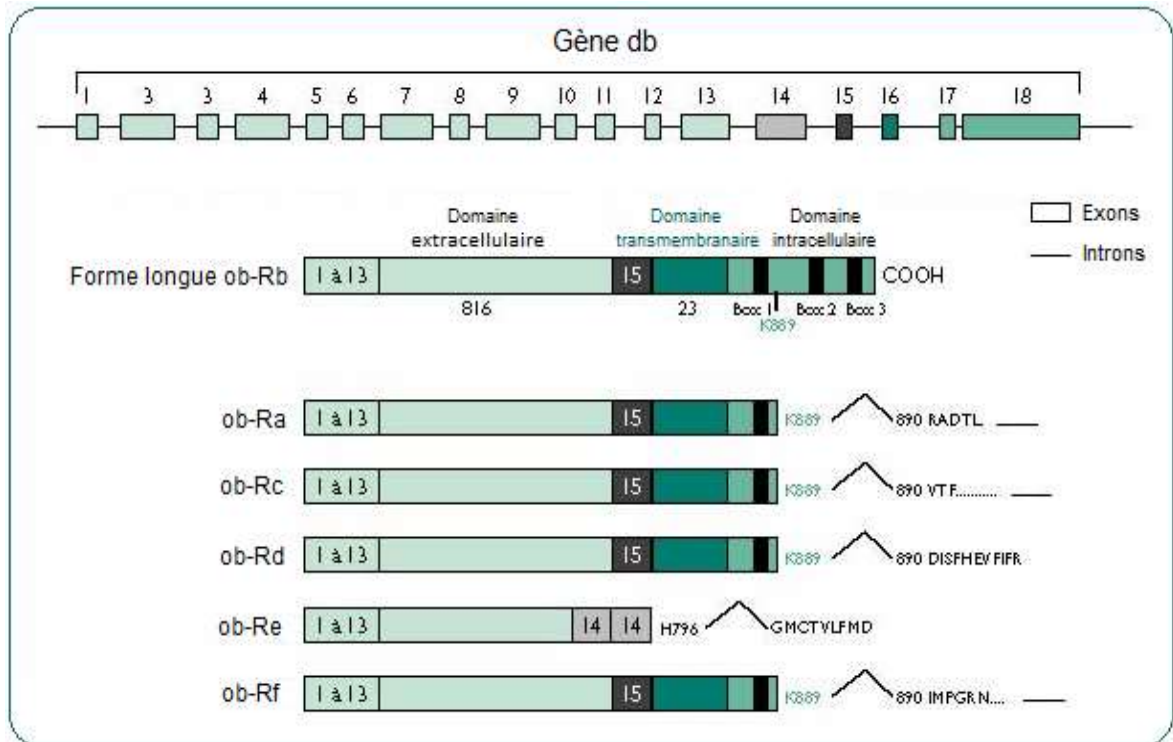


Figure 1.3 : Structure du gène db et des différentes isoformes du récepteur Ob-R résultant d'un épissage alternatif du gène [78].

1.4.3. Distribution tissulaire des récepteurs

La distribution tissulaire des ARNm du récepteur révèle une expression relativement ubiquiste avec des variations interspécifiques. Chez les rongeurs et chez l'homme, le récepteur Ob-R (majoritairement *Ob-Rb*) est fortement exprimé dans l'hypothalamus (Fig. 1.4) avec comme principaux sites d'expression : l'ARC (sur les neurones à neuropeptide Y ou NPY), le noyau ventromédian (VMH) et le noyau dorsomédian (DMH). Les neurones sensibles à la leptine dans l'ARC se projettent vers le noyau paraventriculaire et le noyau hypothalamique latéral [79]. Les noyaux : arqué, ventromédian, dorsomédian, latéral et paraventriculaire interviennent dans la régulation du poids corporel et le comportement sexuel [68,79–82].

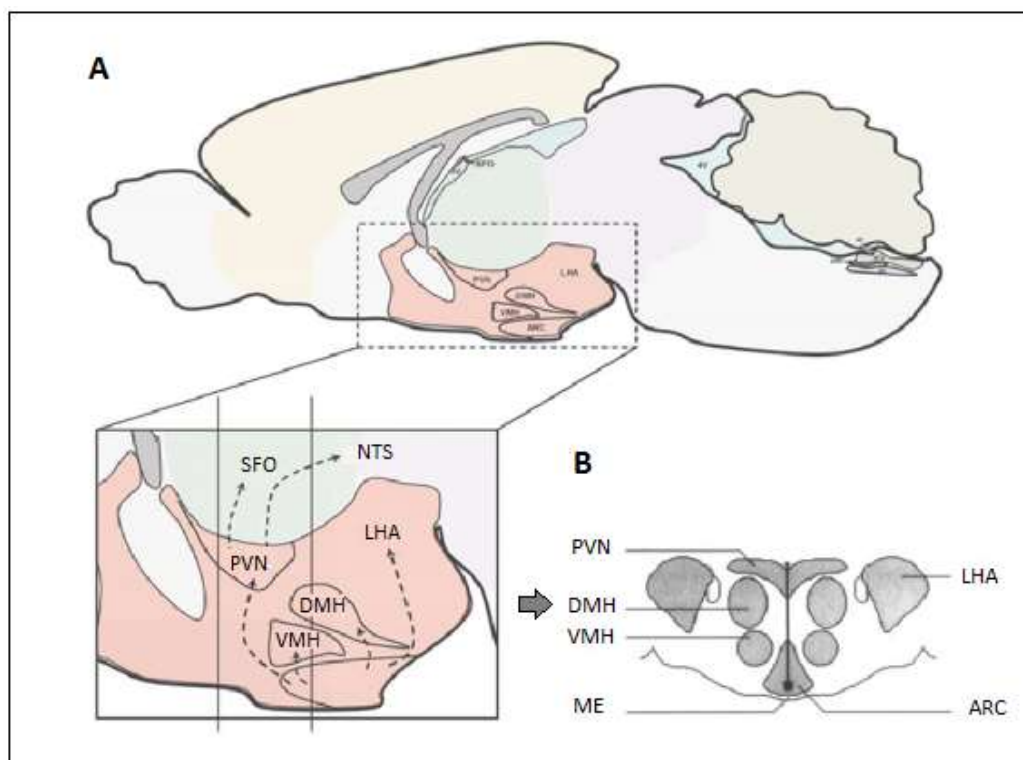


Figure 1.4 : Anatomie de l'encéphale de rat.

A : Coupe sagittale, B : Coupe frontale. ARC : Noyau arqué, DMH : Noyau dorso-médian, LHA : Aire hypothalamique latérale, ME : Eminence médiane, NTS : Noyau du tractus solitaire, PVN : Noyau paraventriculaire, SFO : Organe subfornical, VMH : Noyau ventro-médian [83,84] in [85].

La leptine agit aussi sur les tissus périphériques par l'intermédiaire des isoformes courtes du récepteur qui présentent, comme l'isoforme longue, une distribution ubiquitaire, avec une forte expression d'Ob-Rb dans le poumon, la rate, le rein, le muscle et une plus faible expression dans le tissu adipeux, les organes reproducteurs, le placenta, le cœur et les ganglions lymphoïdes [63,64,75,86–88]. Les récepteurs Ob-R sont également présents dans le pancréas [86,89,90], le foie et les surrénales [64]. Ob-Re a pu être retrouvé au niveau du tissu adipeux, l'hypothalamus, le thymus, le cœur, le foie et les testicules [91].

1.4.4. Transfert de la leptine vers le SNC

Les cytokines circulent dans le courant sanguin liées à des protéines qui peuvent modifier leur clairance ou leur activité biologique [92]. La leptine circule à 95%

sous forme libre et à moins de 5% liée à une protéine porteuse qui semble constituée de l'ectodomaine du récepteur de la leptine [25]. Elle peut par la suite :

- ✓ soit emprunter la voie de transport trans-endothéliale de la BHE et le LCS, grâce à un système spécifique unidirectionnel et saturable constitué de formes courtes d'Ob-R, qui permet à la leptine d'avoir accès aux régions de l'hypothalamus dans lesquelles se situent les neurones cibles ;
- ✓ soit atteindre directement certaines structures hypothalamiques notamment la partie médiobasale de l'hypothalamus (MBH) en traversant les pores ouverts dans le système vasculaire cérébral au niveau de l'éminence médiane : ce transport semble nécessiter les tanocytes, cellules gliales hautement spécialisées, localisée à la base du 3^{ème} ventricule (3V) et constituant la porte d'entrée de la leptine dans le cerveau. Ces cellules capturent la leptine circulante à partir des vaisseaux sanguins qui, à cet endroit, ont la particularité de la laisser passer (Fig. 1.5, étape 1). Lors de son parcours dans le tanocyte, la leptine active une voie de signalisation « ERK » ou *Extracellular-Regulated Kinase* (Fig. 1.5, étape 2) qui enclenche sa libération dans le LCS (Fig. 1.5, étape 3). La leptine active alors les zones cérébrales qui véhiculent son action anorexigène (Fig. 1.5, étape 4) [93].

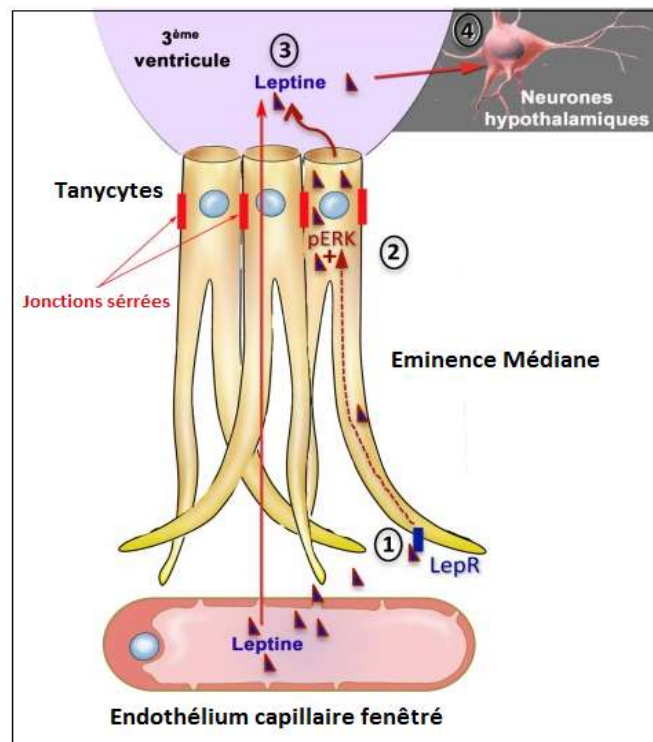


Figure 1.5 : Transport de la leptine *via* les tanocytes [93].

1.4.5. Liaison Leptine / Ob-R & Transduction du signal

Deux principales voies de signalisation intracellulaires de transduction sont activées par la fixation de la leptine à son récepteur (au niveau des motifs WSXWS) : la voie des JAK/STAT (*Janus Kinases / Signal Transducers and Activators of Transcription*) et la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) [94,95]. D'autres voies de signalisation intracellulaires secondaires activées par la leptine, indépendantes de son rôle central dans l'homéostasie énergétique ont été évoquées telles que la voie de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) et la voie PI3K/PDE3B/AMPC (*Phosphoinositide 3-Kinase / Phosphodiesterase 3 / Adénosine Monophosphate cyclique*) notamment [96].

1.4.5.1. Voie des JAK/STAT

La partie cytoplasmique d'Ob-Rb contient trois motifs peptidiques [97] :

- Boîte 1 et Boîte 2 : elles interagissent avec les protéines JAK. Seule la Boîte 1 est conservée chez les différentes isoformes transmembranaires [68] ;
- Boîte 3 « YXXQ » : elle correspond au site de liaison de STAT3 (Fig. 1.6).

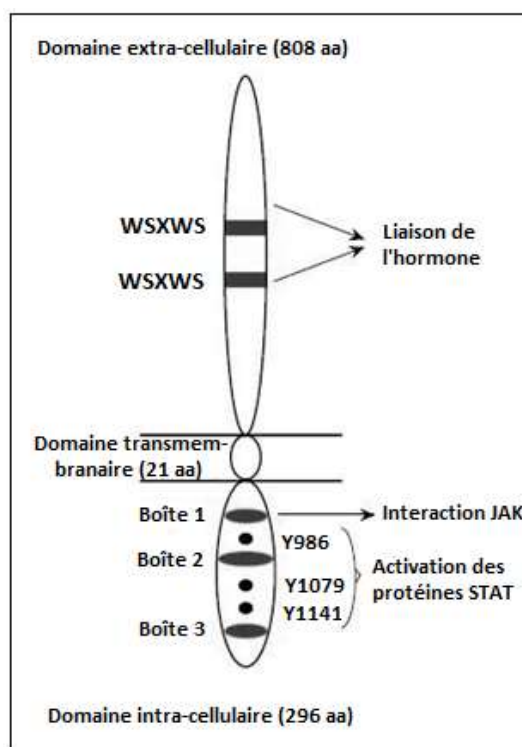


Figure 1.6 : Représentation schématique du récepteur de la leptine de poulet.

Les boîtes 1, 2 et 3 (ou box) ainsi que les résidus tyrosine Y986, Y1079 et Y1141 sont impliqués dans l'activation des facteurs de transcription STAT [97]. aa : Acides aminés.

La liaison de la leptine à son récepteur active l'association : JAK-2 tyrosine kinase qui phosphoryle les résidus de tyrosine intracellulaire du récepteur. Cette stimulation est abolie lorsque le motif Box1 est muté [98–101]. Les tyrosines servent de points d'ancrage pour les facteurs de transcription cytoplasmiques STAT3 qui ne se fixent sur ces résidus que s'ils sont phosphorylés. Cette phosphorylation induit la dimérisation des facteurs de transcription : chaque protéine contient un domaine SH2 (*Src Homology region 2* : domaine protéique structurellement conservé contenu dans l'oncoprotéine Src et dans de nombreuses autres protéines de transduction du signal intracellulaire) qui s'associe avec la tyrosine phosphorylée d'une autre molécule STAT3 pour former un dimère. Ce dernier migre vers le noyau et agit comme facteur de transcription, favorisant l'expression de gènes tels que le NPY. STAT3 induit également l'expression de SOCS-3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 3*), une protéine qui agit comme un régulateur négatif de la voie JAK/STAT. SOCS-3 inhibe le processus de transduction du signal de diverses cytokines dans le corps, y compris la leptine. L'expression de SOCS-3 est induite par la leptine et l'activation de SOCS-3 inhibe la phosphorylation de STAT3 qui est importante dans la transmission du signal sur les récepteurs de la leptine. Une telle inhibition entraînera une résistance à la leptine caractérisée par un dysfonctionnement de sa fonction biologique [102]. La PTP1B (*Protein tyrosine phosphatase 1B*) est une autre protéine qui régule négativement la voie STAT/JAK et par conséquent les voies de signalisation de la leptine et de l'insuline [103]. La leptine induit *via* l'activation de JAK2, la phosphorylation des IRS (*Insulin-Receptor Substrate*) qui activent à leur tour les phosphatidylinositol-3 kinases [100] (Fig. 1.7).

La leptine induit l'activation des STAT1, STAT3, STAT5 et STAT6 dans différentes lignées cellulaires [99,104–108]. Chez le rat, l'injection de leptine engendre une activation des protéines STAT1 uniquement au niveau de l'adipocyte [109]. L'injection de leptine active STAT3 dans l'hypothalamus, et STAT1, STAT3 et STAT5 dans l'intestin chez les souris normales et *ob/ob*, mais pas chez les souris *db/db* ce qui indique que seule l'isoforme longue du récepteur est capable d'activer cette voie [94,110]. Dans la lignée épithéliale intestinale humaine CaCO-2, la leptine active les STAT3 et STAT5 [110]. Dans les cellules CHO (lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine) transfectées de façon à

surexprimer les isoformes Ob-Rb ou Ob-Ra, de même que dans la lignée épithéliale intestinale CaCO-2 exprimant le récepteur Ob-Rb, la leptine induit l'expression des gènes à activation précoce immédiate : c-fos, c-jun et jun-B [110,111]. Néanmoins, les résultats *in vivo* concernant l'activation de c-fos restent divergents [110,112,113].

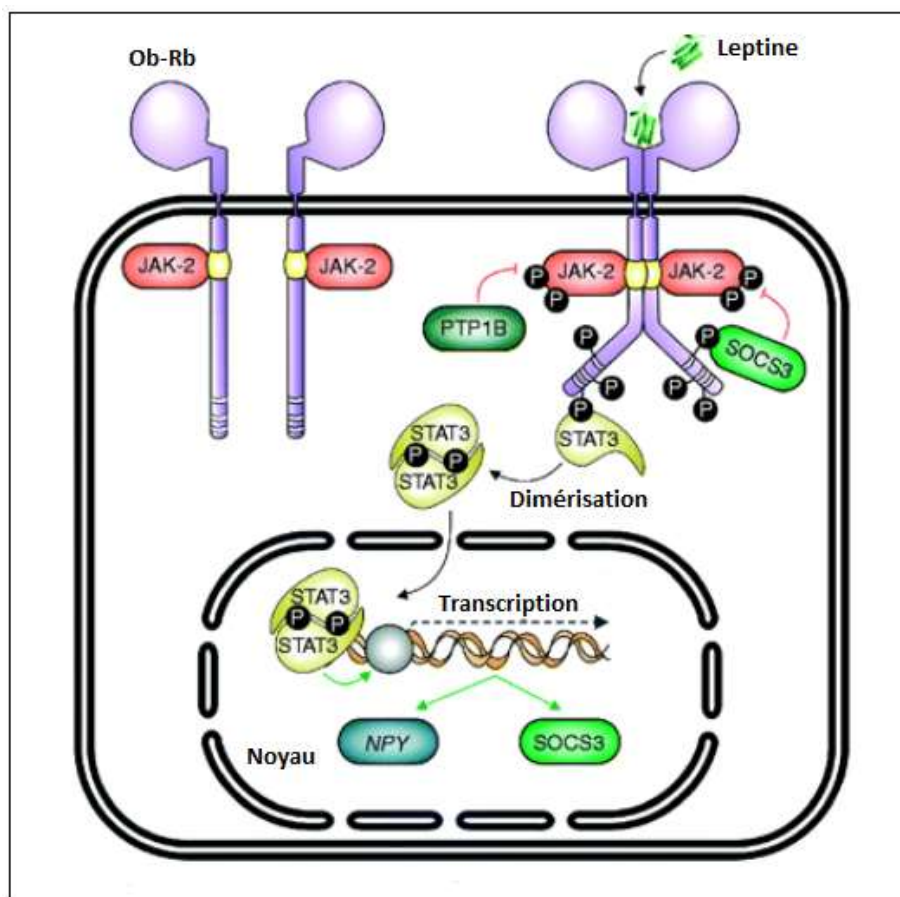


Figure 1.7 : Activation de la cascade des JAK et des STAT.

Les protéines JAK2 sont associées à une séquence peptidique de la partie intracellulaire du récepteur Ob-R proche de la membrane cellulaire et sont phosphorylées après liaison du ligand à son récepteur. Les JAK fonctionnent comme une tyrosine kinase phosphorylant la chaîne intracellulaire du récepteur qui devient alors un site de liaison pour des protéines cytoplasmiques STAT. Adaptée de [114].

1.4.5.2. Voie des MAP Kinases (MAPK)

Suite à son activation par phosphorylation, la protéine SHP-2 (qui est une protéine tyrosine phosphatase) déclenche une cascade d'événements qui induisent

l'activation des MAPK. Ces dernières peuvent à leur tour induire l'activation de protéines nucléaires, dont certains facteurs de transcription. *In vitro*, la leptine augmente l'activité MAPK dans les lignées murines embryonnaires C3H10T1/2 et dans les lignées de cellules β pancréatiques [115,116]. Dans la lignée humaine endothéliale HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), la leptine mène à l'activation de deux classes de MAPK :

- ERK : dont l'activation augmente la prolifération cellulaire (Fig. 1.8) ;
- JNK-SAPK (*NH2-terminal c-jun Kinase / Stress-Activated Protein Kinase*) : activée suite à l'induction d'un stress oxydatif en présence de leptine [117,118].

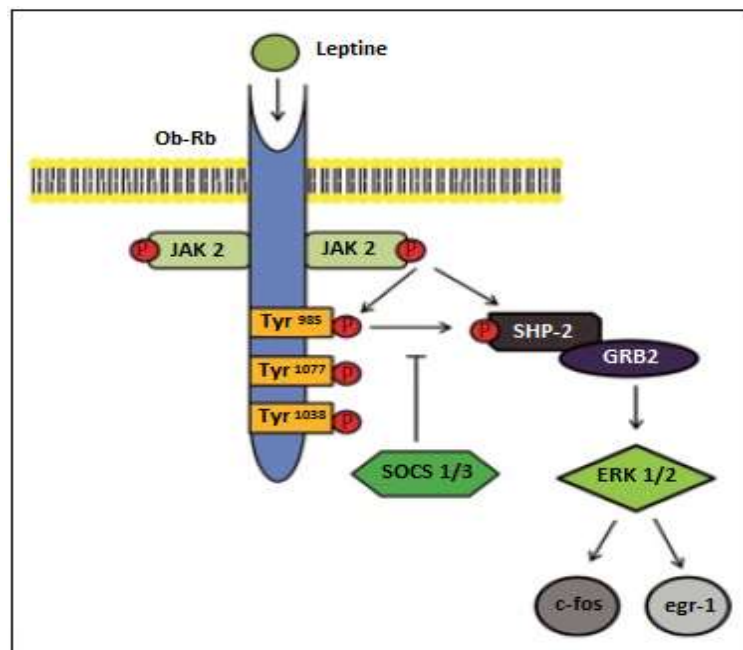


Figure 1.8 : Leptine et voie ERK.

Adaptée de [119].

1.5. Facteurs régulant la sécrétion de la leptine

1.5.1. Facteurs individuels

1.5.1.1. Masse corporelle

Bien que la leptinémie soit fortement corrélée avec la masse grasse corporelle, à IMC équivalent, la leptinémie peut varier fortement d'un individu à un autre [58,59]. Une perte de poids corporel de 10% chez un sujet obèse induit une réduction de

50% de la leptinémie [59]. En revanche, un gain de poids de 10% provoque une augmentation de 300% de la leptinémie [120].

1.5.1.2. Age

La relation entre la leptinémie et l'âge serait plutôt indirecte et liée à l'augmentation de la masse grasseuse avec l'âge. Chez les rats obèses et normopondéraux, l'expression des ARNm ob adipocytaires augmente avec l'âge indépendamment de l'augmentation de l'adiposité [75,121].

1.5.1.3. Sexe

La leptine est synthétisée *in utero* et le niveau de leptine circulante est lié au schéma de croissance intra-utérin [122]. Les différences entre les sexes dans les niveaux de leptine foétale ne sont pas dues à la teneur en graisse corporelle ou à sa distribution, ni au statut hormonal de reproduction, mais plutôt aux différences génétiques qui existent entre les mâles et les femelles [123].

1.5.2. Facteurs environnementaux

1.5.2.1. Cycle nycthéral

La leptinémie varie au cours du nycthéral chez les rongeurs et chez l'homme avec des pics nocturnes [124–127]. Les variations circadiennes de la leptinémie montrent qu'elle est plus élevée entre minuit et les premières heures du matin et est plus basse entre midi et le milieu de l'après-midi, selon un profil d'évolution qui évoque la prolactine (PRL), la TSH (Thyroid-stimulating hormone) et les acides gras libres [125,127].

1.5.2.2. Photopériode

Chez le rat, des injections de mélatonine entraînent la diminution de l'adiposité, de l'insulinémie et de la leptinémie [128]. Chez les espèces à activité sexuelle saisonnière, les variations de la leptinémie dues à la photopériode permettraient l'adaptation aux contraintes liées à l'environnement et à la disponibilité alimentaire [129–132].

1.5.2.3. Acclimatation au froid

L'adaptation au froid provoque une diminution de la leptinémie (comparable à celle induite par un jeûne de 16 heures) et une augmentation de l'ingestion pour la thermogénèse [133].

1.5.3. Facteurs humoraux

1.5.3.1. Insuline

L'insuline est un puissant régulateur de l'expression du gène *ob* par action directe sur les adipocytes, et la présence de récepteurs de la leptine au niveau du pancréas endocrine laisse penser que la leptine est capable de moduler à son tour la sécrétion de l'insuline. En effet, les adipocytes cultivés *in vitro* en l'absence d'insuline présentent une baisse drastique de l'expression de l'ARNm *ob* et de la sécrétion de leptine qui est restaurée après addition d'insuline [46,124]. Chez les rongeurs, l'administration périphérique d'insuline provoque une stimulation de l'expression de l'ARNm *ob* adipocytaire et de la leptinémie [124,134] et une baisse prolongée (de 2 à 3 jours) de l'insulinémie provoque un freinage de l'expression de l'ARNm *ob* chez le rat [135]. La leptine contrôle l'hypersécrétion d'insuline postprandiale. Elle normalise l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie des souris *ob/ob* à des doses qui n'induisent pas de perte de poids [23]. Son administration par voie périphérique provoque une baisse de l'insulinémie (sauf chez les souris *db/db* et les rats *fa/fa*) [86,136].

1.5.3.2. Glucocorticoïdes & Neuropeptide Y

La déficience en glucocorticoïdes augmente l'action anorexigène et la perte de poids induites par l'insuline et la leptine [137]. L'administration intracérébrale du NPY provoque chez le rat une surexpression du gène *ob* dans le tissu adipeux, en rapport avec l'augmentation des concentrations plasmatiques de l'insuline et de la corticostérone [138]. En outre, la surrénalectomie réduit la synthèse de la leptine à partir du gène *ob* dans le tissu adipeux blanc [139]. *In vitro*, le traitement des adipocytes par des glucocorticoïdes induit une augmentation rapide de l'expression du gène *ob* et de la sécrétion de la leptine [140,141]. Chez l'homme

et le rat, l'administration de glucocorticoïdes provoque une augmentation de la leptinémie [140,142–144]. Par ailleurs, les patients souffrant du syndrome de Cushing ont une leptinémie élevée et un appétit augmenté en raison de la forte production du NPY et du cortisol [11], alors que les effets de la leptine sont à leur maximum en l'absence de ces deux molécules [145].

1.5.3.3. Agonistes β 3 adrénergiques

Chez l'homme, les récepteurs β 3 adrénergiques sont principalement exprimés dans les tissus adipeux péri-rénaux et omentaux alors qu'ils sont présents majoritairement dans les tissus adipeux blanc et brun chez les rongeurs [146]. Ces catécholamines en augmentant l'AMPc intracellulaire diminueraient l'expression du gène ob [147] et réduiraient la concentration en leptine [148].

1.5.3.4. GH & Facteurs de croissance

Les IGF-1 et IGF-2 (*Insuline-like Growth Factors*) sont des facteurs de croissance principalement produits par le foie sous l'influence de la GH. Chez les rongeurs, la diminution de la sécrétion de la GH et des IGF-1 consécutive au jeûne peut être limitée par l'administration intracérébrale de leptine [149]. Il a été noté que la leptinémie était directement affectée par l'IGF-1 et la PRL chez le rat [150]. Même si l'incubation d'adipocytes isolés avec la GH est sans effet sur l'expression et la sécrétion de leptine, chez l'homme, le traitement de malades adultes avec de faibles doses de GH provoque une baisse des concentrations plasmatiques de leptine en rapport avec la réduction des stocks de graisse dans l'organisme [151]. Chez le rat, l'administration centrale de leptine induit une diminution de la sécrétion de somatostatine (GHIH ou SRIF) au niveau hypothalamique [152], et le traitement par la leptine *in vitro* sur des neurones hypothalamiques de rat foetal réduit l'expression et la libération de la somatostatine [153].

1.5.3.5. Nutriments

Le glucose comme l'insuline stimulent la transcription du gène de la leptine alors que les acides gras polyinsaturés l'inhibent [154]. L'hyperglycémie ou un taux

d'acides gras libre élevé induit une concentration élevée de la glucosamine responsable de l'activation de l'expression du gène ob dans le muscle et dans le tissu adipeux [155]. Chez les rongeurs, l'administration périphérique aiguë intrapéritonéale ou intraveineuse de glucose provoque une augmentation de l'expression et de la libération de leptine [134] mais pas chez l'homme [156].

1.5.3.6. Cytokines

Chez des rongeurs à jeun [157,158] comme chez l'homme [159,160], l'administration de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et TNF : *Tumor Necrosis Factor*) entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de leptine qui joue un rôle dans la réponse aiguë de l'inflammation [91] et participe au maintien du processus inflammatoire [48]. En outre, la leptinémie est trois fois plus élevée chez les malades ayant souffert d'un stress sévère comme la septicémie [161].

CHAPITRE 2

SYSTEME REPRODUCTEUR DE LA RATTE : ANATOMIE, PHYSIOLOGIE & REGULATION

2.1. Généralités

La leptine intervient dans de nombreux processus physiologiques liés à la distribution ubiquitaire des ARNm de ces récepteurs Ob-R. Outre le contrôle métabolique, la leptine est impliquée dans la réponse immunitaire, l'inflammation [162], la stimulation de l'angiogenèse [117,163–165], le contrôle de la pression artérielle, l'hématopoïèse [162,166], l'ostéogénèse mais aussi dans le déclenchement de la puberté et la reproduction [165,167–171]. La leptine joue un rôle crucial dans la physiologie du système reproducteur. De par son rôle de « *messenger* », elle renseigne l'axe hypothalamo-hypophysaire sur les réserves énergétiques disponibles qui permettent ou pas d'assurer une éventuelle

fécondation, gestation et lactation très coûteuses en énergie [6]. L'objectif de ce travail est d'analyser son impact sur la fonction ovarienne chez la ratte.

2.2. Appareil reproducteur de la ratte

L'appareil génital de la ratte (Fig. 2.1) comprend deux ovaires et un tractus génital constitué d'une :

- partie gestative : comprenant deux oviductes et deux cornes utérines ;
- portion copulatrice : comprenant un vagin, le vestibule vaginal et la vulve.

Le tissu mammaire est très vaste et s'étend dorsalement sur toute la longueur du tronc jusqu'à la ligne délimitée par le bord dorsal des omoplates. La ratte possède six paires de mamelles, trois paires en région pectorale, une paire abdominale et deux paires inguinales [172,173].

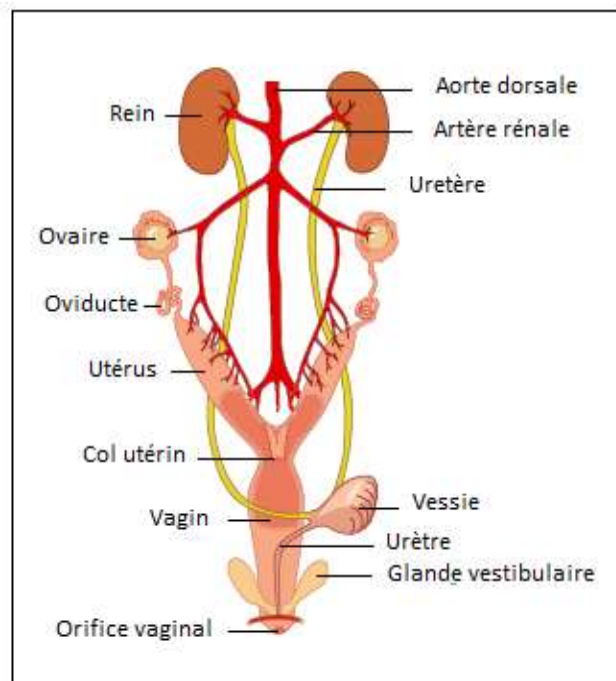


Figure 2.1 : Organes uro-génitaux de la ratte.

Adaptée de [174].

2.2.1. Ovaire

L'ovaire de la ratte est un organe ovoïde et bosselé enfermé dans la bourse ovarique formée par le mésovarium et le mésosalpinx [175]. Il est situé juste en arrière des reins et est constitué d'une :

- zone périphérique : le *cortex ovarien*, formé d'un épithélium pavimenteux ou cubique, de la tunique albuginée, de follicules ovariens à différents stades du développement et d'un stroma ;
- zone interne : la *zone médullaire*, contenant de nombreux vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs [176].

2.2.2. Oviducte

L'oviducte encore appelé trompe de Fallope ou Salpinx est sinueux et lié au segment propre de l'ovaire [172]. Chaque oviducte comprend quatre segments anatomiques [173] :

- l'infundibulum ou pavillon : qui s'ouvre dans la bourse ovarique, il sert d'entonnoir et possède des projections en forme de doigts ;
- l'ampoule : portion légèrement dilatée, lieu de la fécondation situé entre l'infundibulum et l'isthme ;
- l'isthme : portion étroite musculaire rejoignant l'utérus ;
- la portion intra-murale ou interstitielle s'ouvrant dans la cavité utérine.

La paroi de la trompe comprend trois couches disposées concentriquement de la lumière à la périphérie :

- la muqueuse formée d'un épithélium cylindrique simple comportant des cellules ciliées et des cellules sécrétrices non ciliées reposant sur un chorion de tissu conjonctif richement vascularisé mais dépourvu de glandes ;
- la musculuse formée de deux couches de cellules musculaires lisses : une couche interne circulaire et une couche externe longitudinale ;
- une séreuse épaisse riche en vaisseaux et en nerfs [176].

L'oviducte permet la captation de l'ovule et assure le transport et la survie des spermatozoïdes, de l'ovocyte II et du zygote.

2.2.3. Utérus

L'utérus est le lieu d'implantation de l'ovule fécondé et de développement de l'embryon en fœtus [177]. Chez la ratte, l'utérus présente une morphologie de type

bicornis (deux cornes utérines et un seul canal cervical ou *Cervix*) [173]. La paroi utérine est composée de la lumière à la périphérie de [176] :

- L'endomètre : muqueuse qui présente d'importantes variations structurales selon la portion d'utérus considérée et selon le stade du cycle sexuel ou de la vie génitale. L'endomètre joue un rôle important dans la nidation et dans la constitution du placenta qui est *discoïde* chez la ratte.
- Le myomètre : musculature comportant une couche musculaire lisse interne et une couche superficielle externe séparées par un tissu conjonctif contenant un important plexus vasculaire ainsi que de nombreuses fibres nerveuses végétatives et élastiques. Le myomètre intervient au moment de la parturition grâce à sa contractilité hormono-dépendante.
- Une séreuse constituée d'un tissu conjonctif lâche riche en fibres.

Le col utérin comporte des glandes utérines, un chorion riche en fibres de collagène et une musculature.

2.2.4. Vagin

La ratte possède un vagin de type *simplex*. Il s'agit d'un conduit cylindrique musculo-membraneux qui s'étend du col de l'utérus à la vulve. Il comporte [176] :

- une muqueuse comprenant un épithélium malpighien pavimenteux stratifié et un chorion formé d'un tissu conjonctif caractérisé par la présence de fibres élastiques, de cellules lymphoïdes et de nombreux vaisseaux sanguins ;
- une musculature formée de cellules musculaires lisses entre lesquelles se trouve un tissu conjonctif riche en fibres élastiques ;
- une adventice conjonctive riche en fibres élastiques.

Le rôle du vagin est mécanique : il reçoit le pénis au cours du coït, favorise l'ascension des spermatozoïdes par ses contractions et se distend au moment de la parturition permettant le passage du nouveau-né.

2.2.5. Vestibule vaginal & Vulve

Ils correspondent à la partie caudale du vagin (où se rejoignent les systèmes reproducteur et urinaire), qui débute au niveau de l'ouverture urétrale et se termine au niveau de la vulve qui correspond à la partie visible de l'appareil

reproducteur femelle. On retrouve dans le vestibule la fosse clitoridienne dans laquelle se trouve le clitoris [176]. Il n'y a pas de sinus uro-génital, la vulve entoure l'ostium vaginal, le clitoris et l'ostium externe de l'urètre, situé à la base du clitoris [178].

2.3. Physiologie

2.3.1. Cycle œstral

Le terme « *œstrus* » du grec « *oistros* » fut utilisé pour la première fois par HEAPE [179] comme la période spéciale du désir sexuel de la femelle [180]. Il a également utilisé les termes :

- *Anœstrus* : qualifiant un appareil reproducteur au repos ;
- *Proœstrus* : qualifiant une femelle bientôt en chaleur ;
- *Metœstrus* ou *Dioestrus 1* : en l'absence de la conception ;
- *Dioestrus* ou *Dioestrus 2* : lorsque l'appareil reproducteur se prépare à la réception de l'ovule.

La ratte est une espèce polyœstrienne à activité sexuelle continue (le cycle œstral n'est interrompu que pendant la gestation et l'allaitement) et à ovulation spontanée. Au cours du cycle œstral, de nombreuses modifications peuvent être observées tant sur le plan physiologique qu'histologique et cytologique, toutes initiées et régulées par l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien.

La maturité sexuelle se produit habituellement entre 30 et 50 jours. Pour GOLDMAN *et al.* [181] et KIM *et al.* [182], la puberté se produit entre 32 et 35 jours d'âge, pour KENNEDY et MITRA [183] à 38 jours. Cet âge a été fixé sur la base de l'ouverture du col vaginal et de l'apparition du premier œstrus. Habituellement, le premier cycle œstral débute une semaine après l'ouverture du col vaginal et revient périodiquement tous les 4 à 5 jours. La durée du cycle œstral par phase en fonction des auteurs est illustrée dans la figure 2.2.

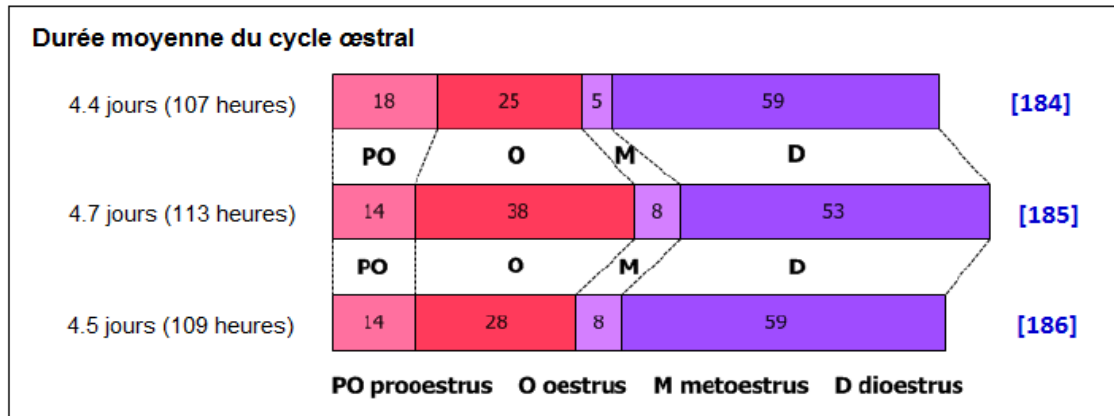


Figure 2.2 : Durée des différents stades du cycle œstral chez la ratte.

2.3.2. Fonction ovarienne

L'ovaire possède deux fonctions essentiellement contrôlées par les hormones hypophysaires (FSH : *Folliculo-Stimulating Hormone*, LH : *Luteinizing Hormone*, et PRL) dont les taux circulants permettent de réguler la production des stéroïdes ovariens (œstrogènes : E2 et progestérone : P4) [187] :

- L'ovogénèse : Fonction exocrine assurant la production, la maturation et l'émission cyclique du gamète femelle ;
- L'hormonogénèse : Fonction endocrine assurant l'imprégnation hormonale du tractus génital femelle, nécessaire à la fécondation et à l'implantation.

L'ovogénèse et la folliculogénèse sont deux processus étroitement imbriqués :

2.3.2.1. Ovogénèse

L'ovogénèse se définit comme *l'ensemble des processus conduisant à la formation et au développement des gamètes femelles ou ovules et les rendant aptes à être fécondés par les spermatozoïdes* [177]. L'origine embryonnaire du tissu gonadique est le mésoderme [188].

2.3.2.2. Folliculogénèse

Au cours de la vie fœtale ou néonatale, les *ovogonies* prolifèrent au niveau des cordons ovigères jusqu'à leur entrée en prophase méiotique qui se poursuit dans les ovocytes primaires et se bloque au stade diplotène. L'ovocyte s'entoure d'une couche de cellules somatiques ou *cellules folliculaires* pour former un *follicule*

primordial [189]. La folliculogénèse est un processus continu se produisant dans la corticale de l'ovaire. Elle débute au démarrage de la croissance du follicule primordial et aboutit à la formation d'un ou de plusieurs ovocytes apte(s) à être fécondé(s) [190]. La croissance folliculaire comprend deux étapes (Figure 2.3) :

- *le recrutement initial* à partir du « pool » de follicules primordiaux en dormance : c'est la *folliculogénèse basale* ou *stade pré-antral* [190].
- *le recrutement cyclique* des follicules en croissance pour former le(s) follicule(s) ovulatoire(s) [188] : c'est la *folliculogénèse terminale* ou *stade antral* qui comprend trois phases : le recrutement, la sélection et la dominance qui s'enchaînent de manière continue au cours d'un cycle [190].

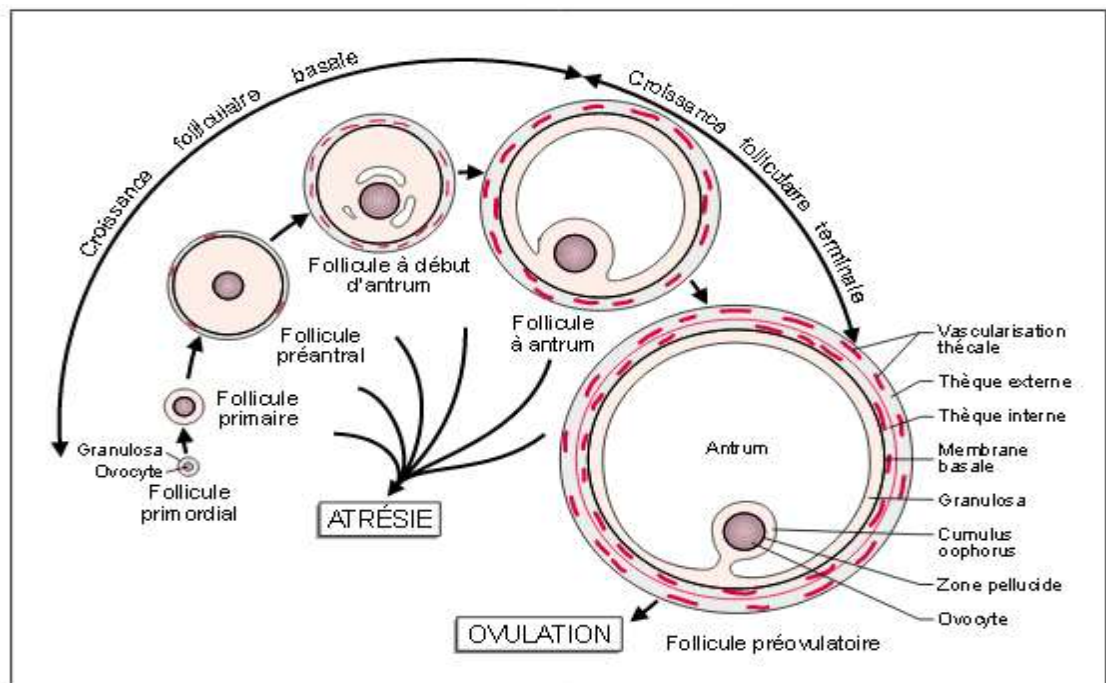


Figure 2.3 : Etapes du développement folliculaire [191].

2.3.2.2.1. Folliculogénèse basale : Phase non-gonado-dépendante

Selon les espèces, le recrutement initial débute pendant la vie embryonnaire ou la période juvénile. Cette étape est indépendante de la stimulation par la FSH [192]. Le recrutement folliculaire correspond au passage du follicule primordial de la phase de quiescence à la phase de croissance par l'augmentation du volume de l'ovocyte primaire et l'entrée en prolifération des cellules folliculaires qui l'entourent. Ces dernières initialement aplaties deviennent cubiques [193–196], elles sont enfermées par une membrane basale, c'est le *follicule primaire* sur

lequel apparaissent les récepteurs à la FSH (FSHR) au niveau des cellules folliculaires. A partir de deux couches de cellules folliculaires appelées : *granulosa*, le follicule est dit *secondaire* [197]. Une matrice glycoprotéique appelée *zone pellucide* sépare les cellules folliculaires de l'ovocyte [198]. Des prolongements cytoplasmiques des cellules de la *granulosa* traversent la zone pellucide pour s'apposer contre la membrane plasmique de l'ovocyte. La présence de *gap-junctions* permet un échange métabolique d'ions et de petites molécules d'un poids moléculaire inférieur à 1 kD. La formation de l'*antrum* par fusion de petites cavités créées entre les cellules de la *granulosa* marque la fin de la croissance folliculaire basale. Une thèque conjonctive formée à partir des cellules du stroma ovarien se met en place extérieurement contre la lame basale, et se différenciera en *thèque externe* et en *thèque interne* [195,199–200]. Des capillaires sanguins et des cellules épithélioïdes stéroïdogènes se différencient au niveau de la thèque interne [201]. Les cellules de la thèque interne expriment dès leur formation des récepteurs de LH, des facteurs de croissance, des enzymes et des facteurs de la stéroïdogénèse permettant la synthèse d'androgènes (CYP17A1 : *Cytochrome P450, Family 17, Subfamily A, Polypeptide 1*) et de progestagènes : CYP11A1 (*Cytochrome P450, Family 11, Subfamily A, Polypeptide 1*), StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) et HSD3B2 (*Hydro-delta-5-steroid dehydrogenase* ou 3 β -HSD) [190]. Le follicule entame alors sa fonction stéroïdogène et devient *follicule antral* ou *follicule tertiaire* [194]. La thèque externe est constituée de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, de cellules nerveuses, de quelques cellules stéroïdogènes et de capillaires sanguins [202]. Dans l'antrum s'accumulent les produits de sécrétion des cellules de la *granulosa* et de la thèque, ainsi que les substances plasmatiques qui diffusent à partir des capillaires sanguins pour irriguer la thèque. La croissance folliculaire aboutit à la différenciation de la *granulosa murale* (située en périphérie du côté de la lame basale) et du *cumulus oophorus* (entourant l'ovocyte). Au niveau du follicule ovulatoire, les cellules péri-ovocytaires portent le nom de *corona radiata*. Des régulations endocrines, paracrines et autocrines sont associées à cette organisation structurale du follicule [203–206].

La folliculogénèse basale est contrôlée par de nombreux facteurs de croissance d'origine ovocytaire ou somatique intervenant le plus souvent selon un mode de régulation paracrine [190,207] :

- Les cellules de la granulosa sécrètent des facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et l'AMH (*Anti Mullarian Hormone*), ainsi que des cytokines (SCF : *Stem Cell Factor* ou KITLG : *kit-ligand*). L'AMH est produite en faible quantité dans les follicules primaires mais joue toutefois un rôle important dans la folliculogénèse et est, à ce titre, un indicateur de la réserve folliculaire. Sa production est maximale en fin de folliculogénèse basale [208].
- Avec le démarrage de la croissance folliculaire, l'ovocyte entame une intense activité transcriptionnelle qui permet la synthèse des protéines nécessaires au métabolisme ovocytaire. L'ovocyte, exprime des gènes codant pour les facteurs de croissance BMP15 (*Bone Morphogenetic Protein 15*) et GDF9 (*Growth Differentiation Factor 9*), les protéines ZP (composants de la zone pellucide) et pour d'autres facteurs dont le rôle est inconnu [209]. C'est au cours de la folliculogénèse basale que s'effectue l'essentiel de la croissance ovocytaire (diamètre initial de 20 à 30 μm) et que l'ovocyte bloqué au stade diplotène / diacinèse devient apte à reprendre la méiose. L'activité transcriptionnelle de l'ovocyte ralentit lorsque l'ovocyte approche de son diamètre maximal, jusqu'à devenir indétectable. L'ovocyte acquiert sa compétence méiotique lorsqu'il atteint environ 80% de sa taille maximale (la condensation de la chromatine en un anneau péri-nucléolaire coïncide avec l'inactivation des ARN polymérase), puis, à partir d'un diamètre folliculaire caractéristique de chaque espèce, l'aptitude à soutenir le développement précoce de l'embryon [190,210].

2.3.2.2.2. Folliculogénèse terminale : Phase gonado-dépendante

Cette phase débute par le *recrutement* des follicules ayant acquis la capacité de répondre à une stimulation par la FSH et aboutit au développement d'une cohorte. Le recrutement cyclique est strictement dépendant de la FSH et, pour tous les stades terminaux de maturation du follicule pré-ovulatoire, de la LH. Lorsque le follicule atteint sa maturité et devient apte à ovuler, il y a apparition des récepteurs de la LH au niveau de la granulosa. La « *phase de recrutement* » n'apparaît donc qu'à la puberté ou à la première ovulation [211].

La croissance folliculaire se déroule par vagues (une à six vagues folliculaires au cours d'un cycle ovarien selon l'espèce) mais n'est pas strictement associée à la cyclicité [202] puisque des vagues folliculaires ont été observées chez des femelles prépubères ou gestantes [212]. Seule une partie des follicules recrutés est sélectionnée et poursuit sa croissance, c'est la « phase de sélection ». Dès lors qu'il est (sont) sélectionné(s), le (les) follicule(s) destiné(s) à ovuler ou follicule(s) dominant(s) inhibe(nt) le recrutement des autres follicules [213]. La croissance des follicules susceptibles d'ovuler se produit de façon synchrone et coordonnée [199]. La croissance et la maturation terminale du (des) follicules pré-ovulatoires, l'atrésie des autres follicules de la cohorte, et le blocage du recrutement de nouveaux follicules correspondent à la « phase de dominance ». De nombreux facteurs (facteurs de croissance, matrice extracellulaire, protéases et stéroïdes d'origine locale ou endocrine) agissent en synergie avec les gonadotropines pour réguler la folliculogénèse terminale [214]. Les cellules de la granulosa perdent progressivement de leur capacité de prolifération et de synthèse de l'AMH et se différencient en cellules stéroïdogènes (synthèse d'œstradiol à partir des androgènes d'origine thécale), par l'apparition et l'augmentation de l'expression des gènes CYP11A1, StAR, HSD3B2 et CYP19A1 (*Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1* qui code pour l'aromatase). Simultanément, il y a apparition et augmentation brutale des récepteurs de LH (LHCGR) sur les cellules de la granulosa [190] (Fig. 2.4 & 2.5).

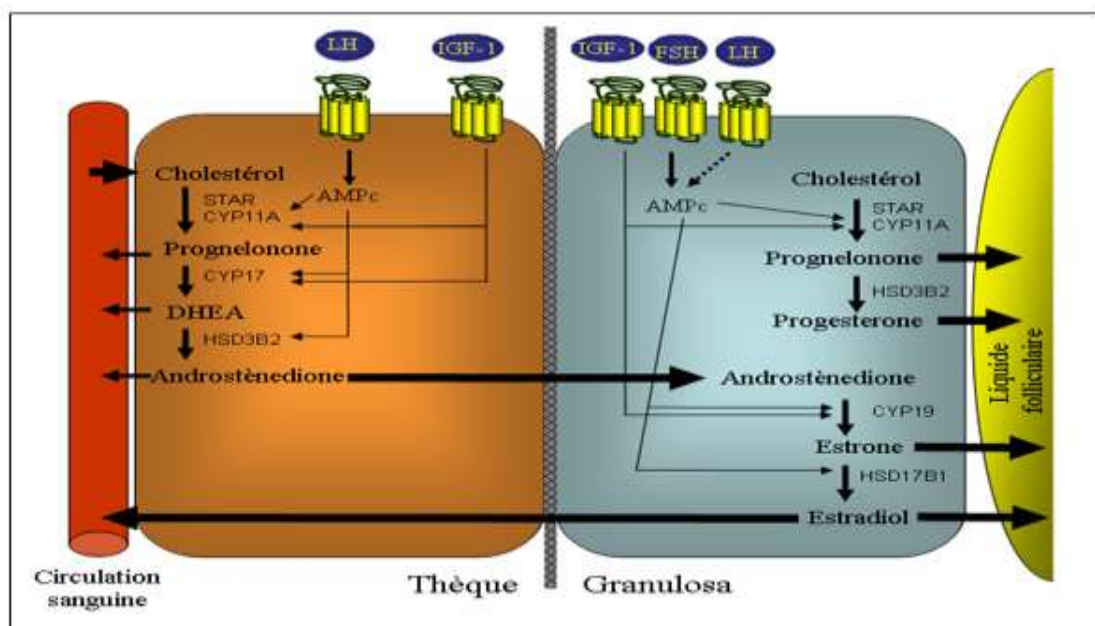


Figure 2.4 : Stéroïdogénèse et modèle « 2 cellules, 2 gonadotropines » [215].

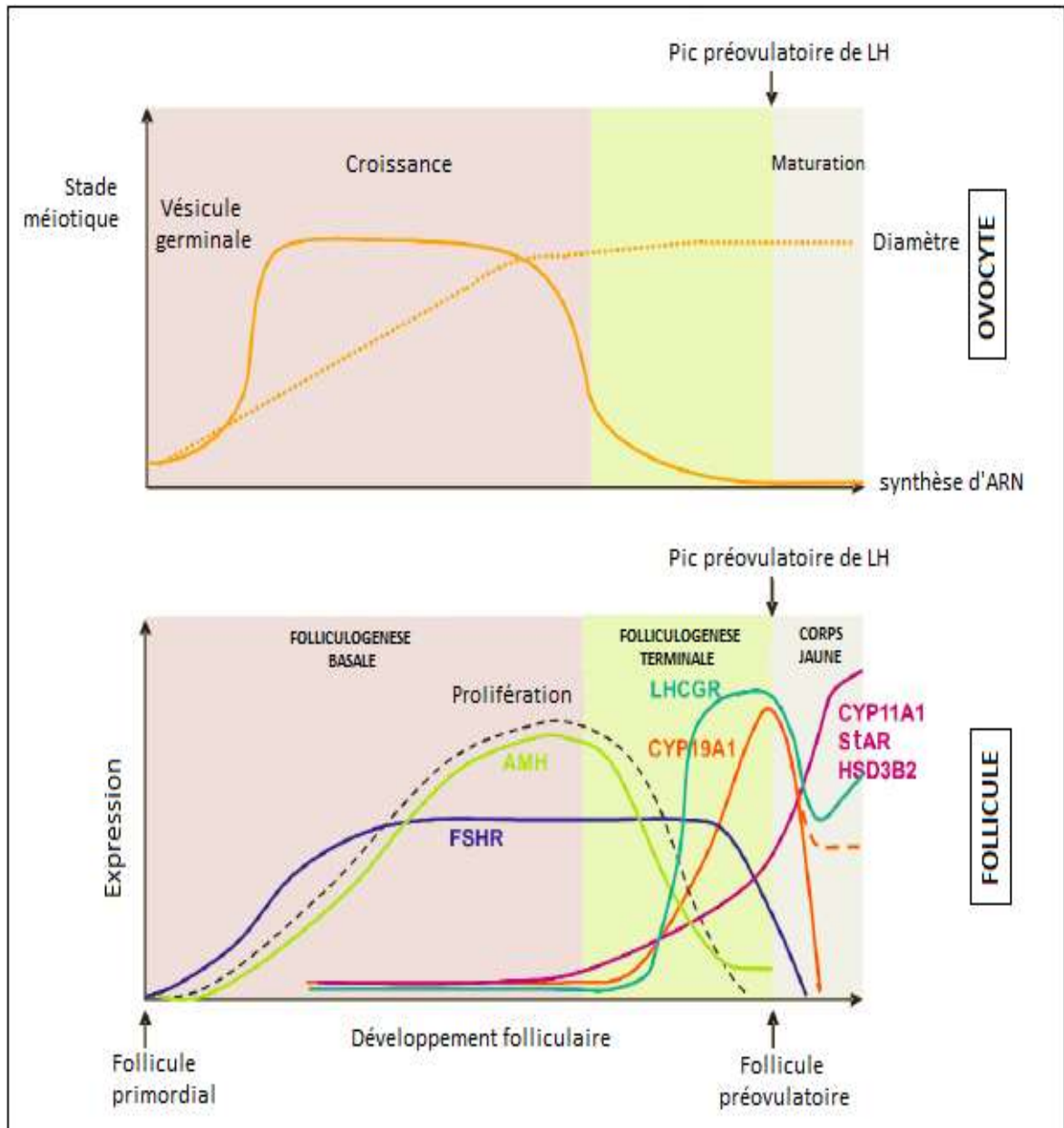


Figure 2.5 : Changements fonctionnels dans l'ovocyte et les cellules de la granulosa au cours du développement folliculaire.

Dans le follicule après l'ovulation, l'expression de l'aromatase (CYP19A1) disparaît au moment de la formation du corps jaune (CJ) chez les ruminants, la truie et la jument, mais pas chez les primates et les rongeurs (courbe orange en pointillé) [190].

La réduction du nombre de follicules ovariens au cours de la vie génitale est due soit à l'ovulation soit à l'atrésie qui correspond à l'entrée en apoptose du follicule avec hyalinisation, fragmentation du cytoplasme et épaissement de la zone pellucide. Avant la puberté, la majorité des follicules en croissance atteignent les stades de follicules primaires, secondaires voire la phase antrale précoce, puis

s'atrésient [177]. 99% des follicules qui entrent en croissance dégènèrent. Une cascade d'évènements complexes déclenchés par le pic de LH en fin de phase folliculaire conduit à l'ovulation du (des) follicule(s) pré-ovulatoire(s). La survie du (des) follicule(s) est déterminée par l'expression d'un plus grand nombre de récepteurs à la LH par les cellules de la granulosa murale et de la thèque le(s) rendant apte(s) à ovuler [190].

Le tableau 2.1 résume la durée du développement folliculaire, le diamètre folliculaire au cours des différents stades de la folliculogénèse, l'âge d'atteinte de la puberté, le nombre de follicule(s) ovulé(s) par cycle et l'intervalle décharge ovulante - ovulation chez la ratte et la femme.

Tableau 2.1 : Folliculogénèse chez la ratte et la femme [190,216*].

		Ratte	Femme
Durée totale du développement folliculaire (j)		19 à 22	> 200
Durée de développement des follicules à antrum (j)		3 à 4	50
Diamètres folliculaires (mm)	Follicule primordial	0.03 à 0.05	0.0.3 à 0.05
	Formation de l'antrum	0.2	0.2
	Début de la folliculogénèse terminale	0.2	3 à 5
	Acquisition des récepteurs LH sur la granulosa	0.5	10 à 12
	Ovulation	0.6 à 0.8	20
Age de la puberté *		33 à 40 j	11 à 14 ans
Nombre de follicule(s) ovulé(s) par cycle *		10	1
Intervalle Décharge ovulante - Ovulation (h)		14	36

2.3.2.2.3. Maturation ovocytaire & Ovulation

La maturation ovocytaire permet à l'ovocyte d'acquérir sa capacité d'assumer la fécondation et de supporter le développement embryonnaire. Elle semble liée à la dissociation des cellules du *cumulus oophorus* [217] et s'exprime par *la maturation nucléaire* et *la maturation cytoplasmique*. L'ovulation s'accompagne de modifications structurales et biochimiques au sein du cytoplasme, et est associée à l'expansion du *cumulus oophorus*, la rupture du pôle apical du follicule, la différenciation cellulaire et la restructuration tissulaire qui mènent à la formation d'un CJ [190].

2.3.2.2.3.1. Changements fonctionnels au niveau des cellules folliculaires

La fixation de la LH sur son récepteur induit une augmentation des taux intracellulaires d'AMPC et d'inositol phosphate [218]. La PRKAC (*cAMP-dependent Protein kinase* ou PKA : *Protein kinase*) ainsi activée provoque une cascade de phosphorylations et d'activations des facteurs de transcription CREB1 (*cAMP Responsive Element Binding protein 1*) et SP1 (*Sp1 transcription factor*) qui vont à leur tour inhiber (CYP19A1 et CYP17A1), ou activer (StAR, CYP11A1 et HSD3B2) l'expression des gènes-cibles, conduisant à une modification du profil sécrétoire des stéroïdes (effondrement des taux d'œstrogènes et d'androgènes et augmentation considérable du taux de progestérone). Les cellules de la granulosa perdent leurs récepteurs de FSH, et l'expression des récepteurs de LH diminue de façon transitoire pour augmenter par la suite. Le pic de LH induit l'inhibition de la Cycline D2 et les cellules de la granulosa se désolidarisent de la membrane basale ou de Slavjanski. Simultanément, la thèque devient œdémateuse et hyperhémique, augmentant ainsi le flux sanguin du follicule pré-ovulatoire. Chez la ratte, ces changements fonctionnels des cellules folliculaires durent environ 7 heures [219].

2.3.2.2.3.2. Maturation ovocytaire

2.3.2.2.3.2.1. Maturation nucléaire

La reprise de la méiose se produit dans les heures qui suivent le pic pré-ovulatoire de LH et débute par un plissement de l'enveloppe nucléaire et la rupture de la vésicule germinale (GVBD : *Germinal Vesicle Breakdown*). Les pores nucléaires disparaissent, l'enveloppe se fragmente, le nucléole disparaît rapidement au contact du cytoplasme et la vésicule germinale se disloque. Les chromosomes achèvent la prophase pour se disposer sur le fuseau mitotique : ils se condensent et les chiasmas migrent vers l'extrémité des bras chromosomiques. Le fuseau méiotique se forme depuis les MTOC (*Microtubule Organizing Center*) qui s'ancrent sur les chromosomes et se distribuent sur la plaque métaphasique de la première division méiotique (métaphase I) [220,221] (Fig. 2.6a & b). Les contacts cytoplasmiques entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa disparaissent et les granules corticaux produits par l'appareil de Golgi migrent vers la surface de l'ovocyte. L'anaphase et la télophase sont rapides, les chromosomes homologues

se séparent et migrent aux pôles du fuseau, dont l'un provoque une boursouffure de la membrane qui deviendra le premier globule polaire (Fig. 2.6c). Les chromosomes entrent immédiatement en métaphase II et se répartissent sur une plaque métaphasique, le second fuseau méiotique [222,223]. Le cytoplasme entourant le fuseau en position excentrique est dépourvu de granules corticaux et la membrane cellulaire sus-jacente ne comporte pas de microvillosités chez certaines espèces (Fig. 2.6d). Le globule polaire contenant la moitié du complément chromatinien est expulsé dans l'espace périvitellin ce qui marque l'achèvement de la première division méiotique. C'est à ce moment qu'intervient l'ovulation à l'exception des canidés pour lesquels la rupture de la vésicule germinale a lieu lors du transit de l'ovocyte dans les voies génitales [190].

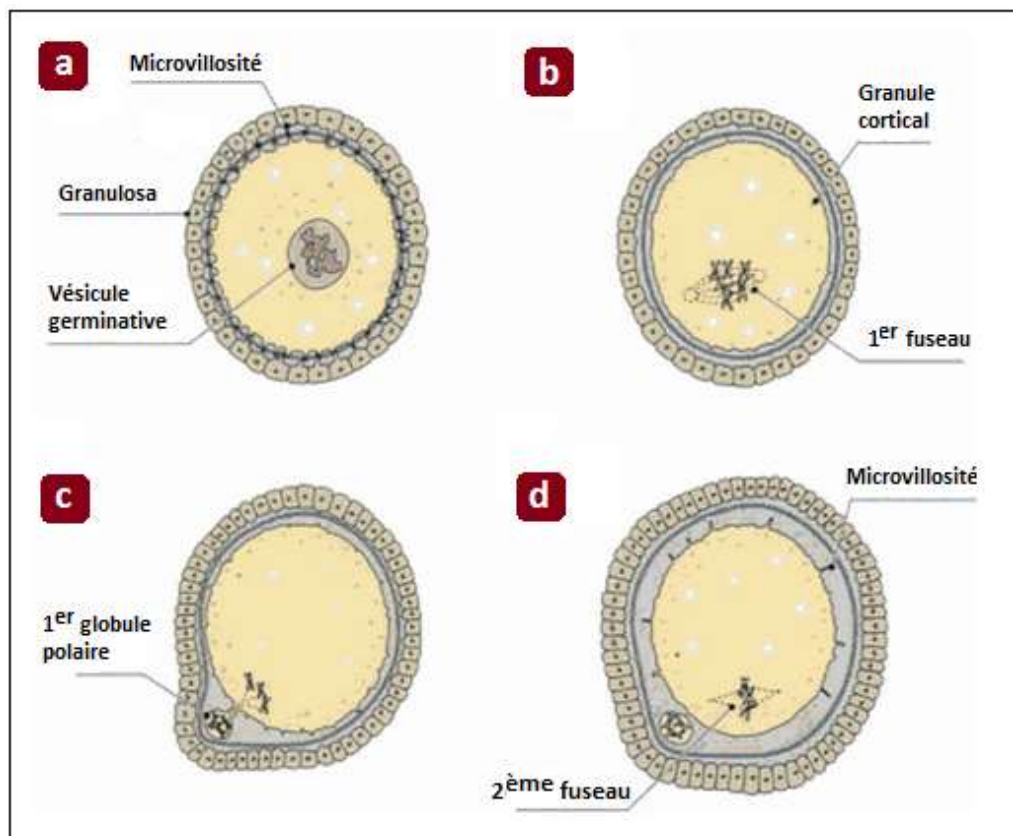


Figure 2.6 : Réactivation de la prophase arrêtée au cours de la première division méiotique de l'ovocyte pré-ovulatoire [224].

2.3.2.2.3.2.2. Maturation cytoplasmique

L'ovocyte atteint rapidement sa taille maximale et constitue une réserve importante d'ARN synthétisés au niveau de la vésicule germinale par amplification

génique (ribosomiques en particulier). Une grande partie des ribosomes est stockée et interviendra au cours des premiers jours du développement embryonnaire. L'ovocyte met en place des systèmes de régulations permettant les divisions et les différenciations des premiers stades : c'est l'*acquisition de la compétence au développement* [193]. L'activité transcriptionnelle qui était minimale depuis la fin de la croissance ovocytaire s'arrête dès que les chromosomes se condensent en début de maturation. L'expression génique repose alors essentiellement sur la régulation post-transcriptionnelle des ARN cytoplasmiques. L'espace périvitellin est élargi avec réorganisation des composants cytoplasmiques de l'ovocyte par déplacement sous la dépendance des microtubules [210] : les granules corticaux initialement situés au niveau cytoplasmique diffusent dans l'ovocyte immature, migrent vers la zone corticale et s'associent au cytosquelette (filaments d'actine). Les mitochondries forment des agrégats avec le réticulum endoplasmique dans la région périnucléaire. La réserve lipidique et la concentration en glutathion augmentent, ce qui indique des changements métaboliques. La concentration de calcium augmente dans le cytosol. Le calcium pourrait aussi pénétrer par les canaux ioniques de la membrane plasmique et des changements de la machinerie de signalisation calcique s'opèrent [225]. La maturation cytoplasmique s'achève parallèlement à la reprise de la méiose avec la maturation membranaire, l'attachement des granules corticaux [193], l'acquisition par la zone pellucide d'une spécificité biochimique intervenant dans la reconnaissance, la fixation du spermatozoïde et la réaction acrosomique [201,226] ; ainsi que l'activation du MPGF (*Male Pronucleus Growth Factor*) qui intervient dans la décondensation de la chromatine du spermatozoïde et le changement des nucléoprotéines [220].

2.3.2.2.3.2.3. Dissociation & Expansion des cellules du *cumulus oophorus*

Le pic pré-ovulatoire de LH induit l'expansion du *cumulus oophorus* qui facilitera le détachement du complexe *cumulus oophorus* - ovocyte au moment de l'ovulation. Les cellules du *cumulus* enrichissent la matrice extracellulaire intra-folliculaire en acide hyaluronique dont l'hydratation permet de dissocier la *corona radiata* qui libère l'ovocyte entouré d'un « nuage » de cellules du *cumulus* [227]. Cette sécrétion est stimulée par la FSH, certains facteurs de croissance (EGF et IGF-1)

ainsi que des facteurs ovocytaires, GDF9 notamment. L'accumulation de l'acide hyaluronique attire l'eau à l'intérieur du follicule ce qui augmente la tension de la cavité. A l'acide hyaluronique viennent s'associer des protéines de liaison (SHAP : *Serum derived Hyaluronic Acid binding Protein* ou ITI : *Inter-alpha-Trypsin Inibitor*) [228]. Le *cumulus* expansé constitue un microenvironnement protecteur entourant l'ovocyte. Il assure la captation du complexe par le pavillon suite à l'ovulation et intervient dans la capacitation des spermatozoïdes avant la fécondation [229].

2.3.2.2.3.2.4. Rupture de la paroi folliculaire & Ponte ovulatoire

La synthèse par l'ovaire de cytokines inflammatoires (IL, TNF), de cortisol et de prostaglandines (PG) s'accroît dans le follicule pré-ovulatoire au moment de l'ovulation. Les cytokines stimulent l'activité d'enzymes protéolytiques ainsi que la production de PG et de monoxyde d'azote (NO), elles modulent la stéroïdogénèse et interviendront dans la maturation du complexe ovocyte - *cumulus* [230,231].

La rupture de la paroi folliculaire nécessite l'action d'enzymes protéolytiques dégradant la matrice extracellulaire par dissociation des fibres de collagène. Le pic de LH induit une production locale considérable d'une protéase qui transforme le plasminogène en plasmine [232], qui activerait à son tour certaines collagénases, telles que les métalloprotéases matricielles ou *Matrix metalloproteinase* (MMP1 et MMP2) [233]. L'activité de la collagénase est également stimulée par l'IL-1 [234,235], la bradykinine [236] et chez la ratte par la progestérone [201]. La collagénase est inhibée par des facteurs du liquide folliculaire tels que l' α -macroglobuline [235]. Chez les rongeurs, la lapine, la truie et le macaque, les gonadotropines stimulent directement la synthèse par les cellules de la granulosa et de la thèque interne de PG, qui induisent la libération d'hydrolases lysosomiales des cellules de l'épithélium ovarien au niveau de l'apex folliculaire (constitué de l'albuginée et de la thèque externe), ce qui accentue la désintégration des fibres de collagène [236,237]. Parallèlement, l'activité d'inhibiteurs de sérines protéases (SERPINE1 : *Serpin Family E Member 1*) et d'inhibiteurs des métalloprotéases matricielles (TIMP1 et TIMP2) augmente. L'expression des MMP et des TIMP est régulée par les stéroïdes et les PG. L'expression concomitante de protéases et d'anti-protéases dans le follicule pré-ovulatoire permet de moduler le

site et le degré de dégradation du mur folliculaire au niveau de l'apex au moment de sa rupture [238]. La phosphorylase A2, par l'intermédiaire de la bradykinine, stimule la sécrétion par la thèque interne et les cellules de la granulosa de PGE2 (qui provoque une ischémie et une fragilisation des tissus) et par les théques de PGF_{2α}, ce qui permet la libération des hydrolases lysosomiales par les cellules de l'épithélium ovarien au niveau de l'apex [199,236]. Parallèlement, le pic de LH augmente le flux sanguin au niveau de l'ovaire [239], accroît la perméabilité vasculaire par action du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et induit la libération du PAF (*Platelet Activating Factor*), phospholipide impliqué dans les réactions inflammatoires. L'accroissement volumétrique du follicule et sa position dans le cortex entraînent sa hernie à la surface ovarienne. L'ischémie consécutive à l'œdème accentue la désintégration des cellules de l'apex au niveau du *stigma* où une vasoconstriction totale (vraisemblablement due à l'endothéline) s'est installée [199,240].

La ponte ovulaire correspond à l'expulsion d'un ovocyte mûr et fécondable associé au *cumulus oophorus*. Cette expulsion est facilitée par la contraction des myofibroblastes de la thèque externe juste avant ou au moment de l'ovulation [241,242]. Cette contraction résulte de la chute brutale de la pression hydrostatique et est stimulée par la PGF_{2α}, l'ocytocine et les drogues cholinergiques et α-adrénergiques chez le hamster, la lapine, la brebis et la femme (Fig. 2.7) [237].

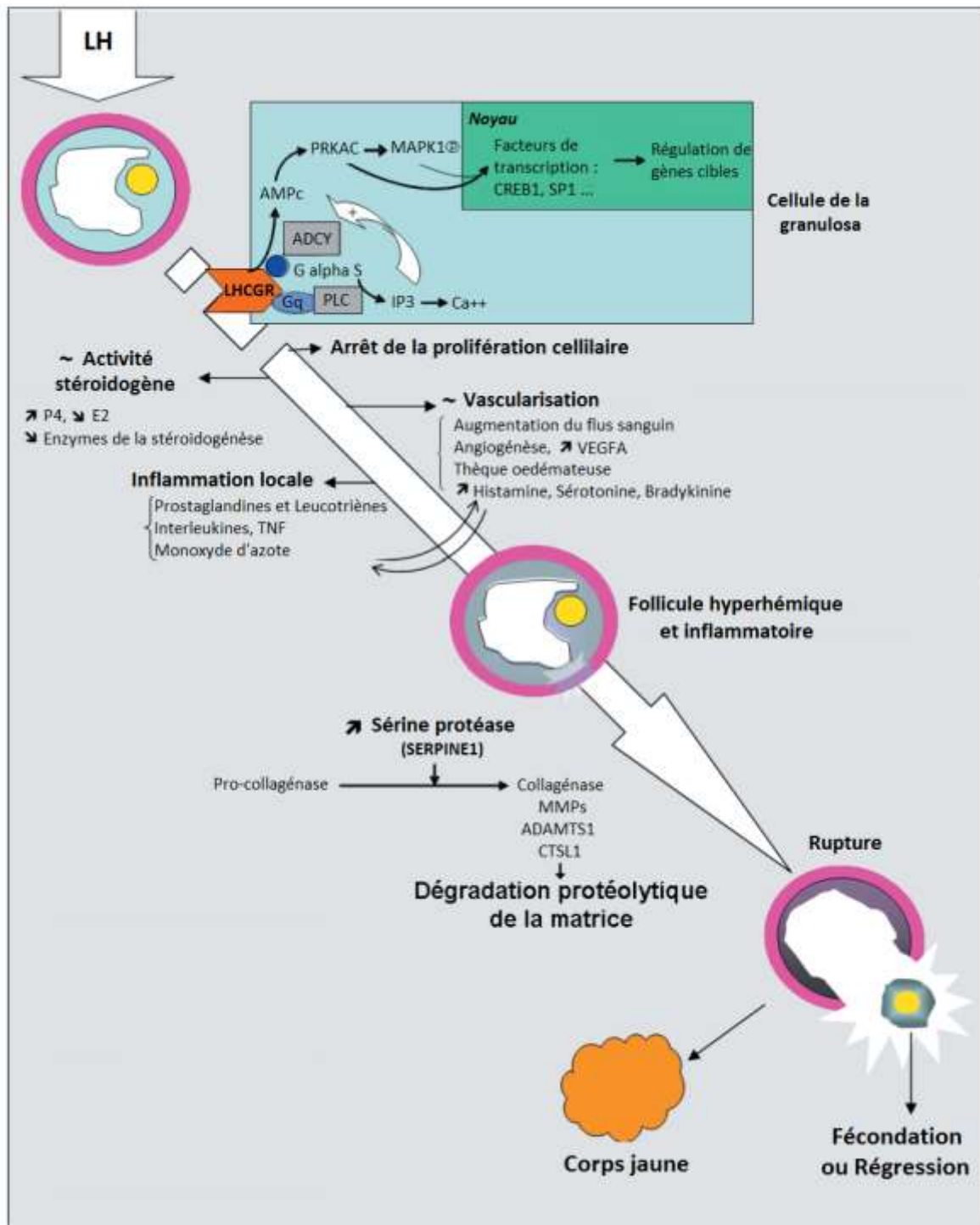


Figure 2.7 : Cascade d'évènements déclenchés par le pic de LH conduisant à l'ovulation du (des) follicule(s) pré-ovulatoire(s) [190].

ADAMTS1 : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1, ADCY : Adenylate cyclases, CTSL1 : Cathepsine L1, E2 : Œstradiol, G alpha S : Guanine nucleotide binding proteins (*G proteins*) - G alpha subunit, Gq : Protéines de la famille des protéines G associées à un récepteur, IP3 : Inositol trisphosphate, PLC : Phospholipase C, P4 : Progestérone.

2.3.2.3. Phase lutéale

2.3.2.3.1. Lutéogénèse

La formation du CJ résulte de la transformation lutéale des cellules folliculaires après l'ovulation. Quatre types de CJ sont observés chez les rongeurs [243] :

- le *CJ cyclique* sécrétant de la progestérone pendant une durée d'un à deux jours chez les rongeurs à cycle œstral court et à ovulation spontanée (ratte, souris et hamster) ;
- le *CJ gestatif* dans le cas d'accouplement fertile ;
- le *CJ de pseudo-gestation* dans le cas d'accouplement infertile ;
- le *CJ de lactation* qui assure l'ovo-implantation.

Selon l'espèce, les cellules lutéales peuvent avoir pour origine soit la granulosa, ou bien la granulosa et la thèque qui subissent des changements morphologiques et fonctionnels, donnant naissance aux grandes et aux petites cellules lutéales [244]. Au cours de la lutéinisation, les mitochondries à crêtes tubaires augmentent en nombre, le réticulum endoplasmique lisse devient abondant et des gouttelettes lipidiques sont observées. L'activité stéroïdogène est marquée par la diminution de la biosynthèse des androgènes en faveur de la sécrétion de la progestérone [245,246], en réponse au niveau tonique de LH. Chez la ratte, la progestérone est essentiellement produite par le CJ, le placenta en produit très peu pendant la gestation [247,248]. Le CJ sécrète également l'inhibine qui atténue la sécrétion de la FSH [249] et la relaxine qui, par son action myorelaxante, intervient dans le remodelage des organes génitaux pendant la gestation et la parturition. Chez la ratte, la relaxine inhibe les contractions induites par l'ocytocine sur le myomètre et intervient dans la croissance embryonnaire [250].

2.3.2.3.2. Lutéolyse

La régression lutéale implique l'affaissement des cellules lutéales, une ischémie et une mort cellulaire progressive responsable de la chute de la progestérone. L'action lutéolytique est associée à la lutéolysine d'origine utérine (qui a été identifiée à la $\text{PGF}_{2\alpha}$) chez la ratte et à la $\text{PGF}_{2\alpha}$ d'origine ovarienne chez les primates et la femme (proche de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ d'origine utérine chez les rongeurs et les ruminants) [201,243]. La production de $\text{PGF}_{2\alpha}$ est stimulée par l'ocytocine du

CJ. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ induit à son tour une rétroaction positive sur l'ocytocine. La lutéolyse aboutit à l'involution du CJ qui se sclérose pour former une cicatrice blanchâtre résiduelle fibreuse : le *corpus albicans* qui sera absorbé par le stroma ovarien. En cas de gestation, la trophoblastine sécrétée par le trophoblaste embryonnaire inhibe la synthèse de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ afin d'assurer une production continue de progestérone et le CJ cyclique se transforme en CJ gestatif [251–253].

2.3.3. Régulation

Les hormones hypophysaires à effet sexuel ou *gonadotropines* sont représentées par : la FSH ou *follicitropine*, la LH ou *lutropine* et la PRL.

2.3.3.1. FSH et LH

La FSH et la LH, de nature glycoprotéique [254] sont formées d'une sous-unité α commune et d'une sous-unité β propre à chaque hormone qui lui confère sa spécificité biologique et immunologique. Ces gonadotropines agissent sur le fonctionnement des gonades et la régulation de la reproduction chez l'ensemble des vertébrés [255–257].

2.3.3.1.1. Régulation cérébrale

L'hypothalamus contrôle la sécrétion des gonadotropines hypophysaires par le biais de la GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone* encore appelée LH-RH : *Luteinizing Hormone Releasing Hormone* ou *gonadolibérine*), neurohormone décapeptidique sécrétée au niveau de l'éminence médiane. La GnRH est synthétisée et sécrétée par des neurones spécialisés situés dans l'ARC de l'hypothalamus médial basal et dans la zone préoptique de l'hypothalamus antérieur. La sécrétion et l'interaction de la GnRH avec son récepteur apparenté se produisent de manière pulsatile et intermittente et sa fréquence varie en fonction du cycle. Une fois libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, la GnRH se lie à son propre récepteur sur la membrane des cellules de l'antéhypophyse induisant la sécrétion de la FSH et de la LH. La GnRH module la sécrétion des chaînes α et β , la glycosylation et la sécrétion. Des fréquences de pulses lentes de GnRH induisent la sécrétion de la FSH, tandis

que les fréquences de pulses rapides induisent celles de la LH [258,259]. La libération de GnRH est étroitement liée à l'activité des neurones à GnRH, qui sont régulés par les neurotransmetteurs, les hormones stéroïdiennes et les facteurs de croissance [260]. Les gonadotropines se lient aux récepteurs couplés aux protéines G spécifiques des gonades pour stimuler la production de stéroïdes sexuels (œstradiol, progestérone, et testostérone) et d'hormones peptidiques (inhibine et activine) qui modulent la libération de la GnRH et des gonadotropines. Dans l'hypothalamus, l'œstradiol peut agir directement sur les neurones à GnRH et tous les stéroïdes peuvent agir indirectement par le biais d'autres neurones hypothalamiques sur la libération de la GnRH. Les concentrations élevées en testostérone suppriment les pulses de GnRH hypothalamiques et la réponse hypophysaire à la GnRH. Le traitement à l'œstradiol seul augmente la fréquence des pulses de GnRH mais diminue leur amplitude, tandis que l'œstradiol et la progestérone suppriment les pulses de GnRH. Au niveau hypophysaire, l'œstradiol augmente le nombre de GnRHRs (récepteurs à GnRH) ainsi que la réactivité des gènes LH à la GnRH et peut supprimer directement la sécrétion de LH. La GnRH a également une action d'auto-amorçage (régulation à la hausse) et de régulation négative sur son propre récepteur [261].

La kisspeptine (protéine codée par Kiss1) libérée par les neurones de l'ARC et le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV), stimule la libération de la GnRH, qui induit la libération de la LH et de la FSH. Les gonades répondent aux gonadotropines en sécrétant des stéroïdes qui régulent l'activité des neurones à kisspeptine, inhibant l'expression de Kiss1 dans l'ARC et induisant son expression dans l'AVPV. L'effet inductif des stéroïdes sur l'expression de Kiss1 dans l'AVPV peut contribuer à la poussée de LH pré-ovulatoire chez la femelle. La leptine informe l'hypothalamus sur l'état énergétique de l'organisme et peut induire l'expression de Kiss1 [262,263] (Fig. 2.8).

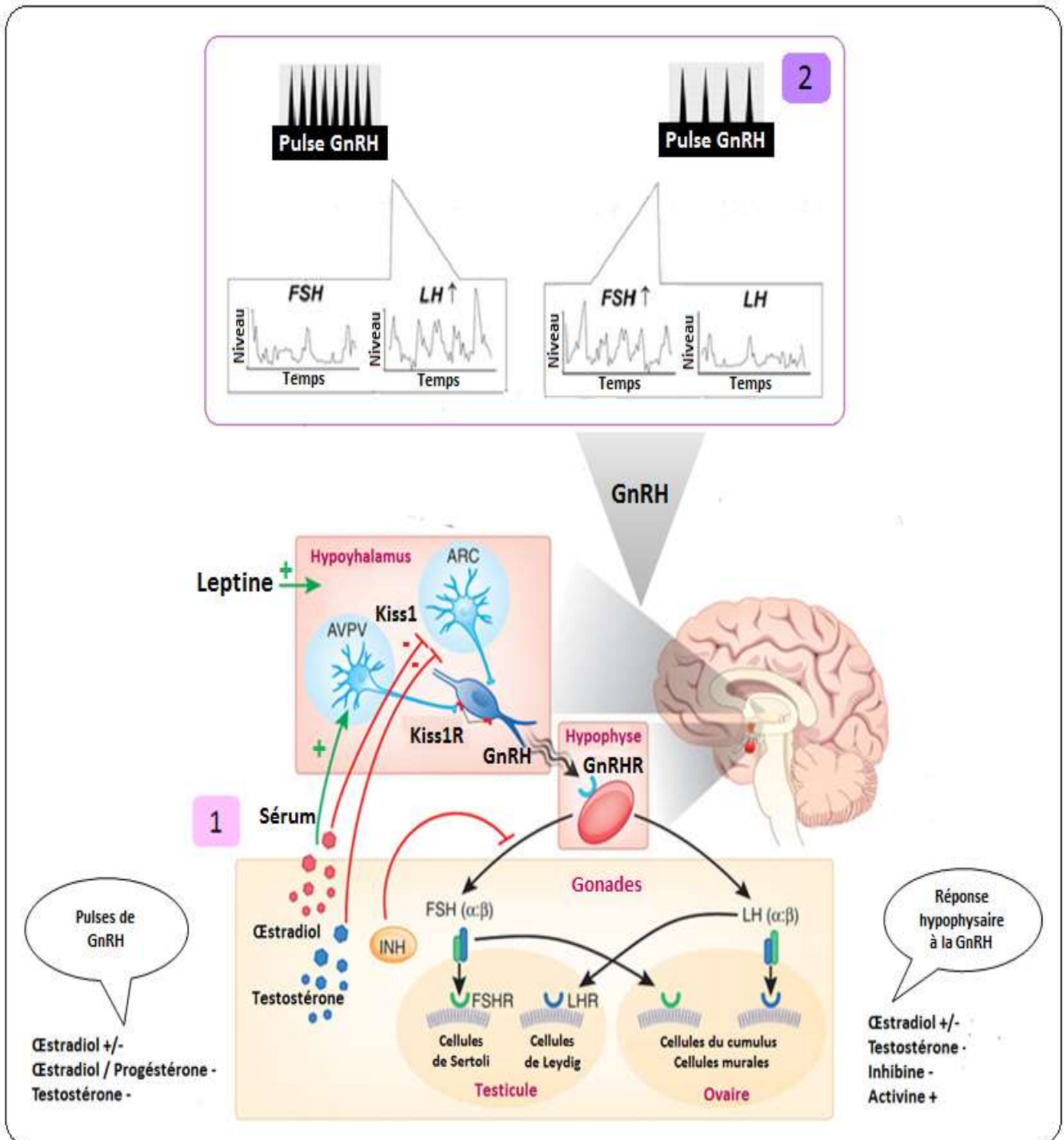


Figure 2.8 : Régulation hypothalamo-hypophysaire-ovarienne de la fonction de la reproduction.

(1) : La kisspeptine stimule la sécrétion de la GnRH. L'ARNm de Kiss1 est régulé par les stéroïdes sexuels dans l'ARC et l'AVPV. Adaptée de [263].

(2) : Des fréquences de pulses lentes de GnRH induisent la sécrétion de la FSH, tandis que des fréquences de pulses rapides induisent celles de la LH [261].

✓ *Monoamines*

- La noradrénaline est une catécholamine impliquée dans la libération par les neurones à GnRH de la décharge pré-ovulatoire chez la ratte et la lapine [264]. Elle active la stimulation des neurones à GnRH conjointement à l'adrénaline. Elle supprime l'apparition des pulses de LH chez la ratte ovariectomisée [265].
- Chez la ratte, des effets stimulateurs de la sérotonine (qui est une indolamine comme l'histamine) ont été démontrés au moment du pic pré-ovulatoire. Cependant, la stimulation expérimentale de la libération de la sérotonine induit une inhibition des sécrétions de LH (y compris le pic pré-ovulatoire), ce qui suggère l'existence de sites d'action différents [264].
- La dopamine est un neuromédiateur de la famille des catécholamines synthétisé à partir de la tyrosine. Les neurones dopaminergiques sont distribués dans l'ensemble du cerveau [266]. Chez la ratte, la dopamine des neurones du système incerto-hypothalamique (Noyaux A13 et 14) stimulerait le pic pré-ovulatoire de LH, mais une action inhibitrice de la dopamine est le plus souvent rapportée : soit directe sur la pulsativité chez la ratte ovariectomisée, soit en participant à l'action inhibitrice de l'œstradiol (brebis en anœstrus) impliquant des noyaux dopaminergiques situés dans l'hypothalamus antérieur [264].

✓ *Neuropeptides*

- Les *opiacés* dérivent de la POMC ou *préproopiomélanocortine* (telle que la β endorphine), ou de la *préproenképhaline* (telle que la méthionine-enképhaline). Chez la ratte, ils seraient impliqués dans le blocage prépubère des sécrétions pulsatiles de LH. Le plus souvent, ils sont inhibiteurs de la pulsativité de la LH par l'œstradiol et la progestérone chez la ratte, la brebis, le macaque Rhésus et la femme pendant la phase lutéale [267].
- Le NPY inhibe la sécrétion pulsatile de LH chez la ratte ovariectomisée. Son effet est stimulateur en présence d'œstradiol. De même que le *peptide vaso-actif intestinal* (VIP) inhibe la sécrétion de la GnRH à travers des relais de nature neurochimique mal connus [264].
- Les kisspeptines dont l'implication dans la reproduction a été démontrée en 2003 chez la souris [268,269] et l'homme [270] sont de puissants stimulateurs de la libération de GnRH *via* le récepteur couplé aux protéines G54 (GPR54) [271,272]. La kisspeptine peut agir directement sur les neurones à GnRH ou

indirectement en augmentant la fréquence et l'amplitude des transmissions postsynaptiques GABAergiques dans les neurones à GnRH d'une manière dépendante de l'œstradiol au moment de la rétroaction négative de ce stéroïde [273,274].

- L'ocytocine et la neurotensine participent à la libération pré-ovulatoire de la LH chez la ratte [275,276].

D'autres peptides hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et de la fertilité semblent moduler la sécrétion de la GnRH tels que : les orexines, la galanine, l'AgRP (*Agouti-related peptide*), l' α MSH (*alpha-melanocyte-stimulating hormone*), le GALP (*Galanine-like peptide*), l'ocytocine et le NPY du noyau infundibulaire qui est sous le contrôle de la leptine [264, 277] (Fig. 2.9).

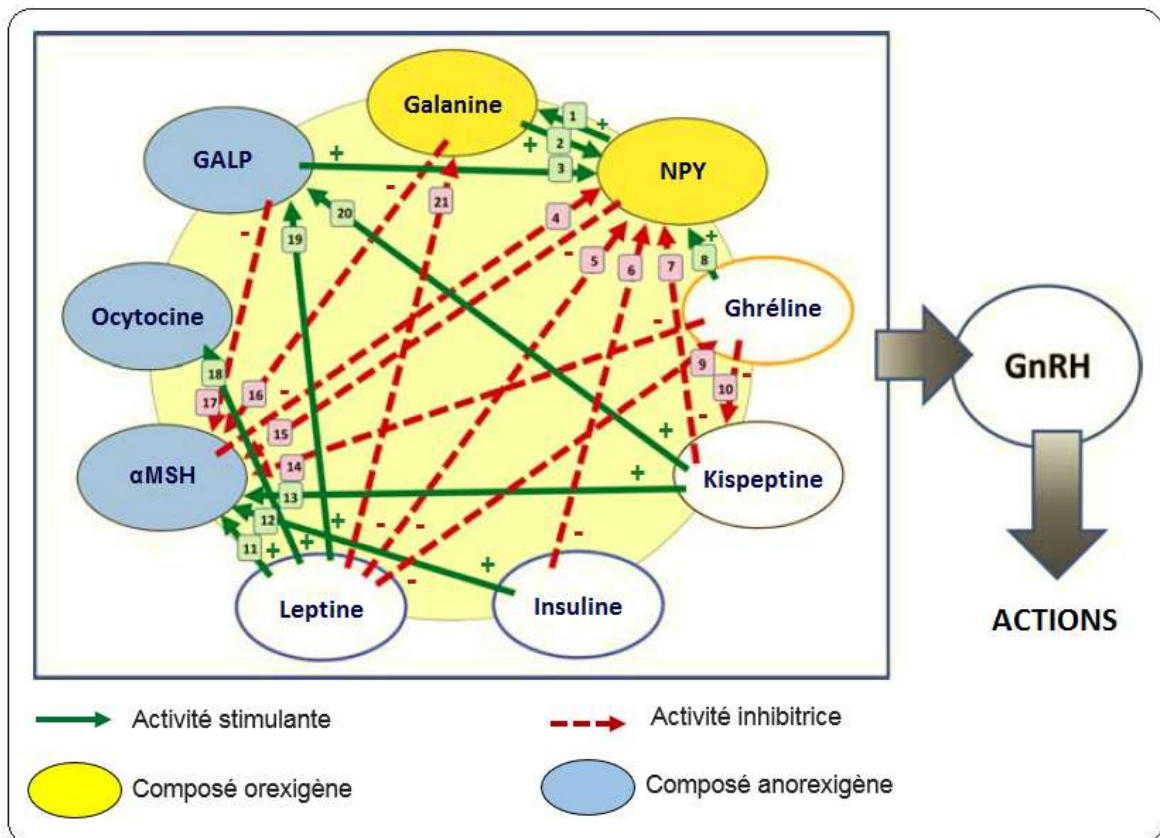


Figure 2.9 : Interactions entre les neuropeptides et les hormones impliquées dans la régulation de l'équilibre énergétique et la fertilité.

Adaptée de [277], d'après : 1 [278] ; 2 [279] ; 3 [280] ; 4 [281] ; 5 [282,283] ; 6 [284] ; 7 [285] ; 8 [286–290] ; 9 [291] ; 10 [292] ; 11 [293,294] ; 12 [295] ; 13 [285] ; 14 [287,290] ; 15 [296] ; 16 [297–299] ; 17 [300] ; 18 [301] ; 19 [302] ; 20 [303] ; 21 [304–306].

✓ *Acides aminés & Transmetteurs gazeux*

Chez la ratte, la lapine et la brebis, le *GABA* (*Gamma-amino butyric acid* ou *acide γ -aminobutyrique*), synthétisé principalement à partir du glutamate, augmente l'intervalle des pulses de GnRH. En revanche, l'aspartate et le glutamate stimulent la libération de la GnRH et apparaissent comme des éléments clé de la régulation du pic pré-ovulatoire de LH induit par l'œstradiol.

Le *monoxyde d'azote* qui dérive de la L-arginine est un gaz qui intervient dans la régulation du pic pré-ovulatoire de GnRH. Dans l'éminence médiane, il jouerait un rôle de médiateur des effets de la noradrénaline, du glutamate et du GABA sur la libération de la GnRH [264,307,308].

2.3.3.1.2. Régulation périphérique

✓ *Stéroïdes sexuels*

L'œstradiol, la progestérone et la testostérone exercent un rétrocontrôle négatif sur l'expression de la GnRH dans l'hypothalamus en réduisant la fréquence de ses pulses, mais il a été noté qu'en fin de phase folliculaire, de même que chez la femelle castrée (ratte, brebis et macaque) ou la femme ménopausée, l'œstradiol stimule fortement la sécrétion de la GnRH, ce qui induit la décharge pré-ovulatoire de gonadotropines (Fig. 2.10). Chez la ratte et la femme, la progestérone seule n'entraîne jamais de décharge pré-ovulatoire mais peut l'avancer [259]. Par ailleurs, la synthèse des récepteurs de la progestérone est stimulée par les œstrogènes ce qui confirme que ces deux stéroïdes agissent en synergie pour stimuler la sécrétion de GnRH dans la phase précédant l'ovulation [309].

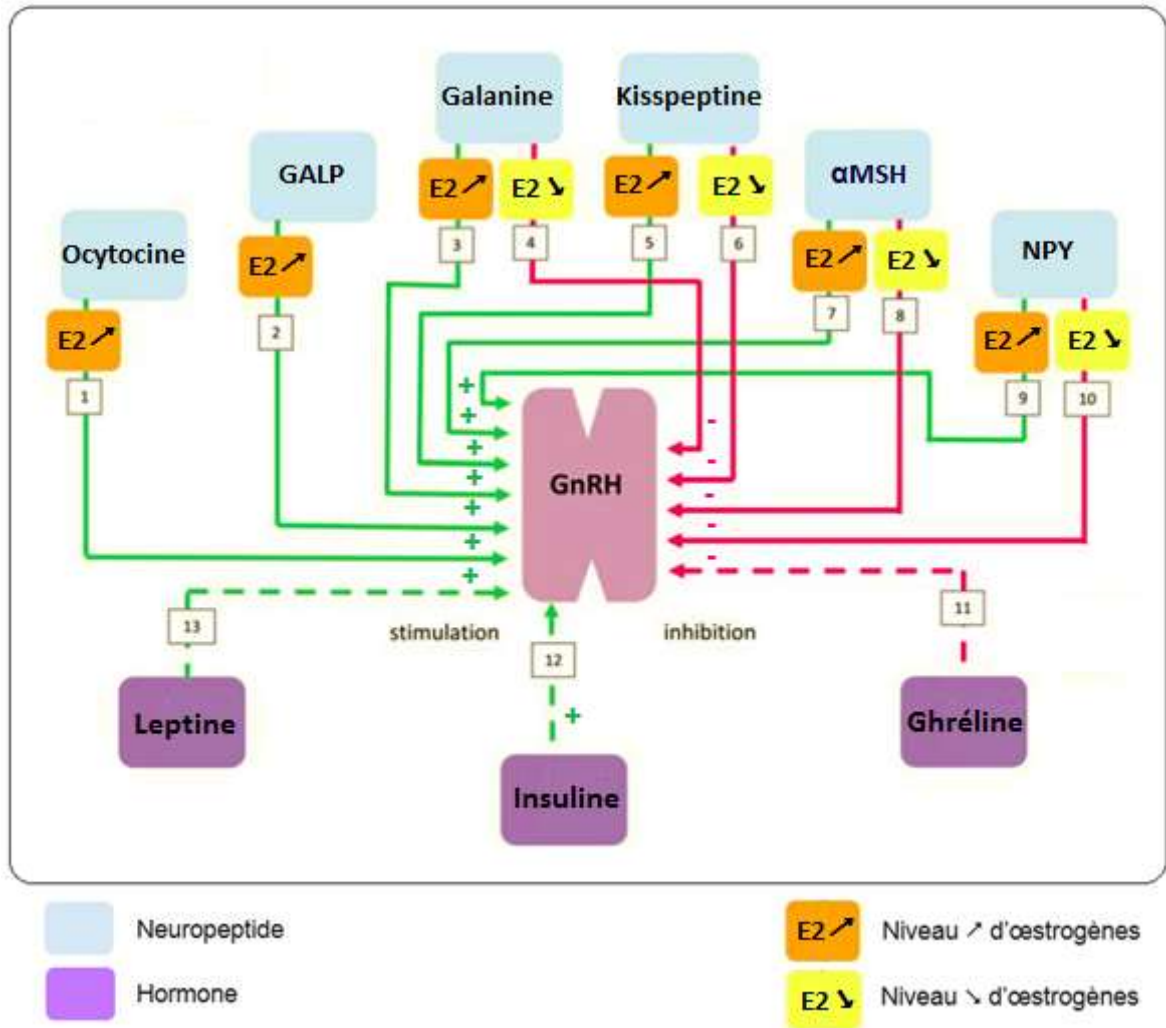


Figure 2.10 : Effet des neuropeptides et des hormones impliqués dans la régulation de l'apport alimentaire et dans l'axe de la fertilité sur les interactions avec les neurones à GnRH en fonction du statut œstrogénique.

Adaptée de [277], d'après : 1 [310] ; 2 [311,312] ; 3 [313–317] ; 4 [318] ; 5 [319–322] ; 6 [319,323] ; 7 [324,325] ; 8 [325,326] ; 9 [327–331] ; 10 [328–333] ; 11 [334–336] ; 12 [337,338] ; 13 [168,339–341].

✓ *Peptides gonadiques*

Les peptides gonadiques représentés par les activines, les inhibines et les follistatines sont des facteurs non stéroïdiens capables de moduler la sécrétion de la FSH. Les inhibines et les activines sont des glycoprotéines de la famille des TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), sécrétées par les gonades. Les follistatines sont des protéines synthétisées notamment au niveau des cellules gonadotropes mais aussi au niveau des cellules de l'antéhypophyse et par les

cellules de la granulosa, et retrouvées dans le liquide folliculaire. Une boucle de régulation GnRH-activine-follistatine-FSH pourrait représenter un mécanisme de contrôle différentiel LH et FSH. Les activines stimulent la synthèse et la sécrétion de la FSH par l'hypophyse [342–344] alors que les follistatines [345–347] et les inhibines [344,346,348,349] l'inhibent.

2.3.3.2. Prolactine

La PRL est une hormone peptidique élaborée par les cellules lactotropes de l'antéhypophyse. Elle présente de nombreuses homologies structurales avec la GH et l'hormone placentaire lactogène (PL). Elle se lie à ses récepteurs membranaires situés notamment sur les cellules des glandes mammaires, les gonades, l'utérus et le placenta. Elle intervient dans le développement mammaire, l'entretien de la sécrétion lactée, la régulation de l'activité immunitaire, l'angiogenèse et le comportement sexuel et parental. Son implication dans la reproduction a été démontrée grâce au modèle de souris femelles *knock-out PRL^{-/-}* qui sont infertiles [350–353]. Au niveau central, la PRL a un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH sur des cultures de cellules GT1 (lignée cellulaire neuronale hypothalamique de souris) et sur des explants hypothalamiques de rat. Au niveau de l'ovaire, la PRL augmente dans le liquide folliculaire au cours de la maturation folliculaire mais diminue juste avant l'ovulation (Fig. 2.11). Elle interviendrait dans la formation et le maintien du CJ [354].

Comme pour la plupart des hormones hypophysaires, la PRL est libérée selon un mode pulsatile et suivant un rythme circadien. Sa sécrétion est régulée par de nombreuses substances endogènes (amines biogènes, neuropeptides et acides aminés) qui modulent, au niveau hypothalamique, l'activité des neurones dopaminergiques et des neurones à PRF (*Prolactin Regulating Factors*) ou agissant directement sur l'hypophyse. De même que des facteurs périphériques, essentiellement de la famille des hormones stéroïdes, agissent directement sur la transcription du gène de la prolactine pour la stimuler (œstradiol) ou l'inhiber (progestérone, glucocorticoïdes, vitamine D et hormones thyroïdiennes) [355,356]. L'hypothalamus exerce un effet inhibiteur prédominant sur la sécrétion de PRL à travers la dopamine et *via* d'autres PIF (*Prolactin Inhibiting Factors*) tels que le

GABA, la somatostatine (SRIF) et le peptide associé au facteur de libération des gonadotropines (GAP : peptide provenant de la partie carboxy-terminale du précurseur de la GnRH). D'autres hormones hypothalamiques (les PRF) ont un effet stimulant, c'est le cas de la TRH (*Thyrotropin-releasing hormone*), le VIP, l'angiotensine II, l'ocytocine, la sérotonine et les opiacés. Les niveaux de PRL sont corrélés à ceux de l'œstradiol et augmentent au moment du pic ovulatoire. Enfin, le stress, l'exercice physique et l'hypoglycémie augmentent considérablement les niveaux de PRL [354].

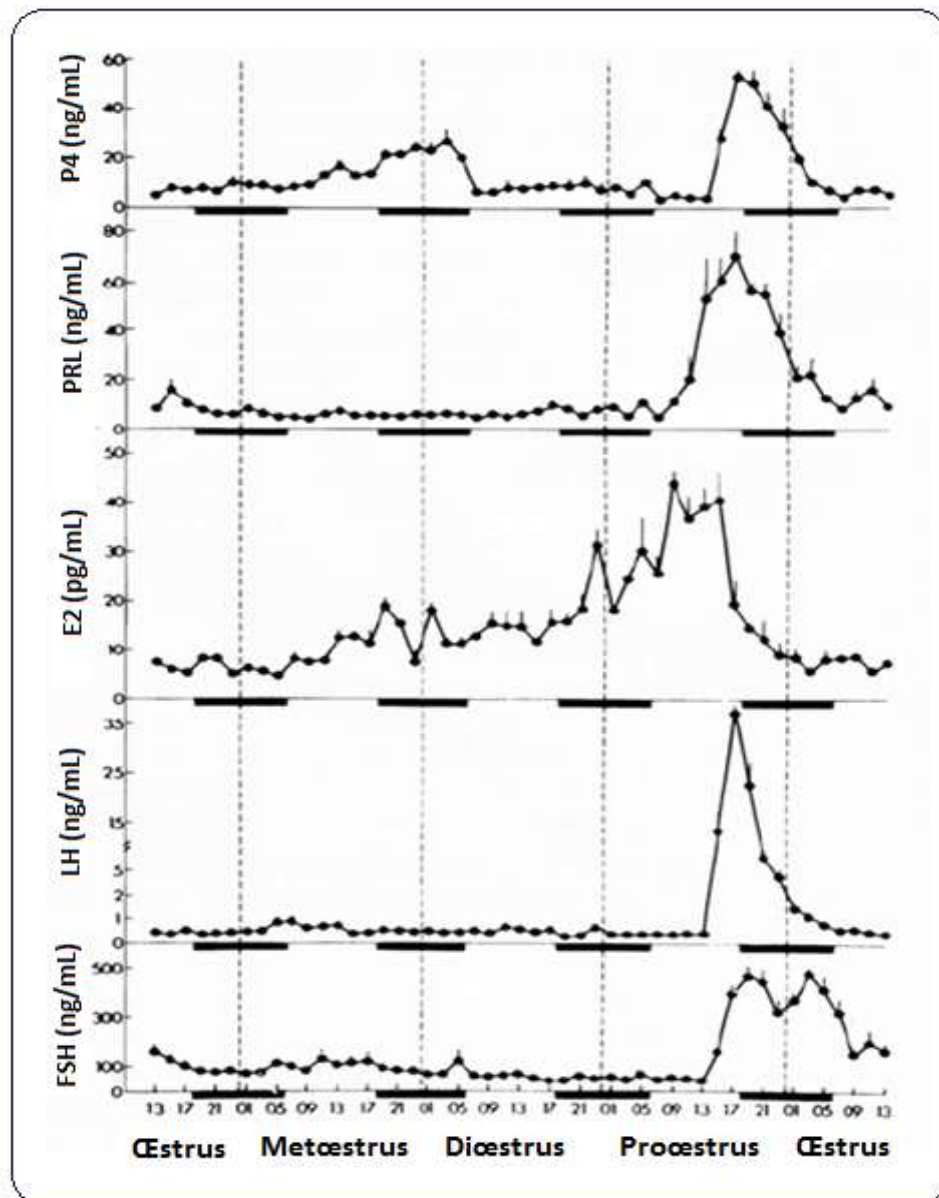


Figure 2.11 : Concentration en progestérone, prolactine, œstradiol, LH et FSH dans le plasma périphérique pendant le cycle œstral de la ratte.

Adaptée de [357].

Les régulations (centrale et périphérique) de la sécrétion de la GnRH sont résumées dans la figure 2.12.

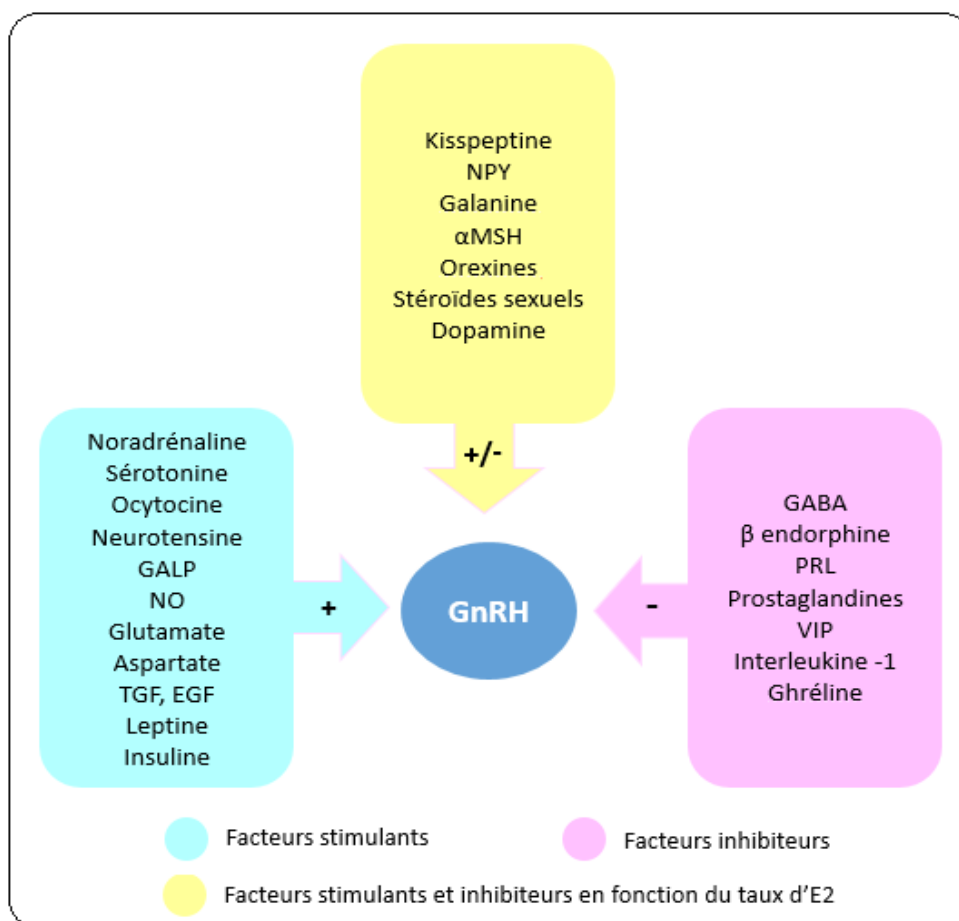


Figure 2.12 : Schéma récapitulatif des régulations centrale et périphérique de la sécrétion de la GnRH (Schéma personnel).

2.3.3.3. Actions physiologiques de la leptine sur le système reproducteur

La leptine constitue un signal permissif nécessaire au SNC pour déclencher la puberté et l'ovulation, à condition que les réserves énergétiques à long terme soient suffisantes pour assurer une gestation et une lactation, très coûteuses en énergie [6] (Fig. 2.13). Elle régule la sécrétion de la GnRH au niveau de l'hypothalamus, module celle de la LH et de la FSH au niveau de l'hypophyse antérieure [358–361] et agit directement sur les ovaires en contrôlant l'ovulation par un effet endocrine et paracrine [362,363]. La leptine possède une action centrale sur la fonction reproductive à une certaine concentration qui semble corrélée avec d'autres signaux métaboliques (la disponibilité en glucose notamment) pour réguler la sécrétion de la GnRH [364]. Des récepteurs à la

leptine ont été décrits sur les cellules GT1-7 [365] et il a été montré que cette hormone stimulerait la libération de la GnRH sur des fragments d'hypothalamus médiobasal en culture. Cette stimulation se ferait *via* la sécrétion du NO, puisqu'elle est bloquée par l'ajout d'inhibiteurs de la NOS (*NO Synthase*) au milieu d'incubation [366,367]. La leptine agit dans l'hypothalamus où elle inhibe le NPY [28,57]. Elle stimulerait la sécrétion de la GnRH à travers l'isoforme longue de son récepteur, soit en levant son inhibition par les neurones à NPY, ou par l'intermédiaire d'un circuit interneuronal : le peptide CART (*Cocaine-and amphetamine-regulated transcript* : inhibiteur endogène de la prise alimentaire) qui augmente la fréquence des pulses de GnRH et dont la sécrétion est régulée par la leptine [368]. Chez les rats impubères, un sérum anti-CART prévient partiellement la réduction des intervalles entre les pulses de GnRH mesurés au niveau de l'hypothalamus, ce qui laisse penser que le CART est un médiateur de la leptine sur les neurones à GnRH, principalement à l'approche de la puberté [369]. D'autres voies faisant intervenir des neurones à POMC et à CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*) ont également été citées, la leptine interviendrait dans la reproduction en modulant la disponibilité de la protéine POMC au niveau du cerveau [370]. CHEUNG *et al.* [81] ont démontré l'existence d'une forte corrélation dans l'expression des Ob-R avec la synthèse de la POMC, du NPY et des neurones AgRP dans l'ARC chez le rat, et l'expression de l'ARNm de la POMC est réduite de 50% chez les souris *ob/ob*, cette réduction est rétablie par l'administration de la leptine [371]. Cependant, les souris *NPY^{-/-} ob/ob* sont moins sévèrement affectées de troubles de la reproduction que les souris *ob/ob* [372]. De même que les souris déficientes en NPY et en récepteurs MC3 et MC4 (isoformes prédominantes des récepteurs de la MSH) ne présentent pas d'altérations majeures de la fertilité ou de la reproduction [372–374], ce qui laisse penser que la leptine n'emprunte pas cette voie pour agir sur la reproduction [61].

La mise en évidence du récepteur de la leptine au niveau de l'ovaire [363,375–378] et du testicule [64,379] a permis de confirmer une action directe de la leptine sur les gonades.

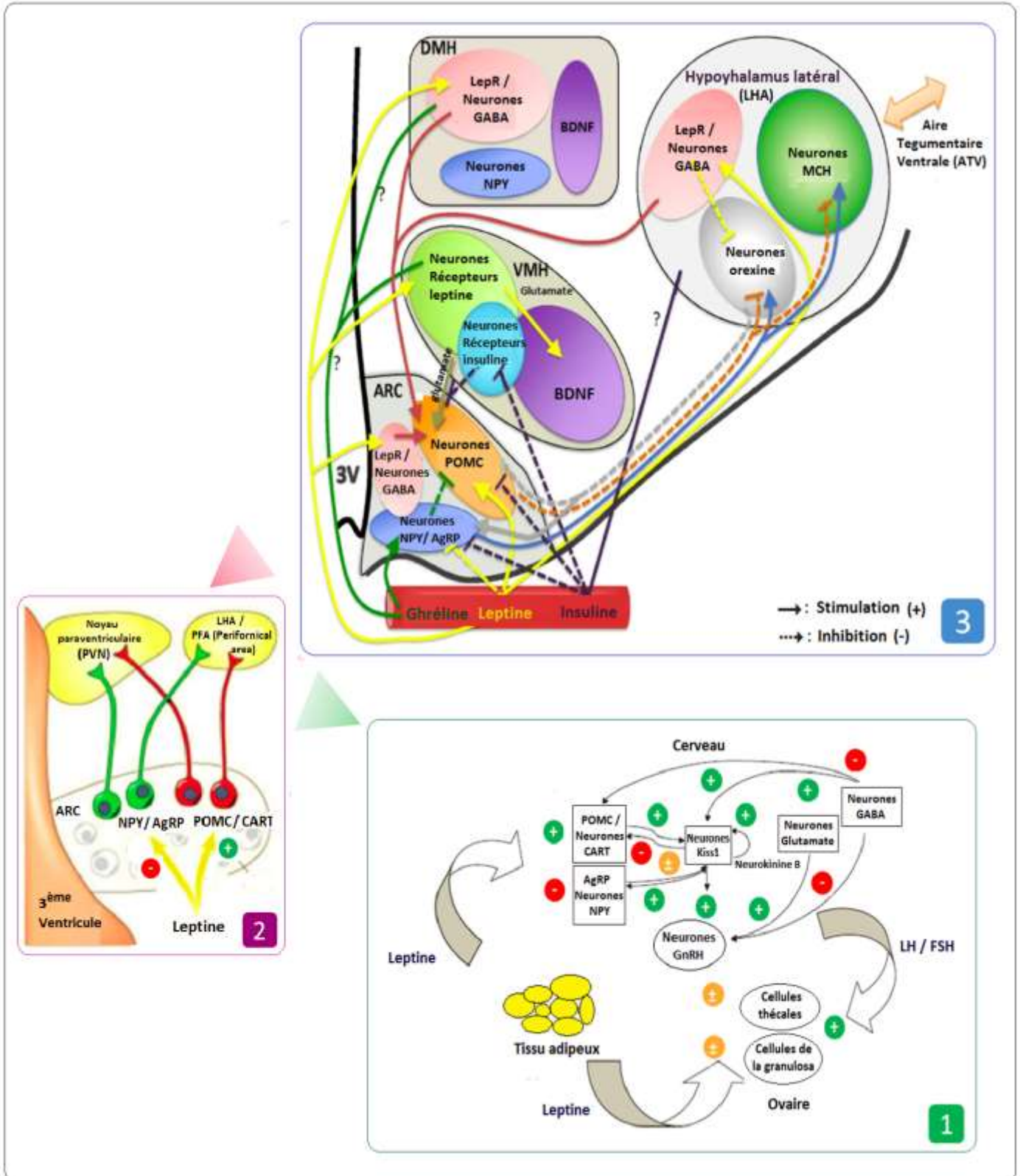


Figure 2.13 : Interactions de la leptine avec l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

(1) : La leptine stimule les neurones POMC / CART et Glutamate, et inhibe les neurones AgRP / NPY et GABA pour moduler la reproduction centralement. Au niveau ovarien, elle peut avoir des effets différents selon les états métaboliques. Adaptée de [380]. (2) : Adaptée de [381]. (3) : La leptine active les neurones du VMH en augmentant la commande glutamatergic excitatrice des neurones POMC ou par augmentation de la signalisation BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) dans le VMH. Adaptée de [382].

PARTIE EXPERIMENTALE



CHAPITRE 3

MATERIEL & METHODES

3.1. Matériel

3.1.1. Matériel biologique : Animaux

L'expérimentation est réalisée sur 42 rats femelles de race Wistar : *Rattus norvegicus* (souche de rats albinos) provenant de l'animalerie de la Faculté des Sciences biologiques (FSB) de l'USTHB.

3.1.2. Matériel non biologique

Les réactifs, les colorants, les produits chimiques et les appareillages utilisés pour l'accomplissement de cette thèse ont été fournis par le Laboratoire d'Endocrinologie (Laboratoire de Biologie et de Physiologie des Organismes, LBPO, USTHB), le Laboratoire d'Histologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Nafissa HAMMOUD (Ex. Parnet, Hussein Dey, Alger) et le Centre Nucléaire de Draria (CNDR).

3.2. Méthodes

3.2.1. Constitution des lots

Les expériences sont réalisées sur des animaux répartis en deux lots : un lot d'animaux âgés de 30 jours et un lot d'animaux âgés de 60 jours. Chaque lot comprend un groupe témoin (T) et un groupe expérimental (E). La femelle témoin et la femelle expérimentale correspondante ont un poids corporel initial peu différent : 55.58 ± 4.17 vs 55.42 ± 4.64 g (pour les femelles de 30 jours témoins et expérimentales respectivement) et 150.89 ± 2.83 vs 150.50 ± 4.22 g (pour les femelles de 60 jours témoins et expérimentales respectivement).

La répartition des animaux par expérimentation est précisée dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Nombre d'animaux par expérimentation.

Age		30 Jours		60 Jours	
Groupe		T	E	T	E
Etude pondérale		n=12	n=12	n=9	n=8
Frottis vaginaux		-	-	n=10	n=10
Dosages hormonaux	LH	n=7	n=7	n=6	n=7
	FSH	n=6	n=6	n=5	n=5
	Œstradiol	-	-	n=8	n=8
	Progestérone	n=7	n=8	n=9	n=7
Etude histologique		n=10	n=10	n=10	n=10

3.2.2. Expérimentation

Les femelles sont isolées de leur mère et des mâles dans des cages individuelles dès le sevrage. Afin d'assurer leur adaptation à leur nouvel environnement, les animaux sont acheminés depuis l'animalerie de la FSB au Laboratoire d'Endocrinologie deux jours avant le début de l'expérimentation. Ils sont maintenus à température et hygrométrie ambiante. Le laboratoire ayant une façade entièrement vitrée, les animaux sont soumis à la luminosité extérieure.

L'aliment pour « *Rats & Souris* » se présente sous forme granulée et est composé de : maïs, son, tourteau de soja, calcaire et CMV (Complément Minéralo-Vitaminique). Il est distribué à raison de 30 g / jour. 200 mL d'eau de boisson additionnée de 0.5 mL de vitamines est distribuée quotidiennement. Une déficience en vitamines anti-oxydantes est susceptible d'affecter le métabolisme de la leptine et contribuer au syndrome métabolique lié au surpoids [383].

La pesée des animaux et la quantité d'aliment consommée sont mesurées quotidiennement pendant une période d'essai de 5 jours. Une fiche hebdomadaire est remplie quotidiennement à cet effet.

3.2.2.1. Préparation de la solution de leptine

Avant d'être utilisée, la leptine (Leptin rat, Lyophilised powder, Sigma-Aldrich®, USA) est diluée à raison de 1 mg dans 100 mL d'NaCl à 9‰ (soit 10 µg / mL).

3.2.2.2. Dose de leptine à injecter & Rythme des injections

La leptine est injectée par voie intra-péritonéale à raison de : 8 µg / 100 g de poids corporel. Le même volume de la solution NaCl est injecté aux femelles témoins. Le lieu d'injection est le cadran inférieur gauche. Les animaux reçoivent une injection quotidienne vers 9h00 pendant 5 jours.

3.2.2.3. Sacrifice & Prélèvements

Les animaux sont sacrifiés 24 heures après la dernière injection par décapitation. Une fiche est établie et remplie le jour du sacrifice. Le sang est recueilli dans un tube sec additionné d'EDTA à 2%, puis centrifugé. Le plasma aliquoté est réparti à l'aide d'une micropipette dans des tubes eppendorf à raison de 150 µL par tube, puis immédiatement congelé à - 20 °C pour des dosages plasmatiques ultérieurs. Les ovaires sont prélevés et pesés. Les ovaires droits sont fixés dans du formaldéhyde à 10% pour une étude histologique tandis que les ovaires gauches sont congelés à - 20 °C pour une étude immuno-histologique.

3.2.3. Frottis vaginaux

Afin de déterminer le stade du cycle œstral au moment du sacrifice, un frottis vaginal est réalisé sur les femelles âgées de 60 jours juste avant le sacrifice. Après contention de l'animal, quelques gouttes d'eau physiologique sont déposées délicatement dans le vagin à l'aide d'un compte-goutte à extrémité effilée puis aspirées aussitôt. Le liquide récupéré est déposé sur une lame. Les observations sont réalisées soit directement au microscope photonique, soit après coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG).

3.2.3.1. Principe de la coloration au MGG

Cette coloration 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 est composé d'un colorant acide (éosine) et d'un colorant basique (bleu de méthylène). Il fixe le frottis par son méthanol et colore les éléments acidophiles et les granulations différenciées, spécifiques des leucocytes.
- Le Giemsa est constitué lui aussi d'éosine et d'un autre colorant basique métachromatique : l'azur de méthylène. Il surcolore les noyaux et colore les granulations azurophiles (Appendice B).

3.2.3.2. Technique de coloration

- Placer la lame sur un support horizontal.
- Déposer le May-Grünwald pour fixer le frottis.
- Laisser agir 20 minutes.
- Verser le Giemsa dilué au 1/5^{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 à l'intérieur d'une étuve.

3.2.3.3. Observation

Les lames colorées sont observées au microscope photonique à l'objectif 40.

3.2.4. Histologie

L'étude histologique a été réalisée au niveau du Laboratoire d'Endocrinologie (LBPO, USTHB) et du Laboratoire d'Histologie du CHU Nafissa HAMMOUD (Ex. Parnet), et avait pour objectif d'observer sur les coupes histologiques l'effet de la leptine sur la croissance et le développement des follicules ovariens, la constitution des corps jaunes et le processus ovulatoire.

3.2.4.1. Fixation

La fixation est effectuée juste après le prélèvement [384], immédiatement après la pesée de l'ovaire, par immersion dans du formaldéhyde à 10%. Ce dernier a pour particularité de pénétrer rapidement et de fixer lentement, contrairement au Bouin (mélange de formol et d'acide picrique) qui pénètre lentement et fixe rapidement.

3.2.4.2. Déshydratation & Eclaircissement

L'inclusion à la paraffine permet la réalisation de coupes fines et régulières. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une *déshydratation* qui a pour but d'éliminer le fixateur ainsi que l'eau contenus dans le tissu, par passages successifs dans des solutions l'éthanol de degrés croissants. L'alcool est ensuite éliminé à l'aide d'un solvant miscible à la paraffine : le xylène ou le toluène (hydrocarbures). Au fur et à mesure de leur infiltration par le solvant les tissus s'éclaircissent : c'est l'*éclaircissement* ou la *clarification*.

Deux méthodes de déshydratation ont été utilisées :

- ✓ Protocole du Laboratoire d'Histologie du CHU Nafissa HAMMOUD (Ex. Parnet) : La pièce fixée dans le formol est placée dans une cassette préalablement identifiée qui est mise dans un bac de rinçage en laissant l'eau du robinet s'écouler pendant 1 heure de temps environ, puis la déshydratation est réalisée à l'aide d'un automate avec des bains successifs d'éthanol à 100°, de xylène et de paraffine.
- ✓ Protocole classique (sur tube)
 - Laver l'échantillon préalablement conservé dans le formol 3 fois à l'eau courante puis le placer dans un flacon propre.
 - Ajouter de l'éthanol à 70°.
 - Effectuer 3 bains de 15 minutes chacun.
 - Changer de flacon et ajouter de l'éthanol à 90°.
 - Effectuer 3 bains de 15 minutes chacun.
 - Changer de flacon et ajouter de l'éthanol à 100°.
 - Effectuer 4 bains de 15 minutes chacun.
 - Changer de flacon et ajouter du toluène.
 - Effectuer 4 bains de 15 minutes chacun.

3.2.4.3. Inclusion

L'inclusion consiste à infiltrer et à enrober les tissus à examiner avec de la paraffine. Deux méthodes d'inclusion ont été utilisées :

✓ Protocole du Laboratoire d'Histologie du CHU Nafissa HAMMOUD (Ex. Parnet) : La pièce placée dans une cassette est plongée dans de la paraffine fondue (portée à : 56 à 60 °C). La chaleur provoque l'évaporation du solvant et les espaces ainsi libérés sont remplis par la paraffine. La pièce est ensuite placée dans un petit moule (contenant de la paraffine fondue), qui sera placé sur une plaque réfrigérée, ce qui provoque son durcissement. Après démoulage, on obtient un bloc de paraffine contenant la pièce incluse.

✓ Protocole classique : l'inclusion est réalisée comme suit :

- Les pièces sont placées dans un flacon propre.
- De la paraffine préalablement liquéfiée (à 60 °C) est ajoutée.
- Les échantillons sont placés dans une étuve pendant 24 heures.
- Dans un autre flacon, un 2^{ème} bain de paraffine de 24 heures est réalisé.
- Un 3^{ème} bain de paraffine pendant 24 heures est nécessaire.
- L'inclusion est faite à l'aide de barres de Leuckart après le dernier bain.
- Une étiquette confectionnée avec du papier Bristol avec l'identité de l'échantillon l'accompagne tout au long de ces étapes.
- La préparation des cassettes est réalisée de la même façon que pour la première méthode.

3.2.4.4. Préparation des coupes

La gonade est généralement coupée suivant un plan sagittal. Les coupes sériées sont réalisées à l'aide d'un microtome de marque Leica®. Les rubans obtenus (de 2 µm d'épaisseur) sont placés directement dans un bain-marie où la température est réglée à 37 °C avant d'être récupérés sur des lames en verre numérotées. Ces dernières sont ensuite placées dans une étuve réglée à 60 °C (Protocole du Laboratoire d'Histologie du CHU Nafissa HAMMOUD, Ex. Parnet).

3.2.4.5. Coloration

Les colorants étant en solution aqueuse, les coupes doivent être réhydratées. La *réhydratation* est effectuée après *déparaffinage* des coupes par passage dans du xylène pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite séchées à l'étuve.

Deux colorations topographiques ont été utilisées :

- ✓ *Coloration à l'Hémalun Eosine (H&E)* : Cette coloration histologique permet de visualiser la morphologie des cellules en associant une coloration nucléaire par l'hématoxyline (contenant de l'hématéine et un mordant) à une coloration du cytoplasme et du collagène par l'éosine. Cette dernière colore les cytoplasmes en rose et les fibres dans une gamme de roses plus ou moins vifs selon l'acidophilie des différents éléments (Appendice C).
- ✓ *Coloration au Trichrome de Masson* : Cette coloration topographique trichromique, permet une coloration nucléaire noirâtre (hématoxyline), une coloration cytoplasmique rouge-clair ou rose par un mélange de colorants acides (fuchsine-ponceau) et une coloration verte élective des fibres de collagène (vert lumière) (Appendice D).

Les premières étapes de ces deux colorations sont communes :

- Les lames préalablement déparaffinées et séchées sont placées dans de l'alcool absolu pendant 10 minutes.
- Elles sont ensuite rincées à l'eau courante pendant 1 minute puis colorées à l'hématoxyline pendant 15 secondes.
- Elles sont ensuite rincées à l'eau courante pendant 5 minutes puis, soit :
 - placées dans l'éosine pendant 30 secondes et rincées à l'eau courante pour la coloration H&E ;
 - placées dans de la fuchsine acide pendant 30 secondes, rincées puis plongées dans une solution d'acide phosphomolybdique pendant 15 minutes, puis dans le vert lumière pendant 3 minutes et enfin rincées pour la coloration au Trichrome de Masson.

3.2.4.6. Montage

Après avoir subi une déshydratation, les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec l'Eukitt®, résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. La lame est prête à être observée au microscope photonique.

3.2.4.7. Observation microscopique

Les coupes histologiques ont été observées à l'aide d'un microscope photonique de marque Optika®. La prise de photographies a été réalisée à l'aide d'une caméra Hirocam®. Les images ainsi obtenues ont été directement enregistrées sur un ordinateur *via* le logiciel TSVIEW® puis analysées, ce qui a permis de retenir plus aisément les lames d'intérêt. Au total, 3 985 images histologiques ont été retenues et analysées dont 1 553 pour les ovaires de 30 jours et 2 432 pour ceux de 60 jours.

✓ Classification des stades folliculaires

Dans notre étude, nous nous sommes basées sur la classification de PEDERSEN et PETERS chez la souris qui spécifie 10 stades folliculaires [385]. Par souci de simplification, nous avons regroupé certains stades folliculaires (Fig. 3.1 & Tableau 3.2).

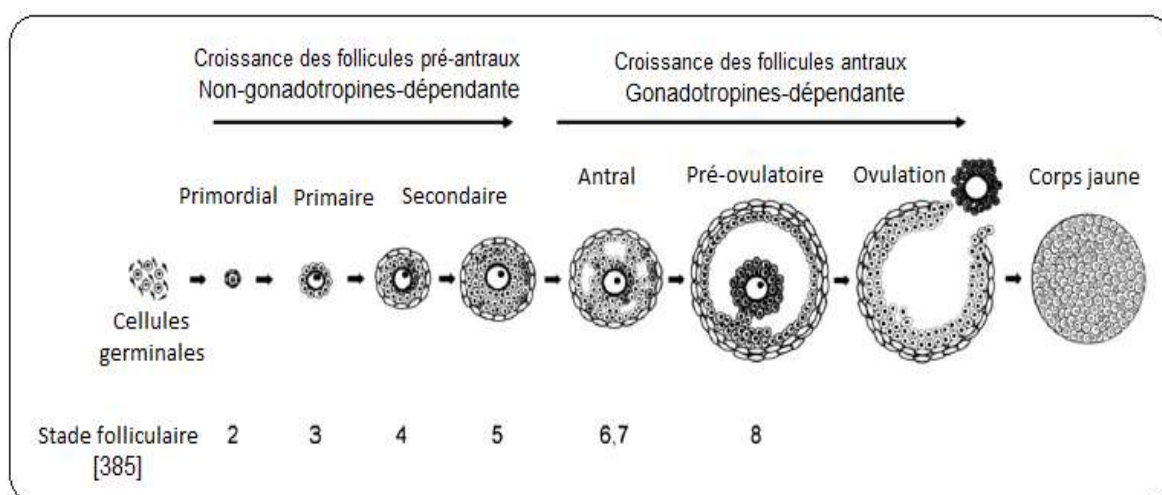


Figure 3.1 : Différents stades du développement folliculaire.

Adaptée de [188].

Tableau 3.2 : Classification de PEDERSEN et PETERS des différents stades folliculaires et classification retenue dans cette thèse.

Classification de PEDERSEN et PETERS [385]		Classification retenue
Type	Description	
1	Ovocyte de taille réduite dépourvu de cellules folliculaires à sa surface	-
2	Ovocyte de taille réduite, entouré de quelques cellules folliculaires qui ne forment pas un anneau complet	Follicule primordial
3a	Ovocyte de taille réduite ou moyenne entouré d'un anneau complet de cellules folliculaires (< 20 cellules folliculaires*)	Follicule primaire
3b	Ovocyte de taille moyenne entouré d'un anneau complet de cellules folliculaires (21 à 61 cellules folliculaires*)	
4	Ovocyte de taille moyenne entouré de deux couches de cellules folliculaires (61 à 100 cellules folliculaires*)	Follicule secondaire
5a	Ovocyte de taille moyenne ou grande entouré de 3 couches de cellules folliculaires (101 à 200 cellules folliculaires*)	
5b	Ovocyte de grande taille entouré de plus de 3 couches de cellules folliculaires (201 à 400 cellules folliculaires*)	
6	Ovocyte de grande taille entouré de plusieurs couches de cellules folliculaires (401 à 600 cellules folliculaires*) creusées de plusieurs petites cavités antrales	Follicule tertiaire
7	Ovocyte de grande taille creusé d'une cavité antrale unique (> 600 cellules folliculaires*). Le <i>cumulus oophorus</i> est formé	Follicule pré-ovulatoire
8	Ovocyte de grande taille creusé d'une cavité antrale unique (> 600 cellules folliculaires*). Le <i>cumulus oophorus</i> et le pédicule qui le soutient sont bien formés	

* : Nombre de cellules folliculaires sur la coupe la plus large.

✓ *Critères de classification des follicules en follicules atrétiques*

Les critères morphologiques retenus pour la classification d'un follicule en follicule atrétique sont [386–391] :

- le nombre de cellules folliculaires à noyaux pycnotiques : un follicule est considéré comme atrétique s'il présente sur sa plus grande section de coupe, en présence de l'ovocyte et de son noyau plus de deux cellules folliculaires à noyau pycnotiques ;
- l'importance du décollement de la granulosa par rapport à la thèque interne ;
- la présence d'altérations ou la fragmentation de la membrane basale ;
- au niveau de la thèque interne : la présence d'un tissu conjonctif riche en fibres de collagène, plutôt que des cellules thécales ;
- la réduction de la vascularisation thécale ;
- le degré d'isolement de l'ovocyte et du *cumulus* par rapport à la granulosa ;
- la dégénérescence de l'ovocyte ou des structures qui lui sont liées : nous avons considéré : l'état nucléaire, l'homogénéité du cytoplasme, la forme et l'union des cellules de la *corona radiata* et la lutéinisation des cellules.

✓ *Détermination des stades du cycle œstral*

Comme il est difficile de déterminer le stade œstral sur la base de l'apparition des follicules ovariens chez une espèce comme le rat, qui a un cycle œstral court (puisque les follicules à différents stades de développement sont généralement présents dans les ovaires à toutes les phases du cycle), nous nous sommes basées sur la formation, la progression et la régression des CJ qui sont plus ou moins synchronisés et peuvent être utilisés comme outil pour la détermination de la phase du cycle œstral [392,393] parallèlement au frottis vaginal.

3.2.5. Dosages hormonaux

Les dosages ont été réalisés au niveau du Laboratoire d'Endocrinologie (LBPO, FSB, USTHB) et du CNDR.

Les hormones LH, FSH et progestérone ont été évaluées à l'aide de Kits Immunotech® (France), le 17 β -œstradiol par les kits CisBio Saclay® (France).

Le matériel nécessaire au dosage non fourni avec les trousse, et le matériel et les réactifs fournis avec les trousse sont présentés dans les Appendices E et F.

3.2.5.1. Principe

Le dosage radioimmunométrique (IRMA) de la LH et de la FSH est un dosage de type sandwich. Les trousse (LH IRMA KIT et FSH IRMA KIT) utilisent des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre deux épitopes différents de la molécule et réagissant sans compétition. Dans des tubes recouverts d'un premier anticorps monoclonal, les échantillons ou les calibrateurs sont incubés en présence d'un second anticorps monoclonal marqué à l'iode 125. Après incubation, le contenu des tubes est aspiré, les tubes sont rincés afin d'éliminer les anticorps marqués non fixés et la radioactivité liée est mesurée. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de la courbe standard. La quantité de radioactivité est directement proportionnelle à la concentration de l'hormone recherchée et mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Wallac Wizard 1470®).

Le principe du dosage radioimmunologique (RIA) du 17 β -œstradiol (Trousse ESTR-US-CT) repose sur une méthode en deux étapes sur phase solide :

- Dans la première étape, les calibrateurs et les échantillons de sérums sont ajoutés dans les tubes contenant un anticorps anti-œstradiol de haute affinité. Après incubation, la quantité d'œstradiol est fixée au fond du tube. Cette quantité d'hormone est proportionnelle à la concentration d'œstradiol présente dans l'échantillon.
- Dans la deuxième étape, on ajoute dans le tube une solution contenant du 125 I-œstradiol pour saturer les sites d'anticorps restés libres. Après incubation, la quantité de traceur non lié est ensuite éliminée. La quantité d'œstradiol marquée, liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'œstradiol non marquée présente dans l'essai.

Le dosage radioimmunologique de la progestérone est un dosage par compétition (Trousse RIA PROGESTERONE). Les échantillons à doser ou les calibrateurs sont incubés dans des tubes recouverts d'anticorps avec un traceur progestérone marqué à l'iode 125. Après incubation, le contenu du tube est aspiré, puis la

radioactivité est mesurée. Une courbe d'étalonnage est établie. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de cette courbe.

3.2.5.2. LH et FSH

3.2.5.2.1. Procédure

- ✓ *Préparation des réactifs* : Equilibrer les réactifs à température ambiante.
- ✓ *Préparation des calibrateurs et du sérum de contrôle* : Reprendre par le volume d'eau distillée indiqué sur les étiquettes des flacons. Attendre 30 minutes après reconstitution et agiter doucement en évitant la formation de mousse avant de répartir dans les tubes.
- ✓ *Préparation de la solution de lavage (Distribution)* : Verser le contenu du flacon dans 950 mL d'eau distillée puis homogénéiser.
- ✓ *Procédure* : Equilibrer les réactifs à la température du laboratoire avant utilisation (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Différentes étapes du dosage radioimmunométrique de la LH et de la FSH.

Etape 1 Répartition *	Etape 2 Incubation	Etape 3 Comptage
Dans les tubes recouverts d'anticorps, distribuer successivement : 100 µL de calibrateur, de contrôle ou d'échantillon et 50 µL de tracer (Hormone marquée à l'iode 125) Agiter au vortex	Incuber 90 minutes à 18 à 25 °C avec agitation (> 350 rpm) ou durant la nuit (18 h) à 18 à 25 °C sans agitation	Aspirer soigneusement le contenu de chaque tube (sauf les 2 tubes « cpm totaux ») Laver 2 fois avec 2 mL de solution de lavage Compter les cpm liés (B) et les cpm totaux (T) pendant 1 minute

*: Ajouter 50 µL de tracer dans 2 tubes secs supplémentaires pour obtenir les cpm totaux. cpm : coup par minute, rpm : rotation par minute.

3.2.5.2.2. Courbes standard

Les résultats sont déduits de la courbe standard par interpolation. La courbe sert à déterminer les taux de LH / FSH de tous les échantillons mesurés en même temps

que les calibrateurs (Tableau 3.4 et Fig 3.2 & 3.3). Les résultats sont calculés en employant un mode de tracé log-log (mode « spline ») avec en ordonnée la radioactivité mesurée ($\text{cpm}_{\text{cal.}} - \text{cpm}_{\text{cal.0}}$) et en abscisse les concentrations en LH / FSH des calibrateurs (UI/L).

Tableau 3.4 : Concentrations (en UI/L) des calibrateurs utilisés pour les courbes standard de la LH et de la FSH.

Calibrateurs	LH IRMA	FSH IRMA
Standard 0	0	0
Standard 1	0.45	0.54
Standard 2	2.40	2.67
Standard 3	15.3	16
Standard 4	64	64
Standard 5	180	180
Sérum de Contrôle	6.64 – 11.2	C1 : 9.30 – 13.9 C2 : 33.6 – 50.4

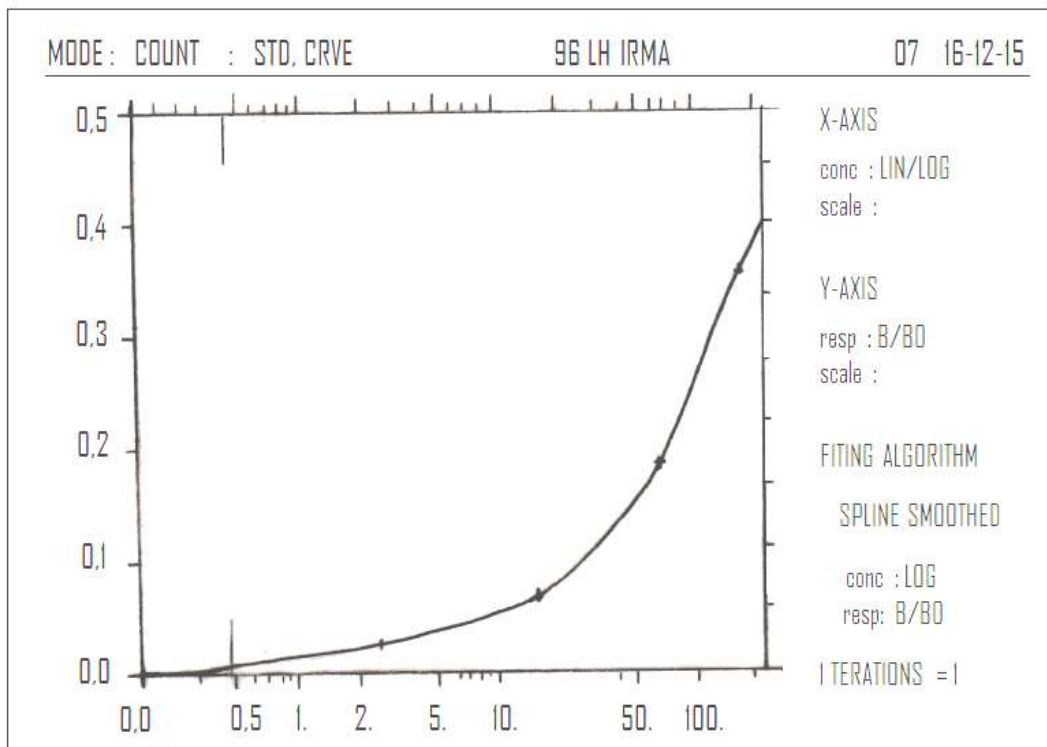


Figure 3.2 : Courbe standard de la LH.

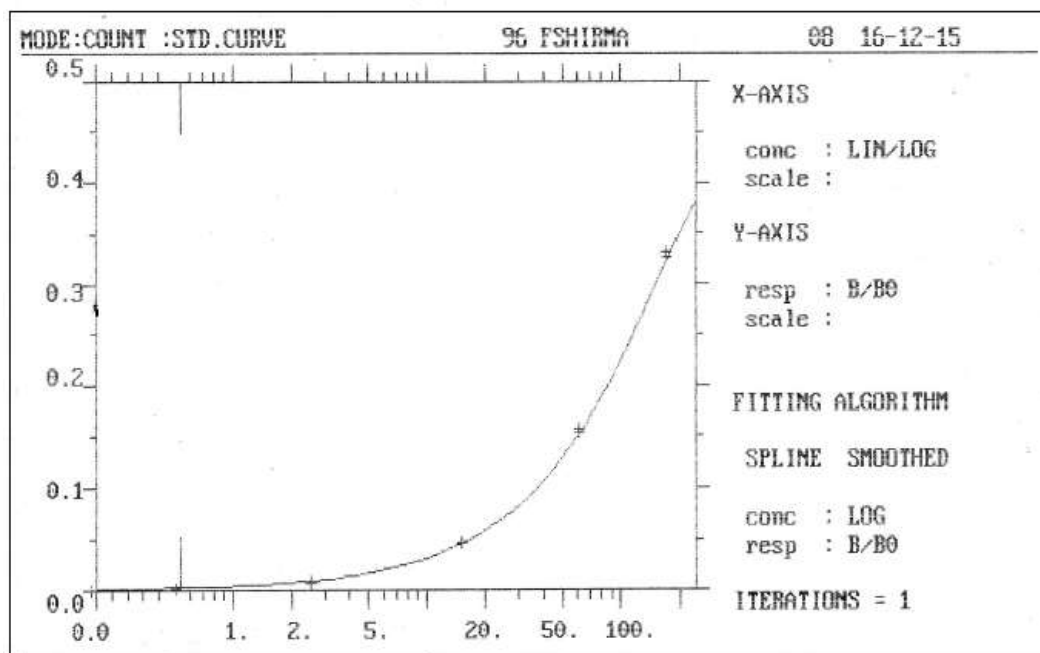


Figure 3.3 : Courbe standard de la FSH.

3.2.5.2.3. Performances du dosage

La sensibilité est définie comme étant la plus petite concentration significative différente de zéro pour une probabilité de 95%.

L'utilisation de 2 anticorps dirigés contre 2 épitopes différents améliore la reconnaissance spécifique. L'anticorps utilisé dans le dosage est hautement spécifique. Des réactivités croisées extrêmement basses ont été obtenues vis-à-vis de nombreuses molécules apparentées.

Les performances du dosage pour la LH et la FSH sont résumées dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Performances des dosages de la LH et de la FSH.

Performances		LH IRMA	FSH IRMA
Sensibilité	Analytique	0.16 UI/L	0.2 UI/L
	Fonctionnelle	0.48 UI/L	0.5 UI/L
Spécificité		Anticorps utilisé hautement spécifique	Anticorps utilisé hautement spécifique
Précision	Intra-essai	Coefficients de variation ≤ 7.33%	Coefficients de variation ≤ 2.6%
	Inter-essai	Coefficients de variation ≤ 8.42%	Coefficients de variation ≤ 6.3%
Exactitude	Epreuve de dilutions	Pourcentages de recouvrement entre 80.7% et 102%	Pourcentages de recouvrement entre 81.6% et 117%
	Epreuve de surcharge	Pourcentages de recouvrement entre 103% et 119%	Pourcentages de recouvrement entre 90.75% et 103%

3.2.5.3. 17 β-œstradiol

3.2.5.3.1. Procédure

- Dilution de la solution de lavage : Diluer au 1/333 la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée (1.5 mL dans 498.5 mL d'eau distillée pour obtenir un volume final de 500 mL). Reboucher le flacon et mélanger.
- Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (18 à 25 °C) au moins 30 minutes avant leur utilisation. La distribution des réactifs dans les tubes revêtus s'effectue également à température ambiante. Le dosage nécessite les groupes de tubes suivants :
 - Groupe T pour la détermination de l'activité totale.
 - Groupes Calibrateurs pour l'établissement de la courbe d'étalonnage.
 - Groupes Sx pour les échantillons à doser.

Les étapes du protocole sont indiquées dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Différentes étapes du dosage radioimmunologique de l'œstradiol.

Etape 1 Répartition 1	Etape 2 Incubation 1	Etape 3 Répartition 2	Etape 4 Incubation 2	Etape 5 Comptage
<p>Distribuer 200 µL de calibrateurs et d'échantillons dans les tubes revêtus correspondants</p> <p>Ajouter 250 µL de tampon dans tous les tubes, sauf les tubes T</p> <p>Agiter au vortex</p>	<p>Incuber 1 heure à 37 °C après avoir couvert les tubes avec du parafilm</p>	<p>Ajouter 100 µL de 125 I-œstradiol dans tous les tubes, y compris les tubes T</p> <p>Remettre le traceur restant au réfrigérateur</p> <p>Agiter au vortex</p>	<p>Incuber 1 heure à 37 °C après avoir couvert les tubes avec du parafilm</p>	<p>Eliminer la solution par retournement puis en tapotant les tubes retournés sur du papier absorbant et les laisser 5 minutes au moins retournés sur le papier (sauf les tubes T)</p> <p>Mesurer la radioactivité liée aux tubes revêtus (2 minutes minimum)</p>

3.2.5.3.2. Courbe standard

Pour chaque groupe de tubes, faire la moyenne des comptages. Calculer les B/Bo. Construire la courbe d'étalonnage en semi-log en exprimant les B/Bo des calibrateurs (Tableau 3.7) en fonction de leur concentration. Lire les valeurs des échantillons à partir de la courbe d'étalonnage en corrigeant s'il y a lieu par le facteur de dilution (Fig 3.4). La conversion en pg/mL peut être calculée en utilisant la formule suivante : œstradiol (pg/mL) = œstradiol (pmol/L) x 0.2724.

Le modèle mathématique de lissage préconisé est le « spline forcé ». Les autres modèles de lissage peuvent donner des résultats légèrement différents.

Tableau 3.8 : Différentes étapes du dosage radioimmunologique de la progestérone.

Etape 1 Répartition	Etape 2 Incubation	Etape 3 Comptage
<p>Dans les tubes recouverts d'anticorps, distribuer successivement : 50 µL de calibrateur, de contrôle ou d'échantillon et 500 µL de tracer *</p> <p>Agiter au vortex</p>	<p>Incuber 1 heure à 18 à 25 °C avec agitation (350 rpm)</p>	<p>Aspirer soigneusement le contenu de chaque tube (sauf les 2 tubes « cpm totaux »)</p> <p>Compter les cpm liés (B) et les cpm totaux (T) pendant 1 minute</p>

* : Ajouter 500 µL de tracer dans 2 tubes supplémentaires pour obtenir les cpm totaux. cpm : coup par minute, rpm : rotation par minute.

3.2.5.4.2. Courbe standard

Les résultats sont déduits de la courbe standard par interpolation. La courbe sert à déterminer les taux de progestérone de tous les échantillons mesurés en même temps que les calibrateurs (Tableau 3.9 et Fig. 3.5). Les résultats sont calculés en employant un mode de tracé semi-logarithmique pour la gamme standard (mode « spline ») avec en ordonnée le rapport B/T (%) ou B/B₀ (%) et en abscisse les concentrations en progestérone des calibrateurs (ng/mL).

Tableau 3.9 : Concentrations (en ng/mL) des calibrateurs utilisés pour la courbe standard de la progestérone.

Calibrateurs	RIA PROGESTERONE
Standard 0	0
Standard 1	0.1
Standard 2	0.5
Standard 3	2.0
Standard 4	13
Standard 5	55
Sérum de Contrôle	C : 0.670 [0.85-1.41] / C' : 2.265

Tableau 3.10 : Performances des dosages de l'œstradiol et de la progestérone.

Performances		ESTR-US-CT	RIA PROGESTERONE
Sensibilité		5 pmol/L	0.03 ng/mL (0.10 nmol/L)
Spécificité		100%	Anticorps utilisé hautement spécifique
Précision	Intra-essai	Coefficients de variation ≤ 18.1%	Coefficients de variation ≤ 8.15%
	Inter-essai	Coefficients de variation ≤ 17.6%	Coefficients de variation ≤ 8.66%
Exactitude	Epreuve de dilutions	-	Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 81.6% et 120%
	Epreuve de surcharge	Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 88% et 117%	Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 80% et 106%

Le schéma récapitulatif du protocole expérimental suivi est résumé dans la figure 3.6.

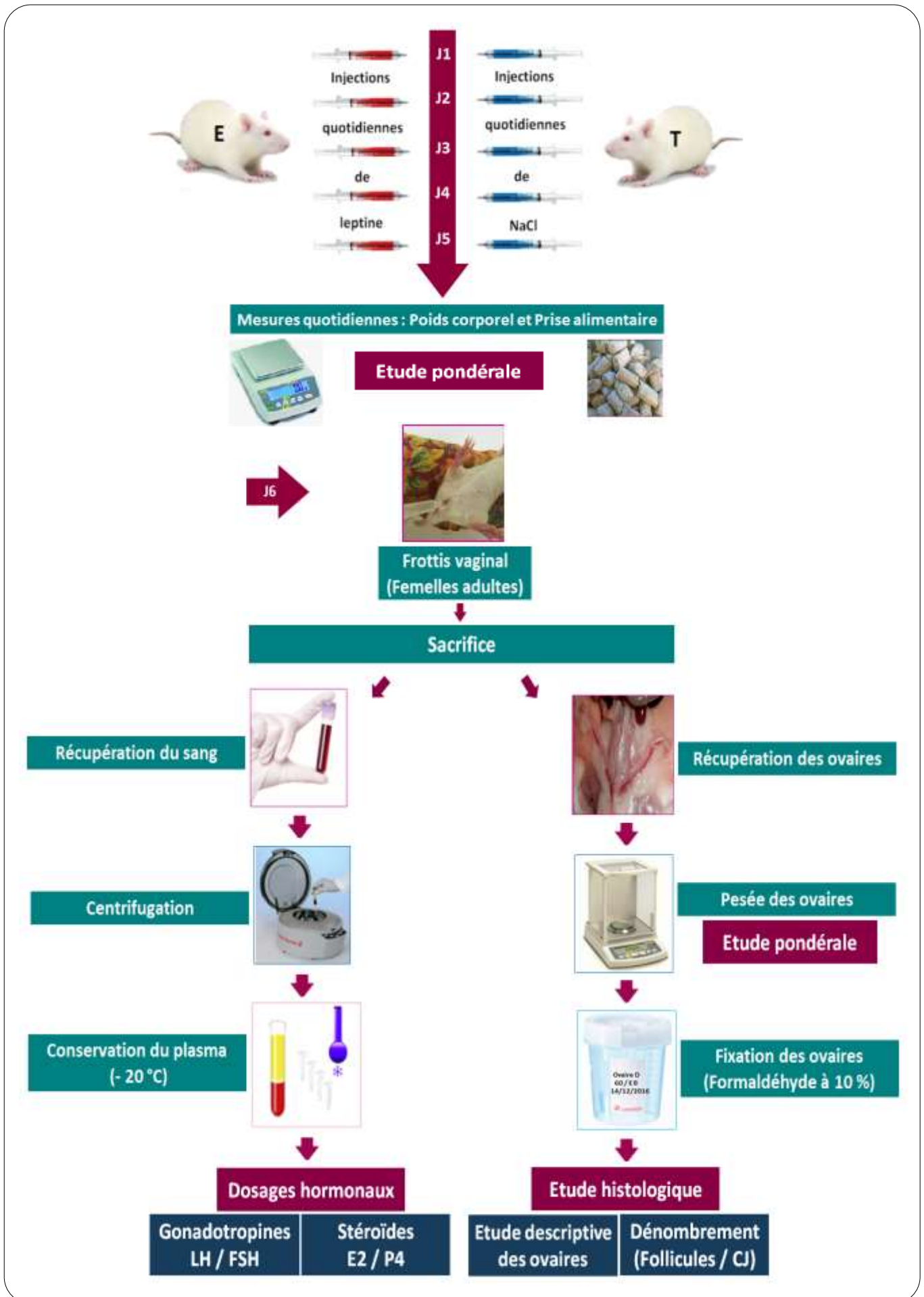


Figure 3.6 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

3.2.6. Analyse statistique

Les moyennes obtenues pour chaque expérimentation sont exprimées sous forme de : Moyenne arithmétique \pm ESM (ou SEM : Standard Error of the Mean).

L'analyse statistique est réalisée à l'aide du test de Student. Le niveau de significativité est de : $p < 0.05$.

- Si $p > 0.05$: La différence est non significative (NS) ;
- Si $p < 0.05$: La différence est peu significative (*) ;
- Si $p < 0.01$: La différence est significative (**) ;
- Si $p < 0.001$: La différence est très significative (***) .

CHAPITRE 4

RESULTATS

4.1. Etude pondérale

4.1.1. Poids corporel

Chez les femelles âgées de 30 jours, les courbes d'évolution du poids corporel (PC) et de la consommation d'aliment sont superposables entre les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine. Chez les animaux de 60 jours, une diminution significative du poids corporel (150.50 ± 4.02 vs 157.78 ± 3.51 g, $p < 0.05^*$) ainsi qu'une diminution très significative de la quantité d'aliment ingéré (14.75 ± 0.31 vs 16.33 ± 1.22 g, $p < 0.01^{**}$) sont observées à J5 chez les femelles traitées par rapport aux témoins (Tableau 4.1 & Fig. 4.1).

Tableau 4.1 : Evolution de la quantité d'aliment consommé et du poids corporel à 30 et 60 jours d'âge.

(Valeurs en grammes exprimées en Moyenne \pm ESM, *Signification* : α (0.05), > 0.05 ^{NS}, $< 0.01^{**}$, $< 0.05^*$).

Variables		30 / T (n=12)	30 / E (n= 12)	<i>p</i>	60 / T (n=9)	60 / E (n=8)	<i>p</i>
Aliment consommé	J1	8.63 \pm 0.47	8.63 \pm 0.63	0.705 ^{NS}	16.11 \pm 0.74	15.88 \pm 0.70	0.005 ^{**}
	J5	10.75 \pm 0.70	10.25 \pm 0.48		16.33 \pm 1.22	14.75 \pm 0.31	
Poids corporel	J1	55.58 \pm 4.17	55.42 \pm 4.64	0.969 ^{NS}	150.89 \pm 2.83	150.50 \pm 4.22	0.024 [*]
	J5	69.83 \pm 4.53	70.42 \pm 4.75		157.78 \pm 3.51	150.50 \pm 4.02	

Les valeurs individuelles du poids corporel et de la consommation d'aliment des femelles témoins et des femelles traitées par la leptine des deux lots pendant la période d'essai sont détaillées dans les Appendices G et G'.

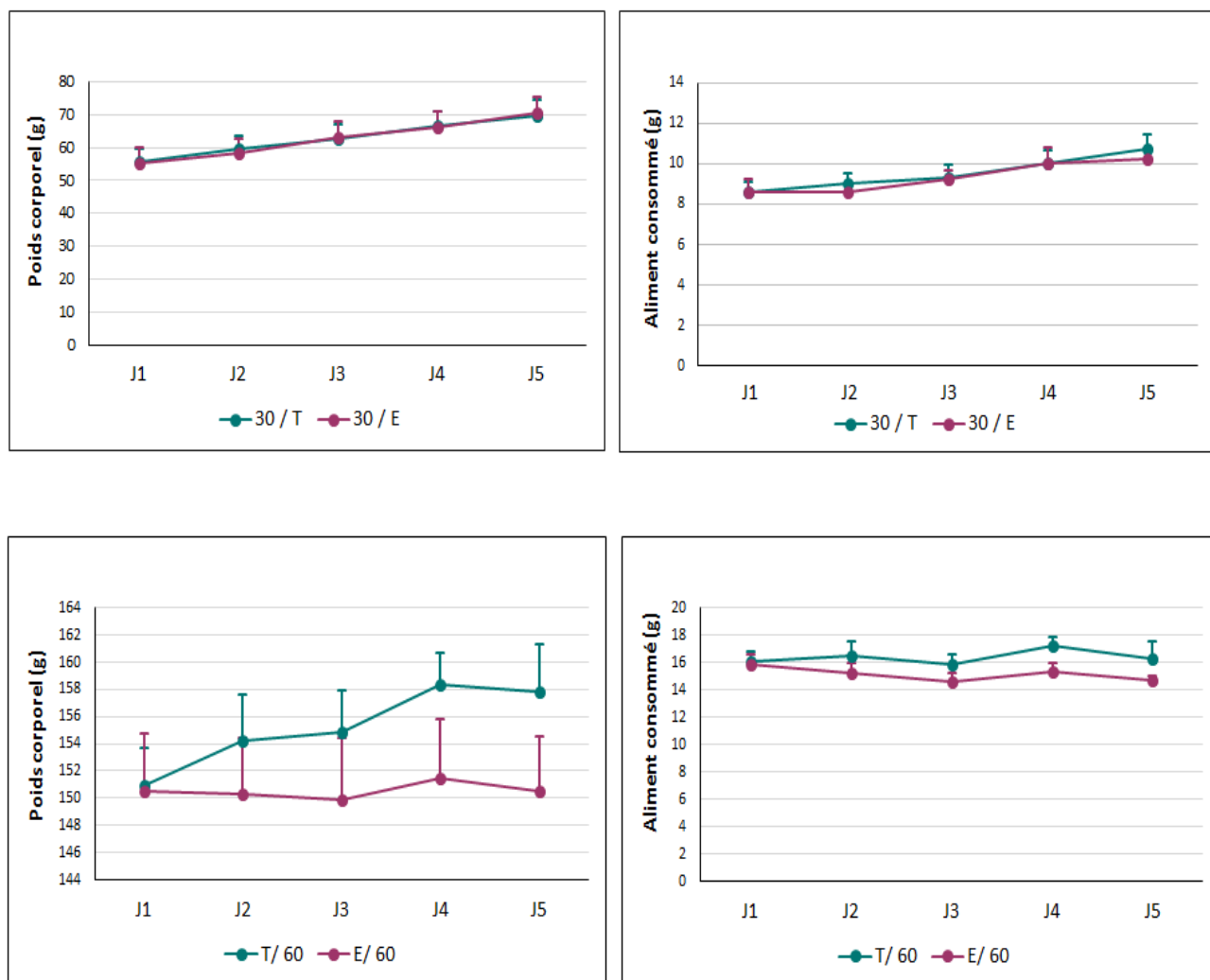


Figure 4.1 : Evolution du poids corporel (à gauche) et de la quantité d'aliment consommé (à droite) chez les femelles témoins et les femelles traitées avec la leptine à 30 et à 60 jours d'âge.

4.1.2. Poids ovarien

Les poids moyens absolus et relatifs des ovaires droits (D) et gauches (G) sont plus importants chez les animaux traités par la leptine comparés aux témoins et ce, aussi bien chez les individus de 30 jours que ceux de 60 jours. Cette augmentation n'est pas significative (Tableau 4.2 & Fig. 4.2).

Tableau 4.2 : Poids moyens absolus et relatifs des ovaires chez les femelles témoins et les femelles traitées avec la leptine à 30 et 60 jours d'âge.

(Valeurs exprimées en g \pm ESM, ^{NS} : Non significatif).

			Ovaires D	p	Ovaires G	p	Ovaires D + G	p
30 Jours	Poids absolu	T	0.0336 \pm 0.0032	0.510 ^{NS}	0.0345 \pm 0.0028	0.736 ^{NS}	0.0680 \pm 0.0057	0.596 ^{NS}
		E	0.0373 \pm 0.0045		0.0361 \pm 0.0039		0.0733 \pm 0.0081	
	Poids relatif	T	0.0533 \pm 0.0032	0.296 ^{NS}	0.0554 \pm 0.0028	0.530 ^{NS}	0.1087 \pm 0.0051	0.322 ^{NS}
		E	0.0593 \pm 0.0046		0.0578 \pm 0.0027		0.1172 \pm 0.0066	
60 Jours	Poids absolu	T	0.1820 \pm 0.0225	0.762 ^{NS}	0.1903 \pm 0.0225	0.851 ^{NS}	0.3723 \pm 0.0417	0.925 ^{NS}
		E	0.1958 \pm 0.0384		0.1838 \pm 0.0255		0.3796 \pm 0.0633	
	Poids relatif	T	0.1243 \pm 0.0136	0.590 ^{NS}	0.1313 \pm 0.0151	0.929 ^{NS}	0.2556 \pm 0.0262	0.720 ^{NS}
		E	0.1409 \pm 0.0267		0.1334 \pm 0.0178		0.2743 \pm 0.0439	

Les valeurs individuelles des poids absolus et relatifs des ovaires des femelles témoins et des femelles traitées par la leptine des deux lots pendant la période d'essai sont détaillées dans les Appendices H et H'.

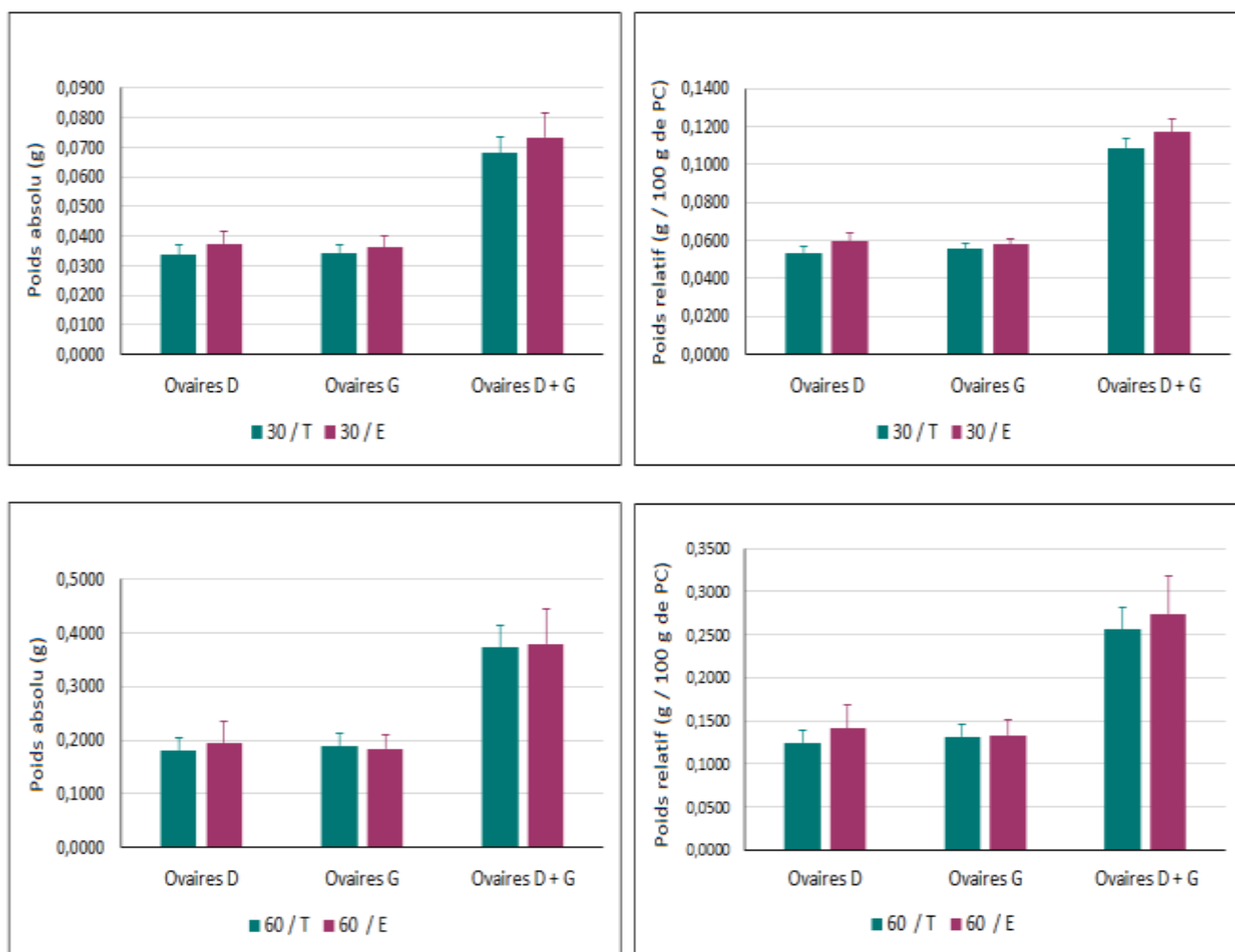


Figure 4.2 : Poids absolu (à gauche) et relatifs (à droite) des ovaires chez les femelles témoins et les femelles traitées avec la leptine à 30 et à 60 jours d'âge.

Nos résultats montrent que l'administration quotidienne de leptine à la dose de 8 μ g / 100 g de poids corporel par voie intrapéritonéale à des rats femelles Wistar ne semble pas avoir d'effet sur l'évolution du poids corporel et la consommation d'aliment à 30 jours d'âge. Nous notons cependant une baisse significative du poids corporel et de la consommation d'aliment chez les femelles adultes.

Nos résultats révèlent par ailleurs une augmentation non significative des poids moyens absolus et relatifs des ovaires droits et gauches chez les femelles traitées par la leptine comparés aux témoins et ce, aussi bien chez les individus de 30 jours que ceux de 60 jours d'âge.

4.2. Frottis vaginaux

L'examen des frottis vaginaux révèle chez les femelles témoins la présence de tous les stades du cycle œstral :

- Le *proœstrus* est caractérisé par la présence de cellules épithéliales rondes et parfois de quelques rares polynucléaires.
- L'*œstrus* est caractérisé par la présence de cellules épithéliales kératinisées anucléées (Fig. 4.3a).
- Le *postœstrus* (Fig. 4.3b) est marqué par la présence de polynucléaires avec ou sans cellules épithéliales kératinisées. Ce stade comprend deux phases successives :
 - le *metœstrus* dans lequel on note la présence de cellules kératinisées et de leucocytes ;
 - le *dicœstrus* dominé par la présence de leucocytes en nombre important [394].

Chez les femelles traitées par la leptine, le stade œstrus n'est pas observé, nous notons essentiellement la présence du *postœstrus*.

Les résultats individuels des observations des frottis vaginaux sont présentés dans l'Appendice I.

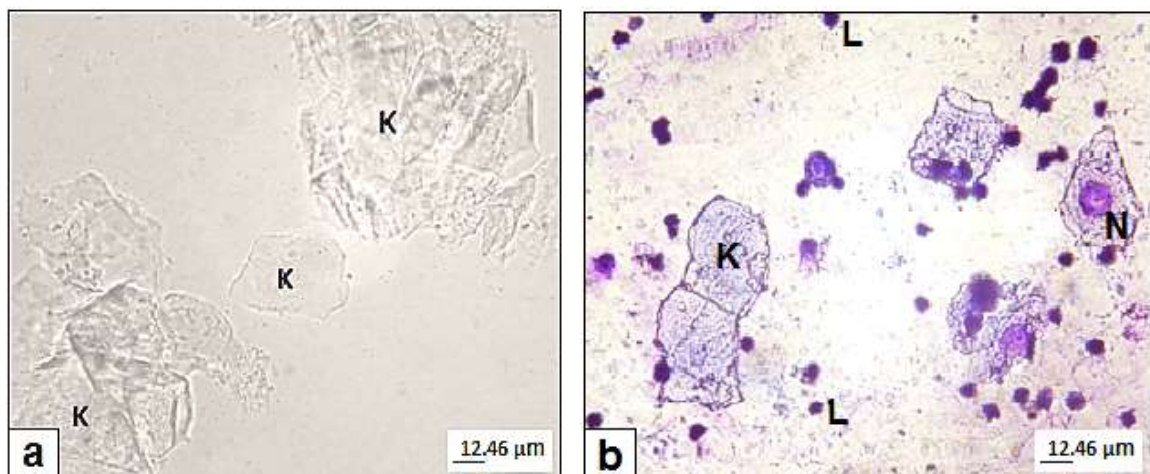


Figure 4.3 : Frottis vaginaux.

- (a) : Frottis vaginal au stade *œstrus* chez une femelle témoin (Observation directe).
 (b) : Frottis vaginal au stade *postœstrus* chez une femelle traitée (Coloration au MGG), notons la présence de quelques rares cellules nucléées.
 N : Cellule nucléée, K : Cellule kératinisée, L : Leucocyte.

L'examen des frottis vaginaux nous a permis d'observer qu'en présence de la leptine nous notons essentiellement les stades dioestrus et metoestrus. Le stade œstrus n'est pas observé sur les frottis effectués.

4.3. Histologie

4.3.1. Etude descriptive des ovaires

4.3.1.1. Ovaires de 30 jours

Nous notons la présence de différents stades du développement folliculaire au niveau des ovaires (Fig. 4.4). Les *follicules pré-antraux* sont représentés par les follicules primordiaux, primaires et secondaires, les *follicules antraux* par les follicules tertiaires et pré-ovulatoires (mûrs ou de De Graaf). Le follicule polyovocytaire quant à lui contient généralement deux ovocytes. Le follicule primordial est constitué d'un ovocyte I à noyau bien visible, entouré de cellules folliculaires aplaties (Fig. 4.5). Dans le follicule primaire, les cellules folliculaires deviennent cubiques et sont limitées extérieurement par la membrane basale (Fig. 4.6). Le follicule secondaire comprend deux couches ou plus de cellules de la granulosa, une zone pellucide bien délimitée et une thèque conjonctive ayant pour origine le stroma ovarien, placée extérieurement contre la lame basale (Fig. 4.7). Dans les follicules tertiaires (Fig. 4.7 & 4.8a), plusieurs couches de cellules de la granulosa sont observées, la granulosa murale est située en périphérie non loin de la lame basale tandis que le *cumulus oophorus* entoure l'ovocyte, des cavités antrales sont observées et les théques (externe et interne) sont bien différenciées. Dans notre étude, les follicules pré-ovulatoires (Fig. 4.9) et polyovocytaires (Fig. 4.10) étaient tous atrétiques sur les ovaires de 30 jours (Fig. 4.8b & 4.11).

4.3.1.2. Ovaires de 60 jours

L'ovaire présente des sections irrégulières et sa taille est beaucoup plus importante qu'à l'âge de 30 jours (Fig. 4.12). Tous les stades du développement folliculaire sont retrouvés aussi bien chez les animaux témoins que chez les traités. Le follicule pré-ovulatoire contient une large cavité antrale, l'ovocyte

primaire est entouré des cellules de la *corona radiata* et est refoulé en périphérie mais n'est pas aussi excentrique que chez la femme. Le processus de lutéinisation se produit normalement de l'extérieur vers l'intérieur et aboutit à la formation d'un CJ (Fig. 4.13). Les follicules pré-ovulatoires et les CJ font saillie à la surface de l'ovaire. Après ovulation, les cellules de la granulosa se chargent de gouttelettes lipidiques et se transforment en grandes cellules lutéales tandis que les cellules de la thèque interne donnent naissance aux petites cellules lutéales ou cellules paraluteales. Un coagulum peut être observé.

Trois ou plusieurs générations de CJ peuvent être présentes dans un ovaire puisque chaque CJ persiste morphologiquement douze à quatorze jours [185,392].

Pour la détermination du stade du cycle œstral en fonction de l'aspect histologique du CJ nous nous sommes basées sur les critères retenus par Westwood [393] (Fig. 4.14) :

- Au stade *diœstrus*, les CJ nouvellement formés de l'ovulation précédente ont atteint leur taille maximale : c'est le meilleur marqueur ovarien du *diœstrus*, bien que les CJ dégénérés soient également présents. Les vacuoles sont fréquemment présentes en particulier dans les cellules au centre de ces gros CJ, avec début de formation d'un tissu fibreux central.
- Au stade *proœstrus*, les CJ sont souvent dégénérés, avec formation d'un tissu fibreux central, les cellules contiennent généralement des vacuoles cytoplasmiques.
- Au stade *œstrus*, les CJ dégénérés sont souvent présents mais les CJ nouvellement formés sont de petite taille, avec des cellules à cytoplasme basophile et occasionnellement une cavité centrale liquidienne (correspondant à l'antrum du stade folliculaire précédent).
- Au stade *metœstrus*, les CJ peuvent encore contenir une cavité centrale liquidienne. On note une hypertrophie des cellules de la granulosa et de la thèque interne donnant naissance aux grandes et aux petites cellules lutéales, ainsi qu'une riche vascularisation.

Chez les femelles traitées, nous notons une accélération de la lutéinisation des cellules de la granulosa des follicules en plein développement, ces derniers présentent alors la taille d'un follicule mais l'aspect d'un CJ (Fig. 4.15), tandis que d'autres CJ présentent souvent une forme irrégulière. La lutéinisation des cellules de la granulosa se fait de manière désorganisée (Fig. 4.16). Un ovocyte complètement dégénéré avec une zone pellucide très irrégulière est observé à l'intérieur d'un *corps lutéal* chez une femelle traitée (Fig. 4.17). Sur un autre ovaire, la maturation ovocytaire n'a pas eu lieu, l'ovocyte est resté emprisonné au sein du *corps lutéal*, le *stigma* nouvellement formé est bien visible (Fig. 4.18). La ponte ovulatoire n'ayant pas eu lieu, le terme « *corps lutéal* » sur ces structures ovariennes semble plus approprié que le terme « *corps jaune* ».

Une vasodilatation capillaire est également observée au niveau des structures lutéales sur les coupes des ovaires des femelles de 60 jours traitées par la leptine comparées aux témoins (Fig. 4.19).

Les *corpus albicans* proviennent de cellules lutéiniques d'anciens corps progestatifs qui se confondent avec les follicules atrétiques dans un tissu interstitiel à fonction endocrine (Fig. 4.20).

Les follicules atrétiques sont caractérisés par la dégénérescence de la granulosa : Stades Ia et Ib et/ou de l'ovocyte : Stades IIa et IIb [390]. Ils sont infiltrés de macrophages et de monocytes, et présentent des particules pycnotiques. L'atrésie folliculaire a principalement été observée sur les follicules antraux (tertiaires et pré-ovulatoires) aussi bien chez les femelles témoins que les traitées, à 30 comme à 60 jours d'âge. Tous les stades d'atrésie ont été retrouvés.

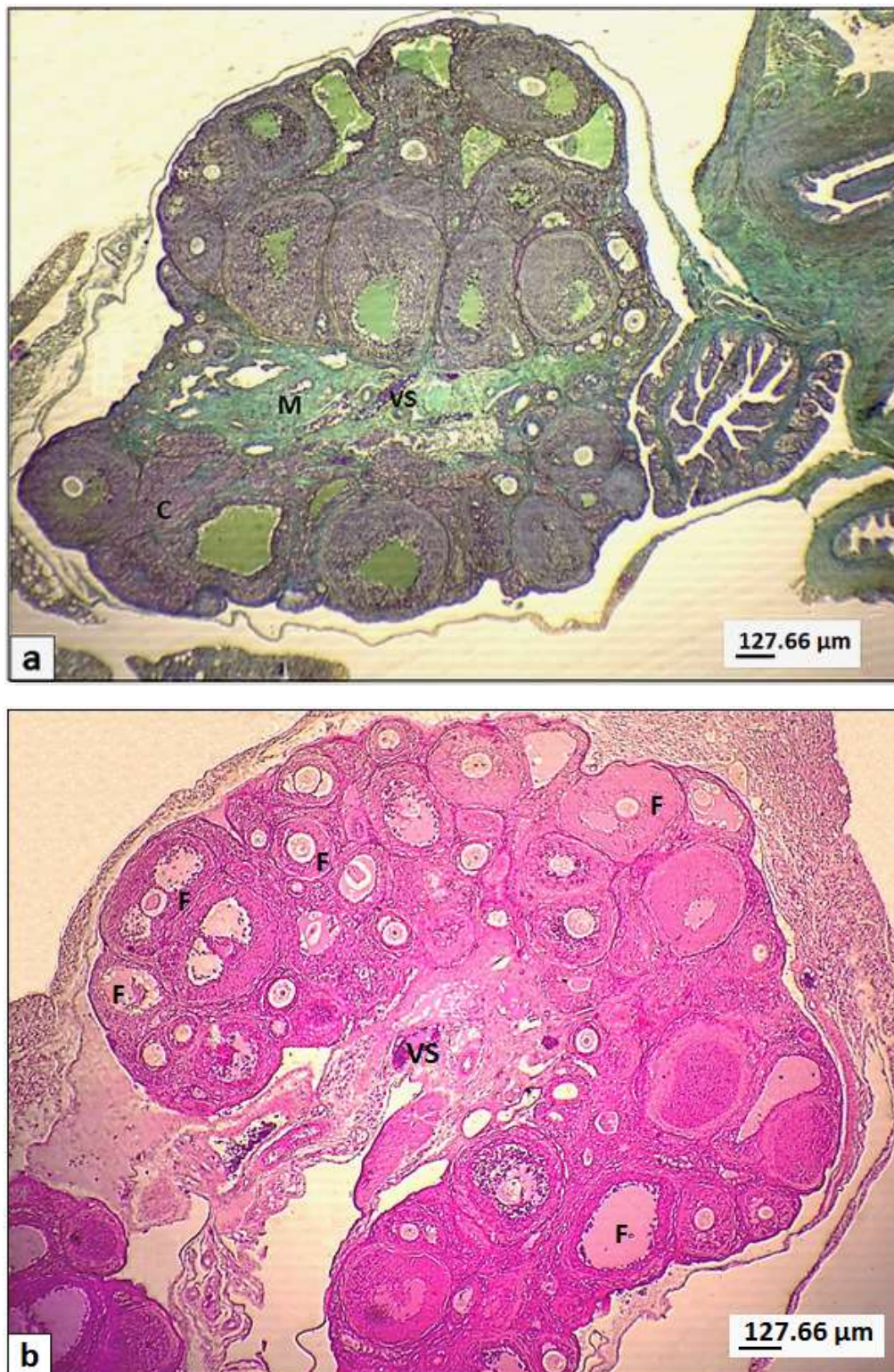


Figure 4.4 : Coupes transversales de l'ovaire d'une ratte immature traitée par la leptine **(a)** et d'une ratte immature témoin **(b)**.

La zone corticale montre de nombreux follicules à différents stades du développement, tandis que la médullaire est riche en nerfs et est très vascularisée.

(a) : Coloration au Trichrome de Masson modifiée, **(b)** : Coloration H&E.

C : *Cortex*, F : *Follicule*, M : *Medulla*, VS : *Vaisseau sanguin*.

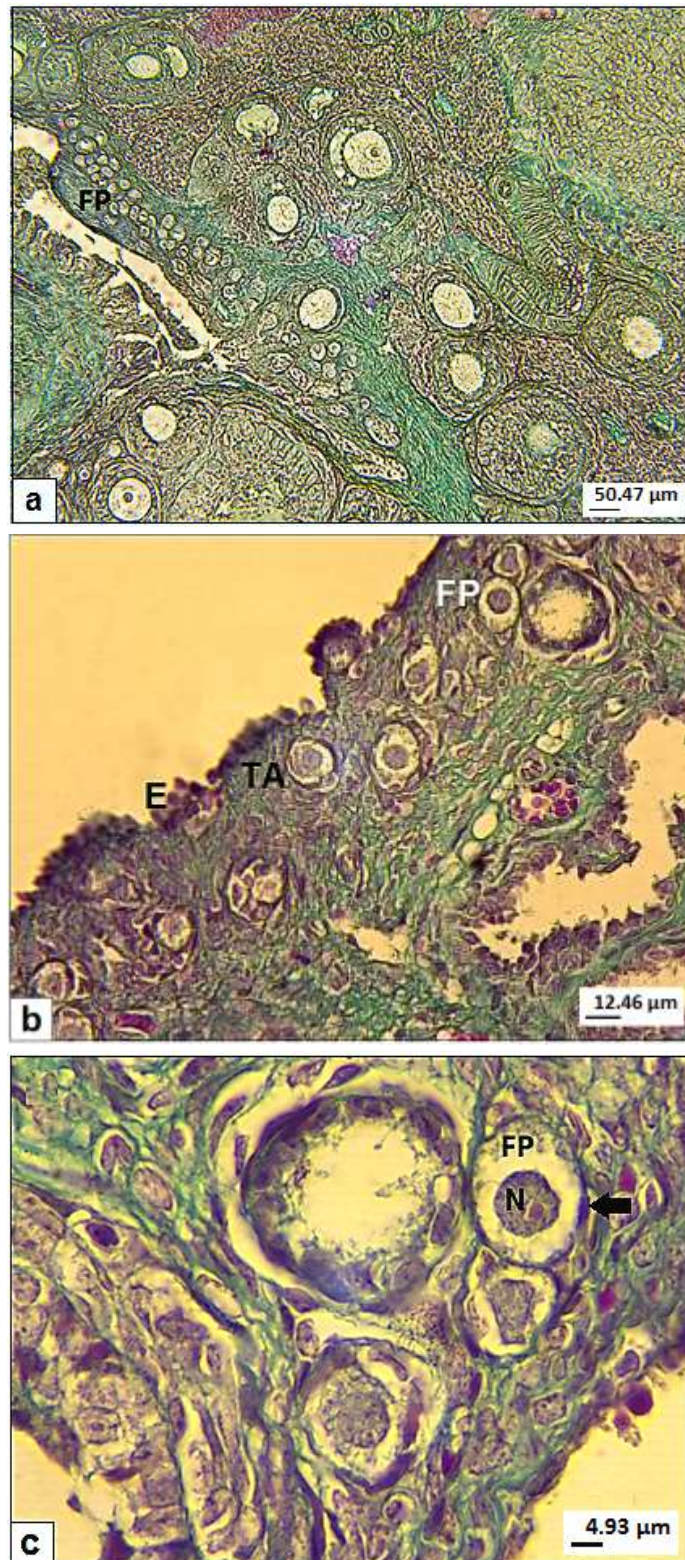


Figure 4.5 : Coupes transversales de l'ovaire d'une ratte immature traitée montrant des follicules primordiaux et d'autres follicules à différents stades de développement et à différents grossissements (**a**, **b**, **c**).

Coloration au Trichrome de Masson modifiée.

E : Epithélium germinatif, FP : Follicule primordial, N : Noyau, TA : Tunique albuginée,
Flèche noire : Cellule folliculaire aplatie.

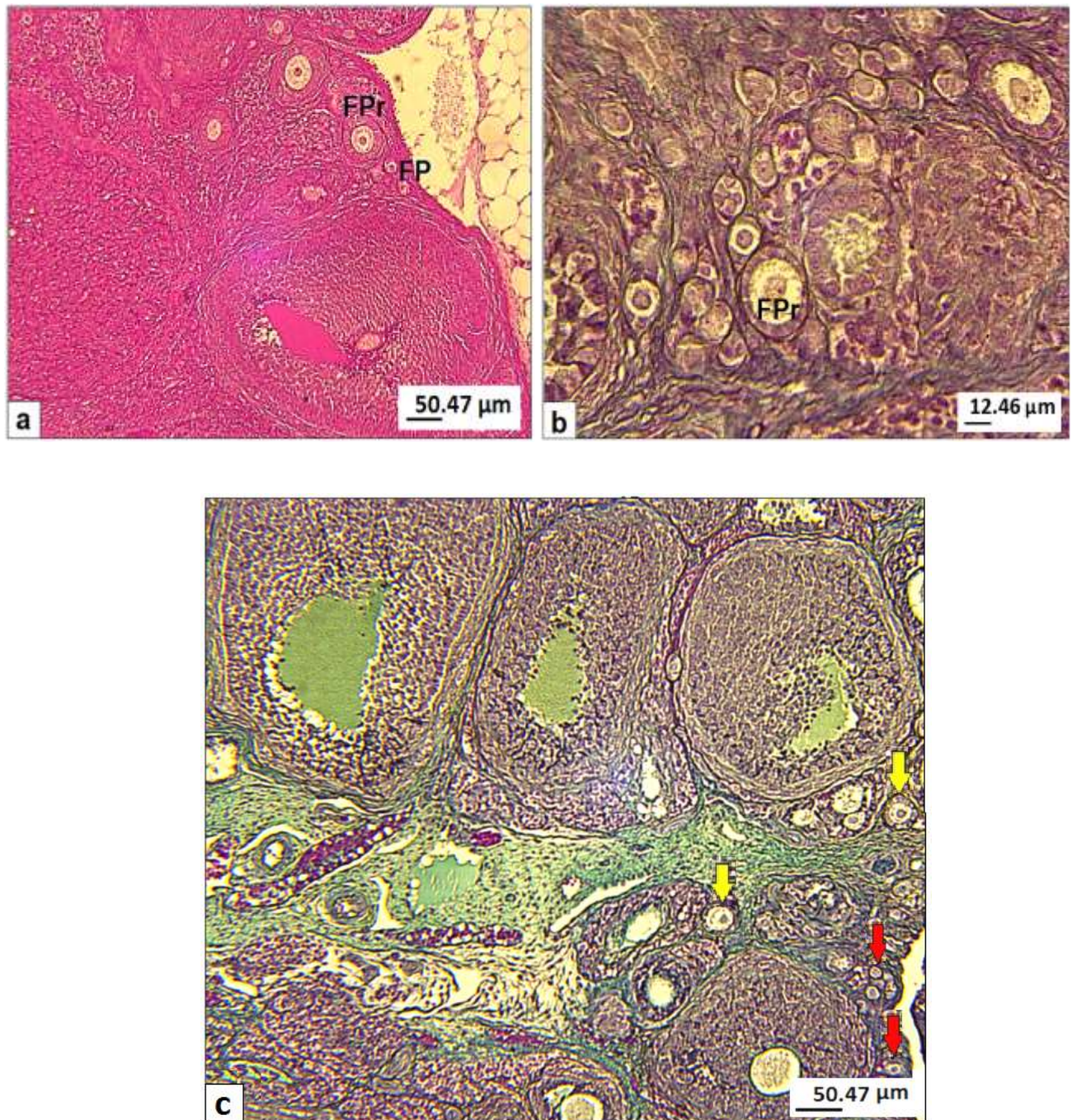


Figure 4.6 : Coupes transversales de l'ovaire montrant des follicules primordiaux et des follicules primaires chez une ratte adulte traitée **(a)**, une ratte adulte témoin **(b)** et une ratte immature traitée **(c)**.

(a) : Coloration H&E, **(b, c)** : Coloration au Trichrome de Masson modifiée.

FP/ Flèche rouge : Follicule primordial, FPPr / Flèche jaune : Follicule primaire.

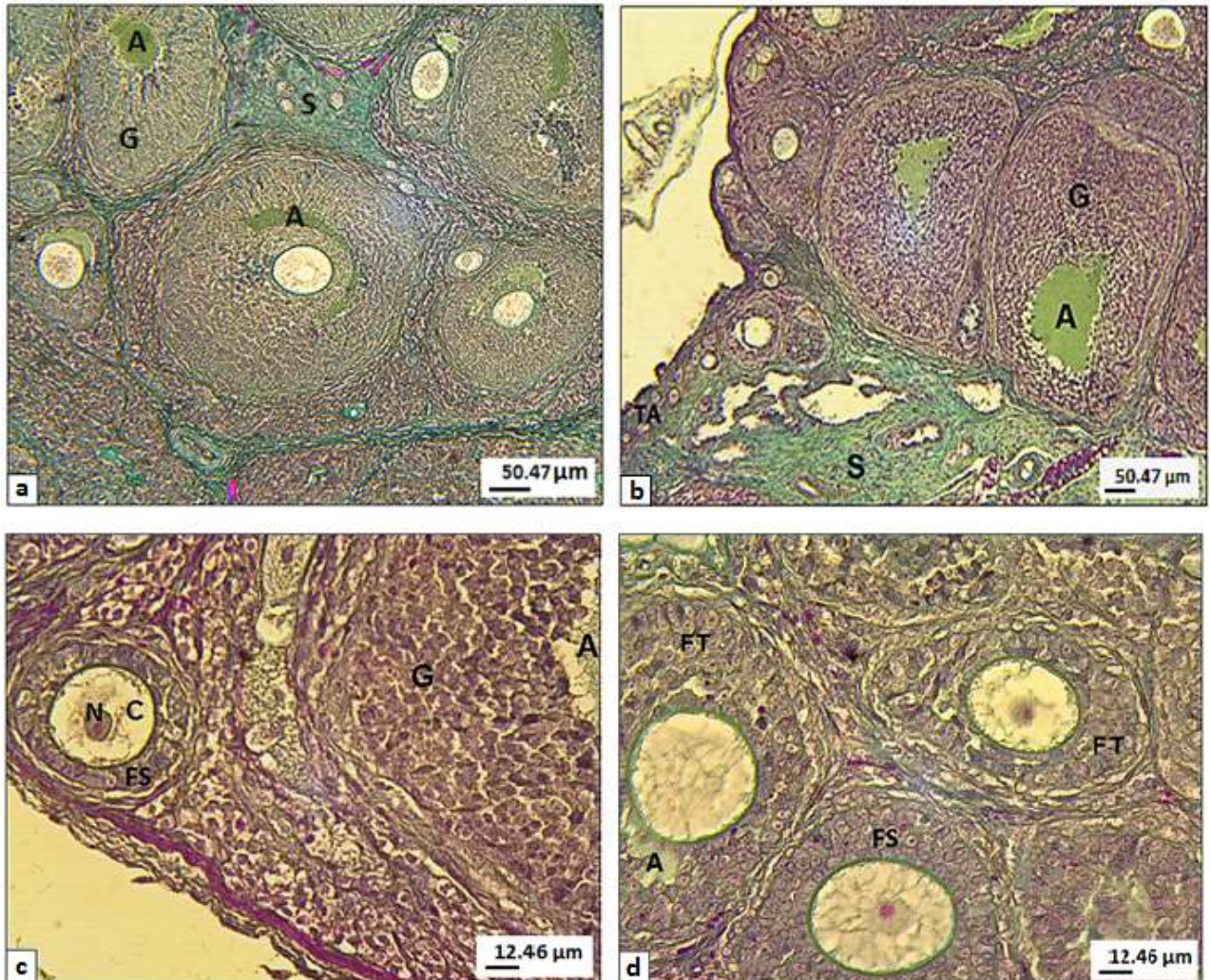


Figure 4.7 : Coupes transversales de l'ovaire montrant des follicules secondaires et tertiaires chez une ratte adulte traitée **(a)**, une ratte immature traitée **(b)** et une ratte immature témoin **(c, d)**.

Coloration au Trichrome de Masson modifiée.

A : Antrum, C : Cytoplasme de l'ovocyte I, FS : Follicule secondaire, FT : Follicule tertiaire,
G : Granulosa, N : Noyau avec son nucléole, S : Stroma.

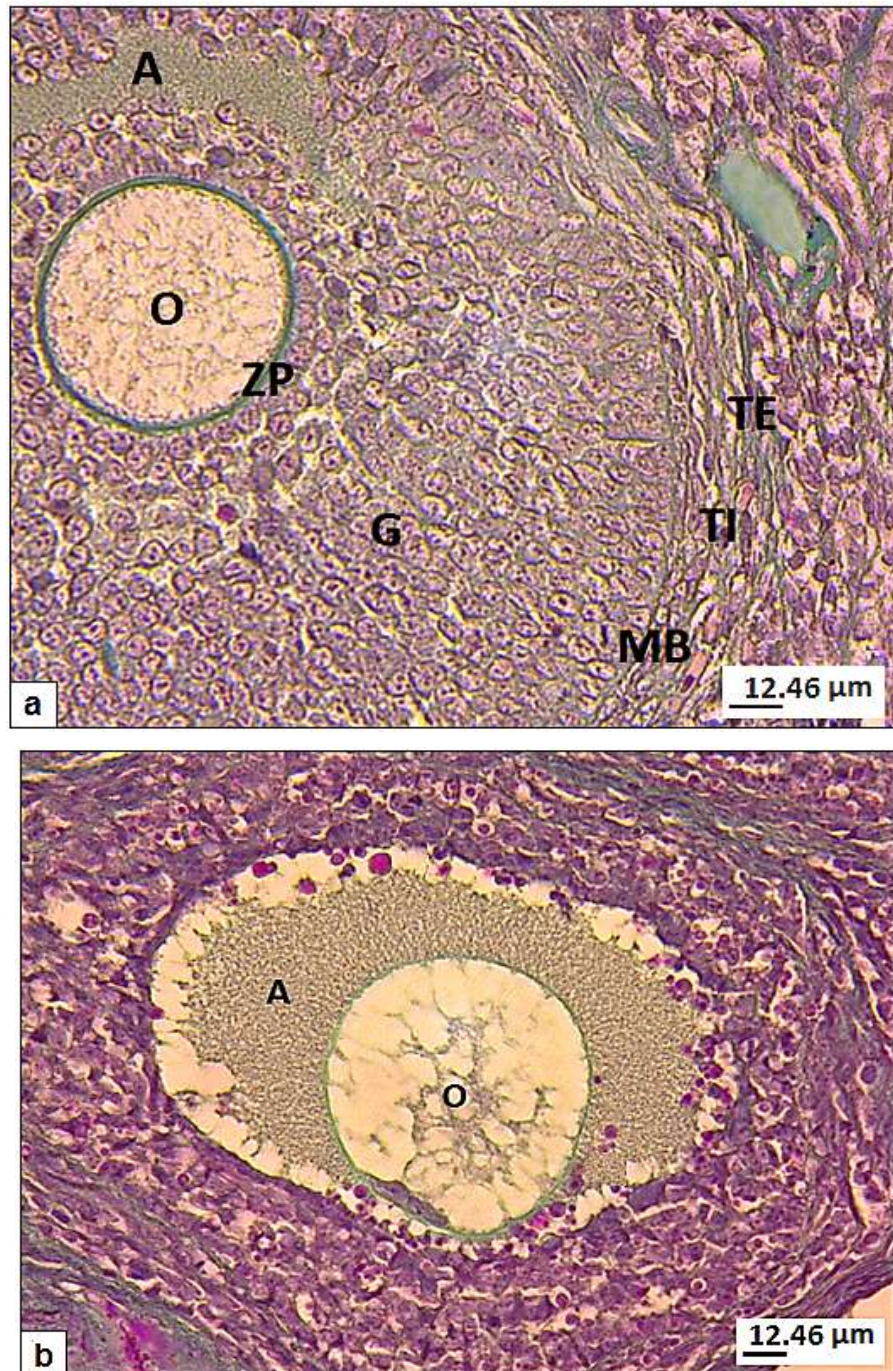


Figure 4.8 : Coupes transversales de l'ovaire montrant un follicule antral au stade tertiaire.

- (a) : Follicule normal avec intégrité de la zone pellucide chez une femelle adulte témoin,
 (b) : Follicule antral atrétique (Stade IIb) chez une femelle immature traitée : l'ovocyte dégénéré présente une zone pellucide irrégulière en contact direct avec l'antrum qui présente à sa périphérie de nombreuses particules pycnotiques et des macrophages.

Coloration au Trichrome de Masson modifiée. A : Antrum, G : Granulosa, MB : Membrane basale, O : Ovocyte I, TE : Thèque externe, TI : Thèque interne, ZP : Zone pellucide.

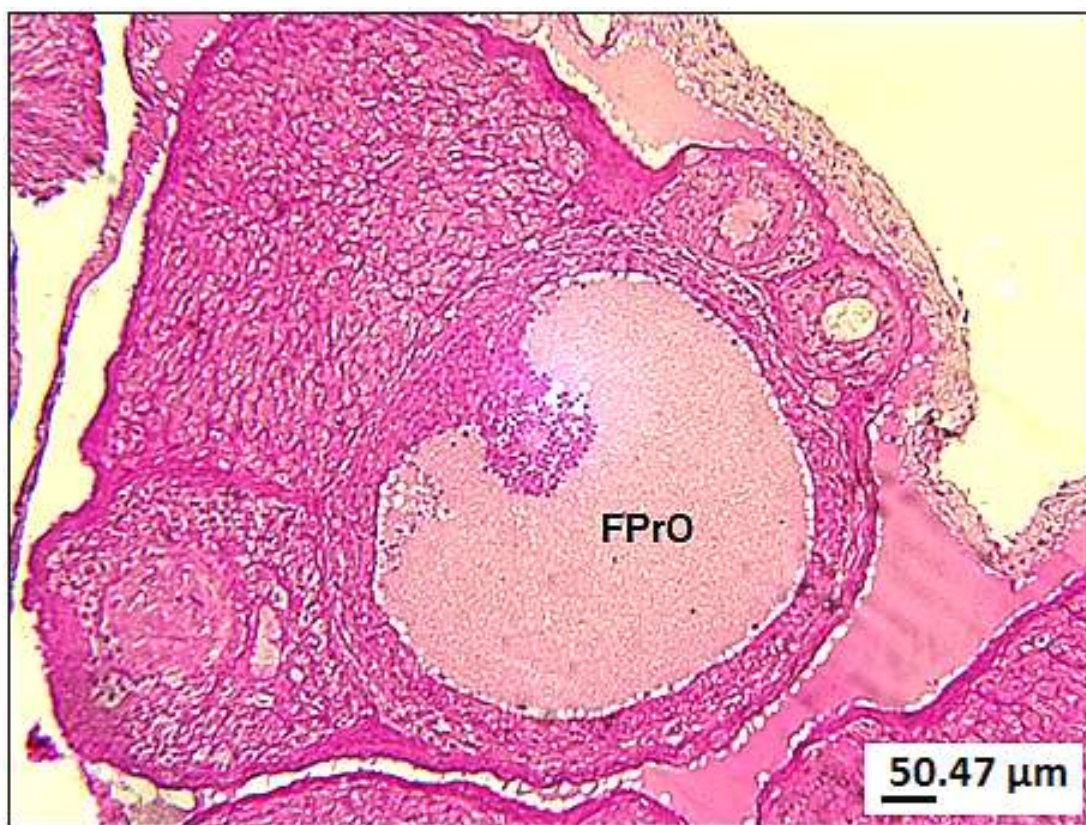


Figure 4.9 : Coupe transversale de l'ovaire montrant un follicule pré-ovulatoire atrélique chez une ratte adulte témoin.

Coloration H&E.

FPrO : Follicule pré-ovulatoire.

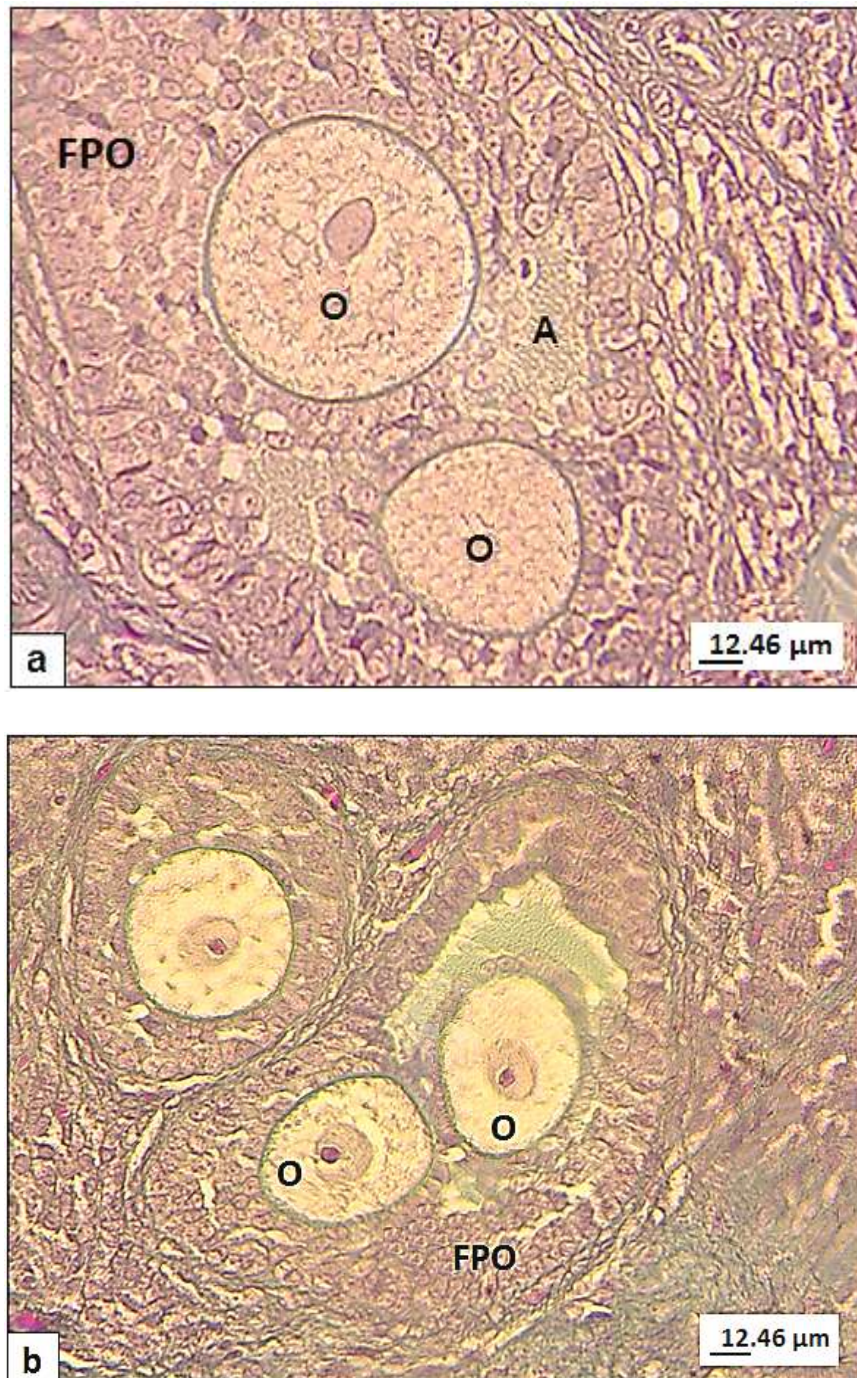


Figure 4.10 : Coupes transversales de l'ovaire montrant des follicules polyovocytaires au stade antral chez des rattes adultes traitées **(a, b)**.

Coloration au Trichrome de Masson modifiée.

A : Antrum, O : Ovocyte, FPO : Follicule polyovocyttaire comportant deux ovocytes.

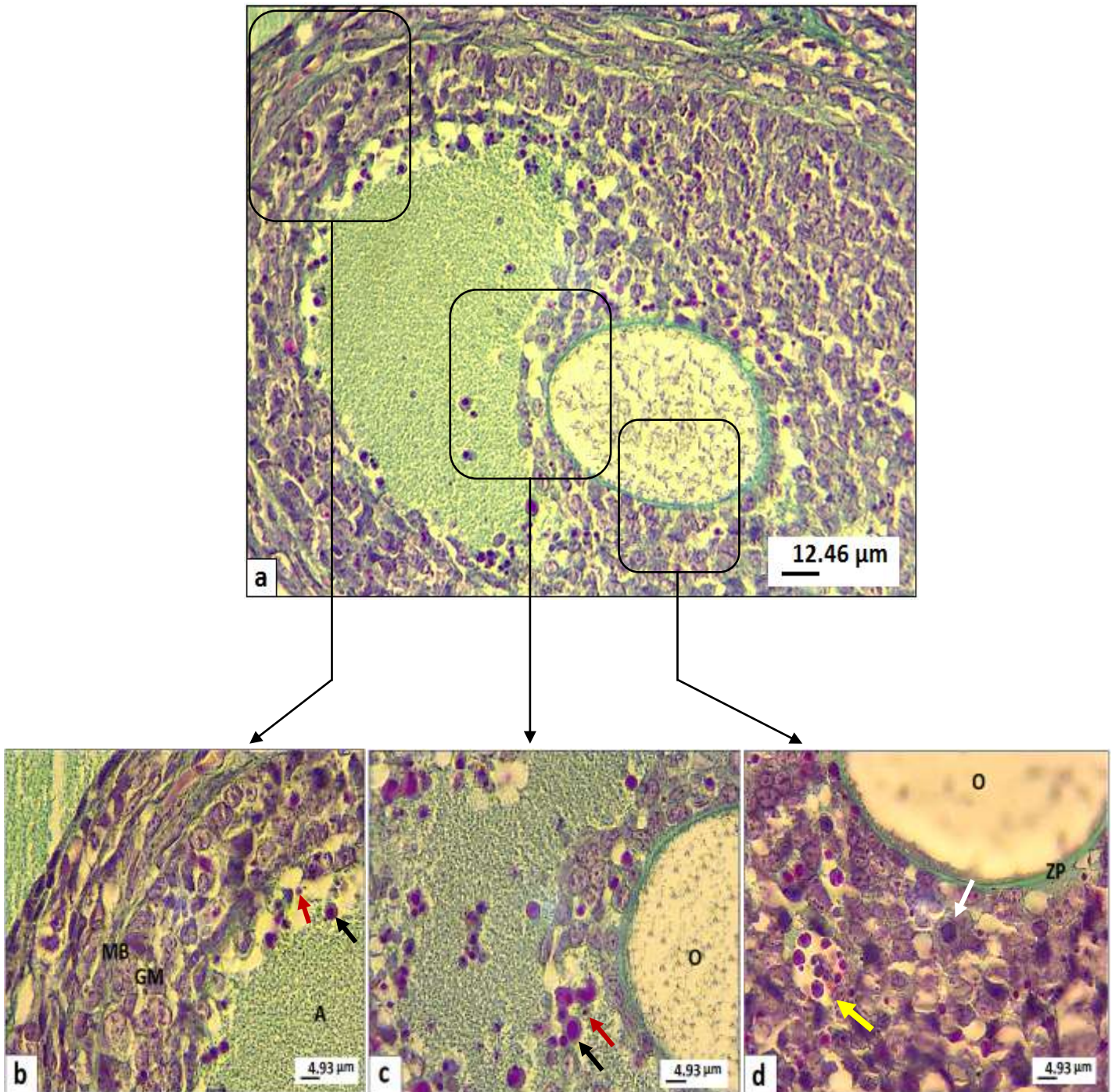


Figure 4.11 : Coupe transversale de l'ovaire d'une ratte immature traitée montrant un follicule atrétique (a).

Coloration au Trichrome de Masson modifiée.

(b) : Les premières cellules à dégénérer sont celles de la granulosa murale.

(c) : L'ovocyte est à certains endroits en contact direct avec l'antrum, (d) : Les dernières cellules à dégénérer sont celles entourant l'ovocyte.

A : Antrum, GM : Granulosa murale, MB : Membrane basale, O : Ovocyte I, ZP : Zone pellucida, Flèche blanche : Macrophage, Flèche jaune : Corps apoptotiques à l'intérieur d'une vacuole, Flèche noire : Monocyte, Flèche rouge : Particule pycnotique.



Figure 4.12 : Coupes transversales montrant une partie de l'ovaire d'une ratte adulte traitée **(a)** et d'une ratte adulte témoin **(b)**.

La zone corticale montre de nombreux follicules à différents stades de développement et des CJ, tandis que la médullaire est riche en nerfs et vaisseaux sanguins.

(a) : Coloration H&E, **(b)** : Coloration au Trichrome de Masson modifiée.

CJ : Corps jaune, F : Follicule, VS : Vaisseau sanguin.

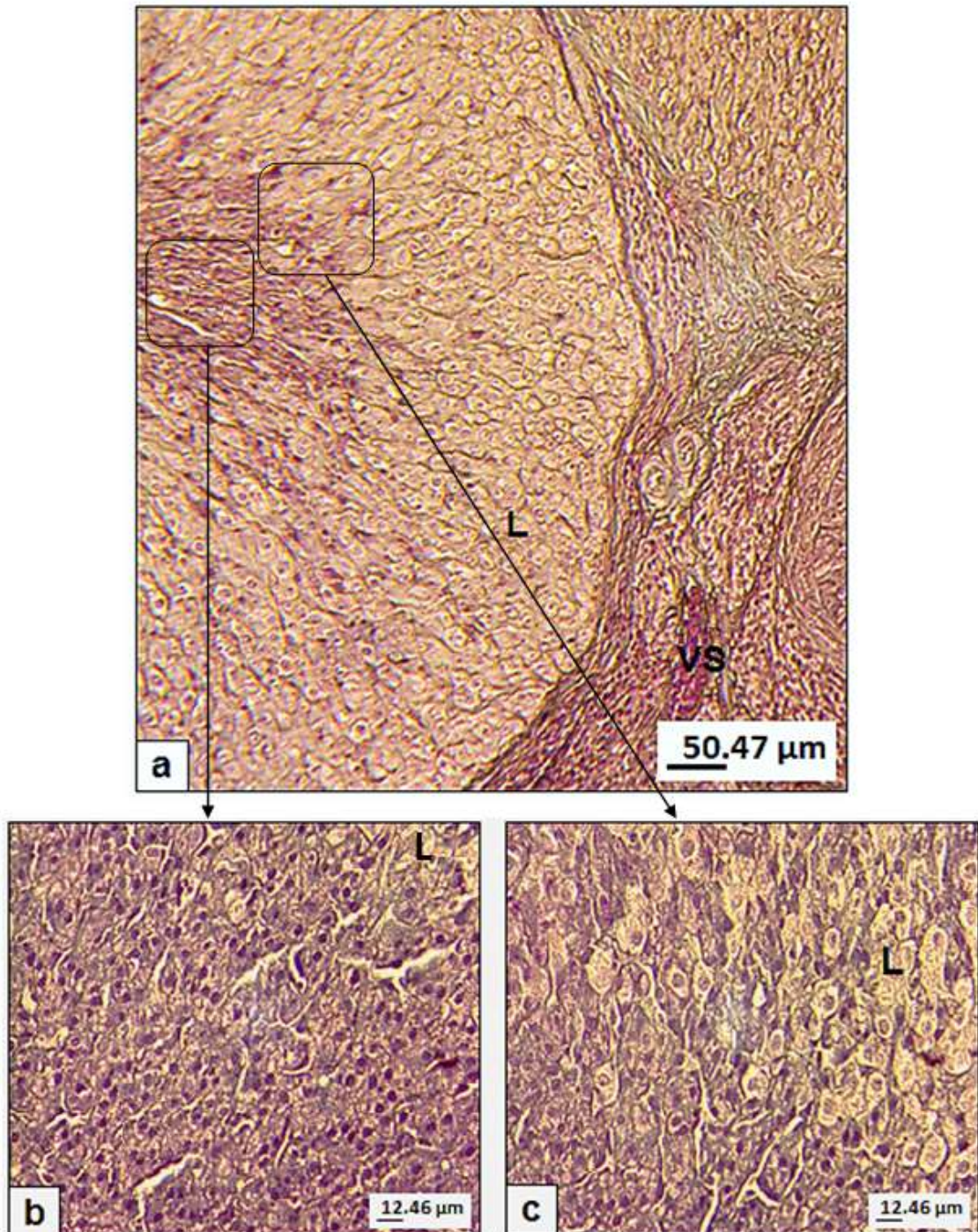


Figure 4.13 : Coupe transversale de l'ovaire montrant un CJ d'aspect normal chez une femelle adulte témoin **(a)**.

(b) : Les dernières cellules à se lutéiniser sont celles situées au centre,

(c) : Grandes cellules lutéales chargées de gouttelettes lipidiques.

Coloration au Trichrome de Masson modifiée.

L : Cellules lutéinisées, VS : Vaisseau sanguin.

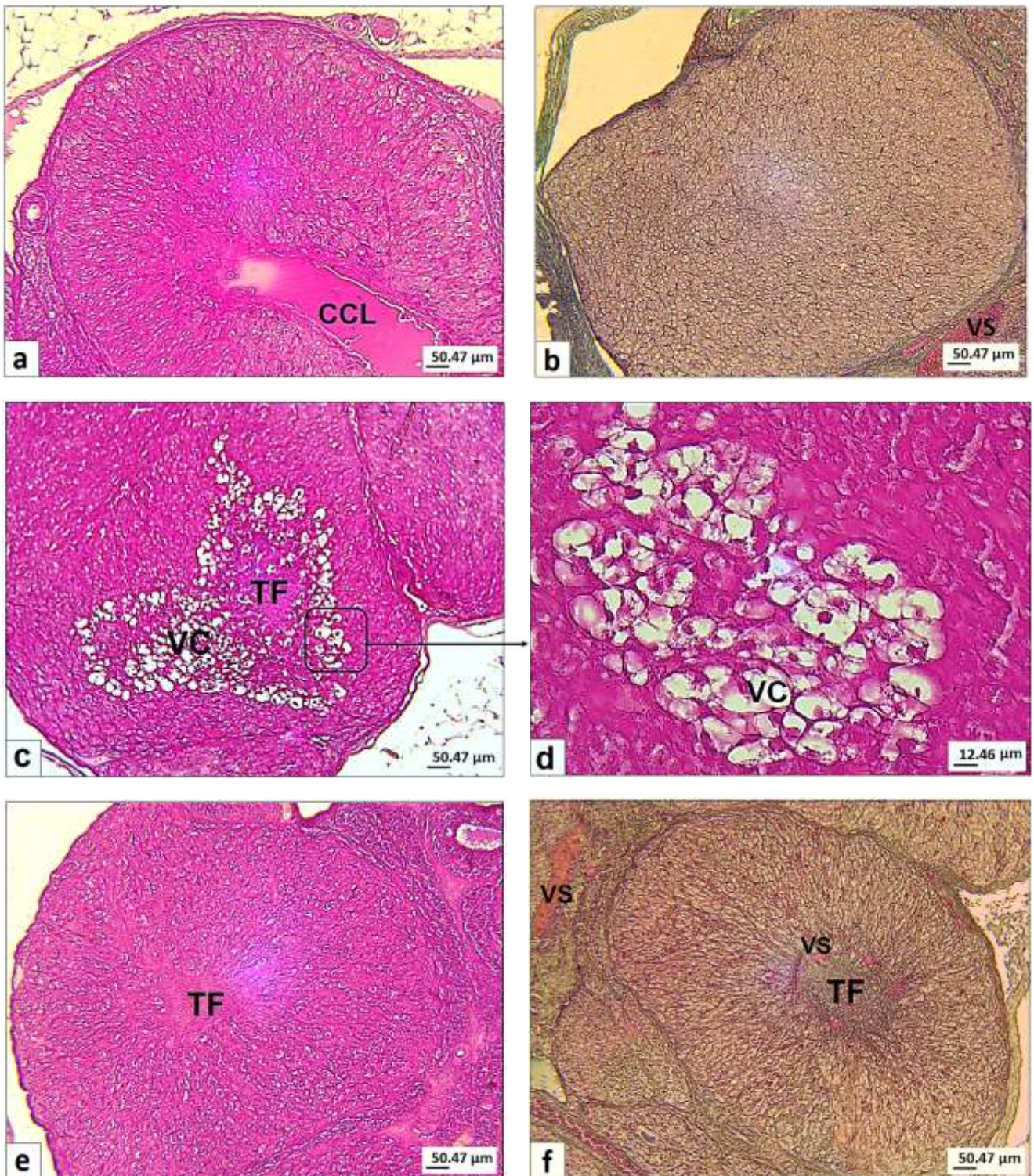


Figure 4.14 : Coupes transversales de l'ovaire montrant l'évolution du CJ en fonction des stades du cycle œstral chez des rattes adultes traitées.

(a) : Œstrus, **(b)** : Métœstrus. **(c, d)** : Début du Diœstrus, **(e, f)** : Fin du Diœstrus.

(a, c, d, e) : Coloration H&E, **(b, f)** : Coloration au Trichrome de Masson modifiée.

CCL : Cavité centrale liquidienne, TF : Tissu fibreux : VC : Vacuoles cytoplasmiques, VS : Vaisseau sanguin.

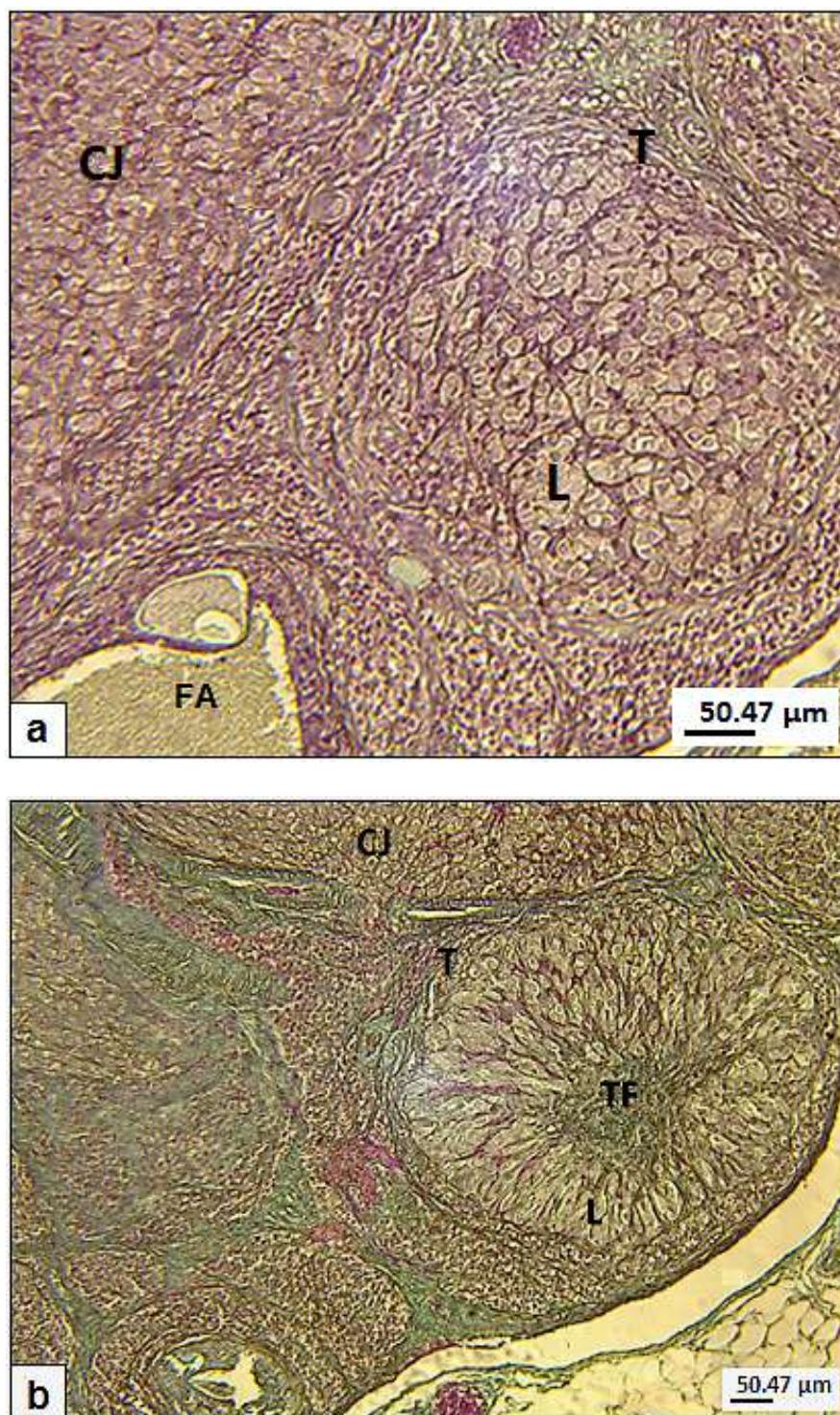


Figure 4.15 : Coupes transversales au niveau des ovaires de femelles adultes traitées avec la leptine montrant la lutéinisation précoce des follicules.

- (a)** : *Corpus luteal* présentant de grandes cellules lutéinisées de couleur pâle (L),
(b) : *Corpus luteal* présentant un tissu fibreux central (TF) de la taille d'un follicule suggérant une lutéinisation précoce.

Coloration au Trichrome de Masson modifiée. CJ : Corps jaune, FA : Follicule atrétique, T : Thèque.

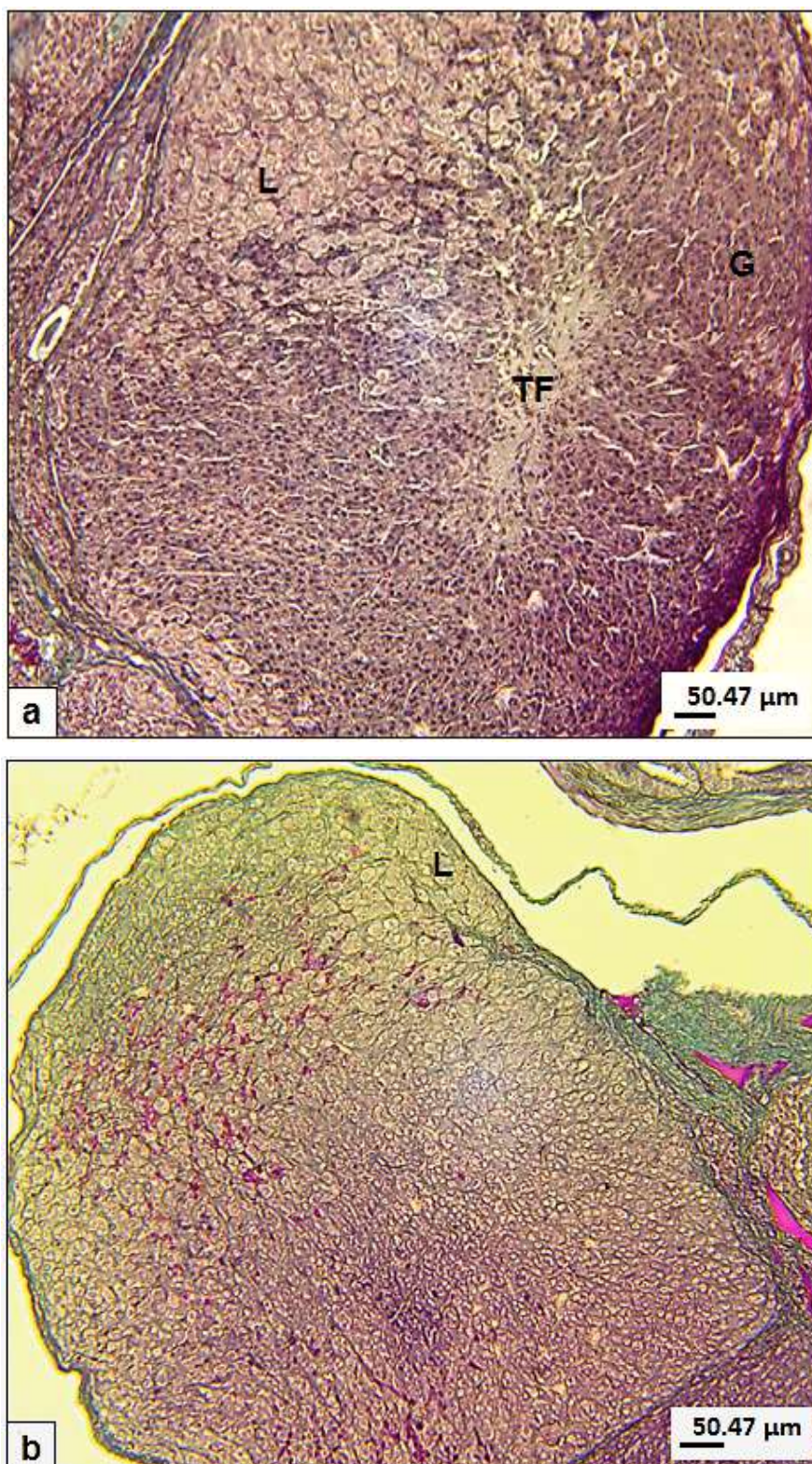


Figure 4.16 : Coupes transversales au niveau des ovaires de femelles adultes traitées avec la leptine montrant deux CJ désorganisés (a, b).

Notons la présence de grandes cellules lutéinisées de couleur pâle (L) et de cellules rappelant la granulosa (G).

Coloration au Trichrome de Masson modifiée. TF : Tissu fibreux.

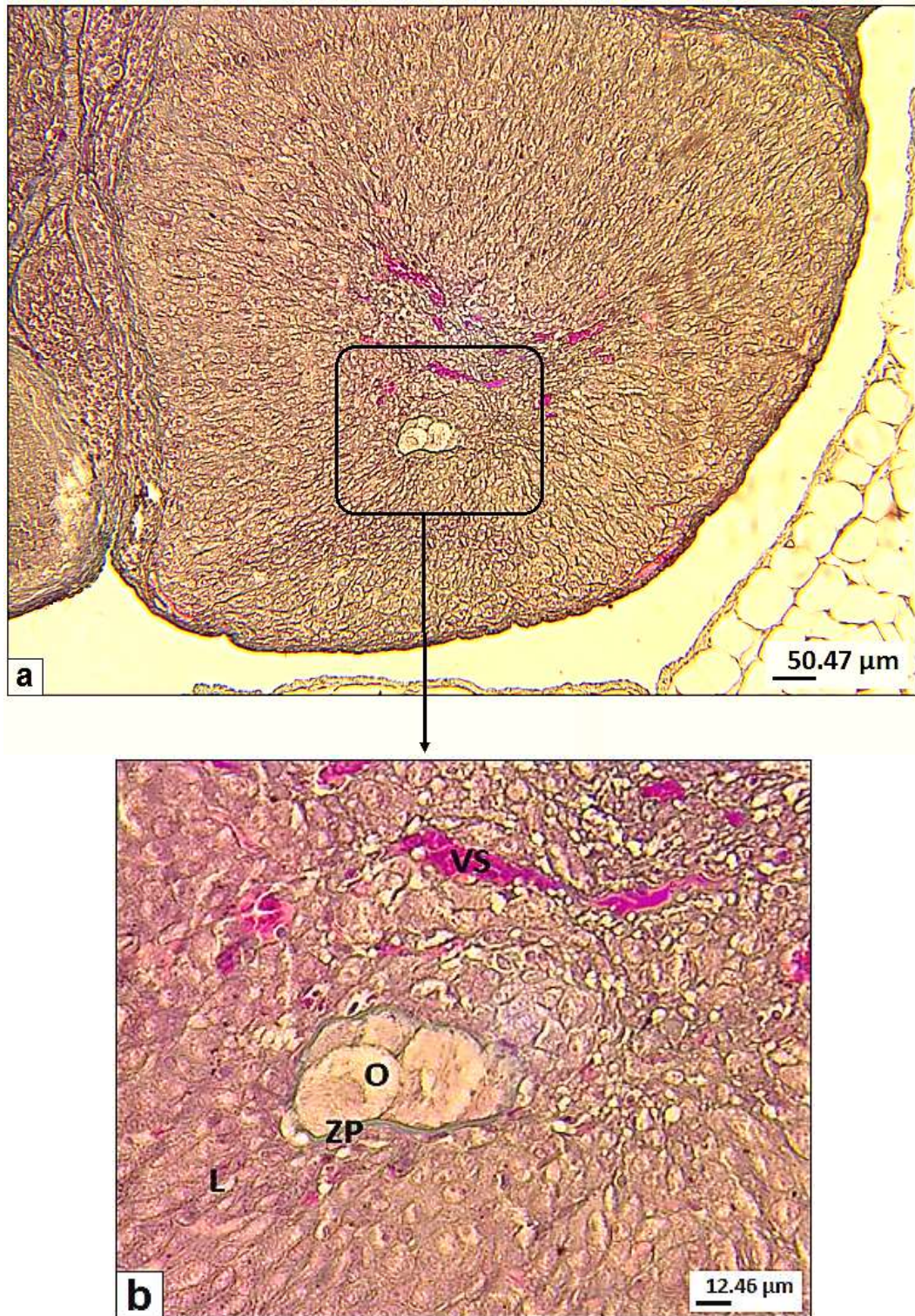


Figure 4.17 : Coupe transversale de l'ovaire montrant un ovocyte dégénéré emprisonné à l'intérieur d'un *corps lutéal* chez une femelle adulte traitée **(a, b)**.
Notons la déformation de l'ovocyte et la désorganisation de l'ooplasme, l'intégralité de la zone pellucide n'est pas conservée.

Coloration au Trichrome de Masson modifiée.

L : Cellules lutéinisées, O : Ovocyte, ZP : Zone pellucide, VS : Vaisseau sanguin.

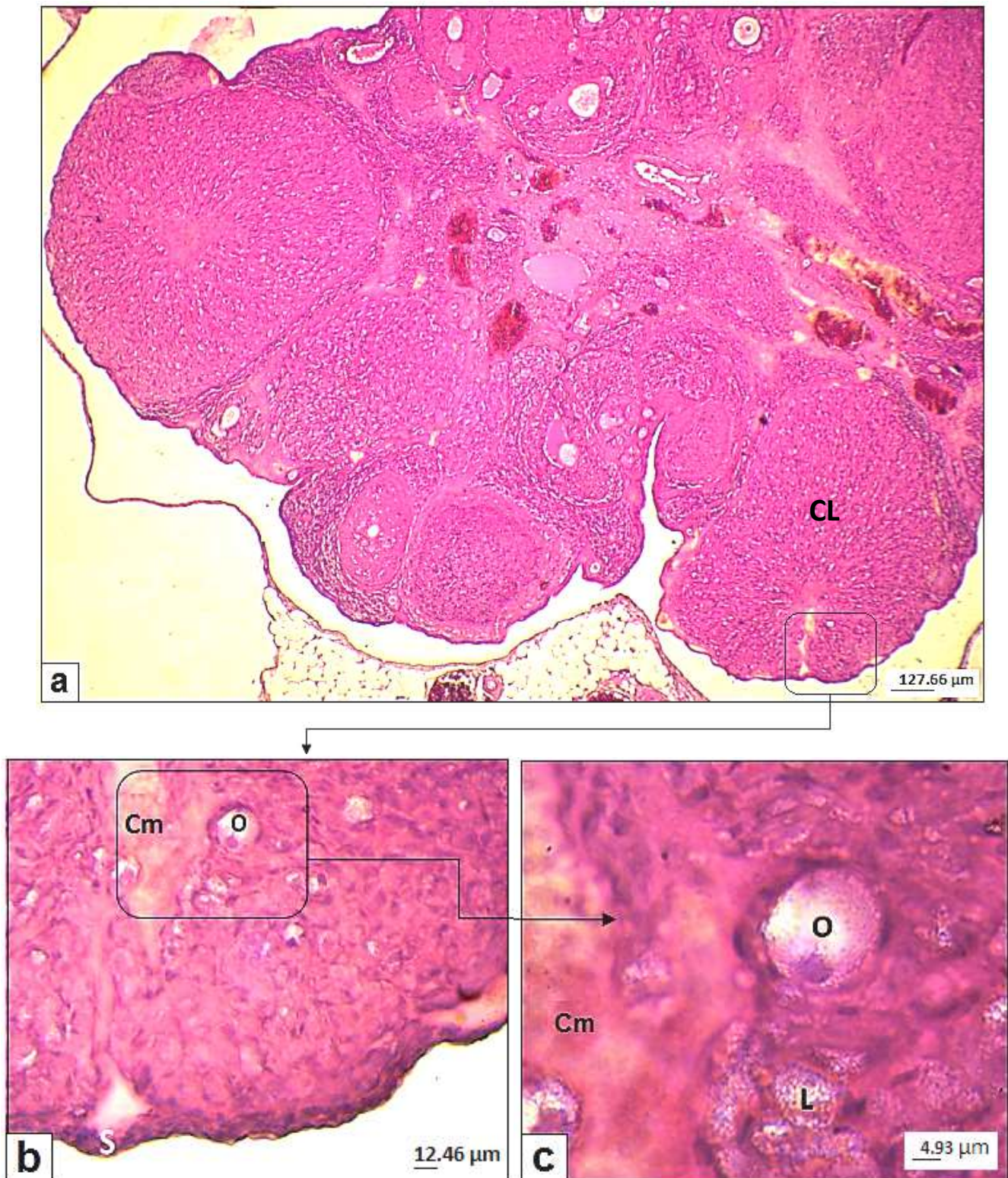


Figure 4.18 : Coupe transversale de l'ovaire montrant un ovocyte non expulsé emprisonné à l'intérieur d'un *corpus luteal* à différents grossissements (**a**, **b**, **c**) chez une femelle adulte traitée.

Le sillon de la rupture folliculaire est encore visible avec présence d'un coagulum.

Coloration H&E.

Cm : Coagulum, CL : *Corpus luteal*, L : Cellule lutéinisée, O : Ovocyte, S : Stigma.

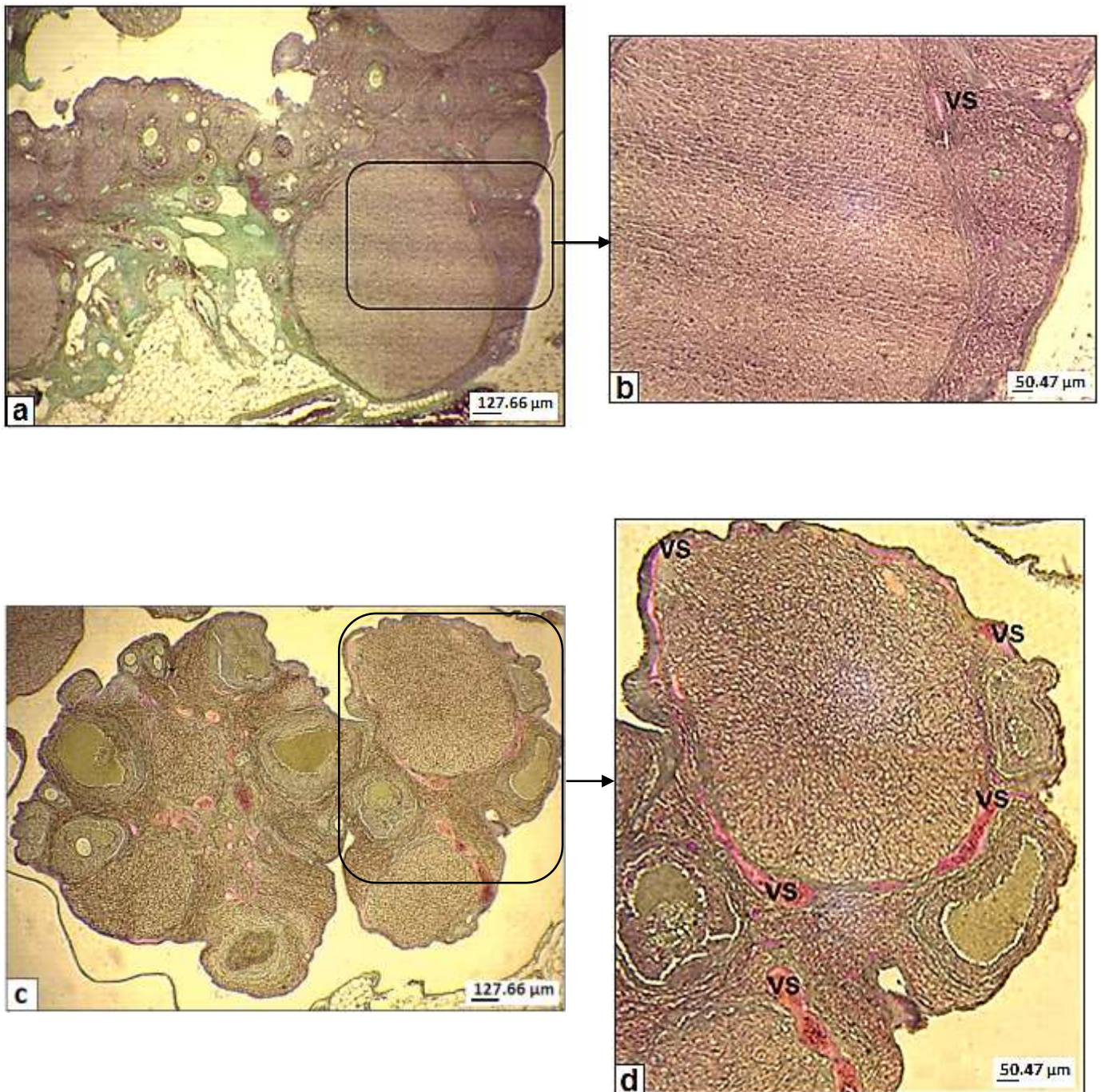


Figure 4.19 : Coupes transversales montrant la vascularisation de l'ovaire chez une femelle adulte témoin **(a, b)** et chez une femelle adulte traitée avec la leptine **(c, d)**.

Notons les diamètres des vaisseaux sanguins sur l'ovaire de la femelle traitée avec la leptine (vasodilatation capillaire) comparés à ceux de la femelle témoin.
Coloration au Trichrome de Masson modifiée. VS : Vaisseau sanguin.

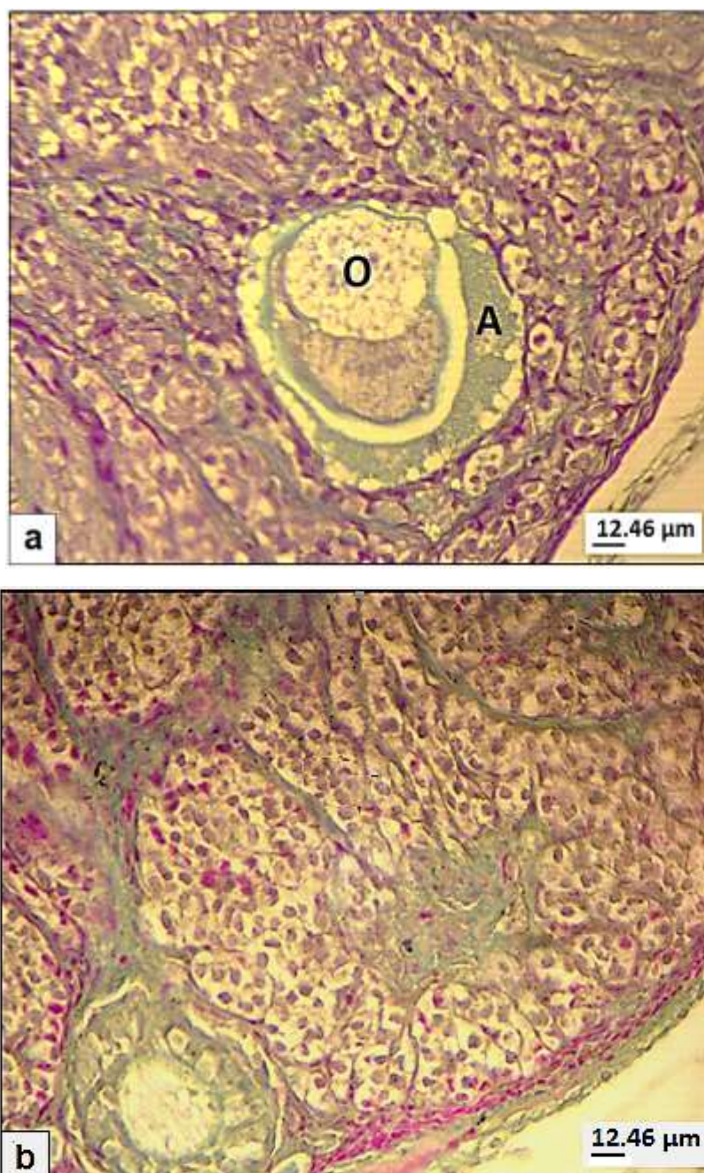


Figure 4.20 : Coupes au niveau de l'ovaire d'une ratte immature témoin montrant la transformation d'un follicule atrétique en tissu interstitiel.

(a) : Etat avancé d'atrésie folliculaire (Stade IIb), **(b)** : Follicule atrétique se confondant dans le tissu interstitiel.

Coloration au Trichrome de Masson modifiée. A : Antrum, O : ovocyte.

L'étude histologique des ovaires révèle une altération de la folliculogénèse avec accélération de la lutéinisation des cellules de la granulosa, suspension de l'ovulation et vasodilatation capillaire au niveau du tissu lutéal chez les femelles adultes traitées par la leptine.

4.3.2. Dénombrement des follicules et des corps jaunes

4.3.2.1. Ovaires de 30 jours

Sur les ovaires de 30 jours, le pourcentage de follicules atrétiques est plus important chez les femelles traitées par la leptine comparées aux témoins : 47.18 vs 34.09% (Tableau 4.3, Fig. 4.21 & 4.22).

Le nombre de follicules pré-ovulatoires atrétiques est significativement plus important dans le groupe traité comparé au groupe témoin (62 vs 35, $p < 0.01^*$). Le nombre de follicules polyovocytaires est quant à lui significativement moins important dans le groupe traité comparé au groupe témoin (5 vs 11, $p < 0.01^*$).

Cinq CJ ont été retrouvés sur l'ovaire d'une seule femelle expérimentale.

Tableau 4.3 : Nombre et pourcentage des follicules normaux et atrétiques par stade folliculaire chez les femelles témoins et expérimentales âgées de 30 jours.

Follicules	30 / T				30 / E			
	Normaux		Atrétiques		Normaux		Atrétiques	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Primordiaux	247	65.17	0	0	196	63.43	0	0
Primaires	40	10.55	0	0	29	9.39	0	0
Secondaires	37	9.76	11*	5.61	41	13.27	12	4.35
<i>Total Pré-antraux</i>	<i>324</i>	<i>85.49</i>	<i>11</i>	<i>5.61</i>	<i>266</i>	<i>86.08</i>	<i>12</i>	<i>4.35</i>
Tertiaires	55	14.51	150**	76.53	43	13.92	202***	73.19
Pré-ovulatoires	0	0	35	17.86	0	0	62	22.46
<i>Total Antraux</i>	<i>55</i>	<i>14.51</i>	<i>185</i>	<i>94.39</i>	<i>43</i>	<i>13.92</i>	<i>264</i>	<i>95.65</i>
TOTAL	379	65.91	196	34.09	309	52.82	276	47.18
	TOTAL (30 / T)		575	100	TOTAL (30 / E)		585	100

* : dont 3 polyovocytaires, ** dont 8 polyovocytaires ; *** dont 5 polyovocytaires.

Le nombre de follicules (normaux et atrétiques) par stade folliculaire et le nombre de CJ par femelle T et E sur les ovaires de 30 jours sont détaillés dans l'Appendice J.

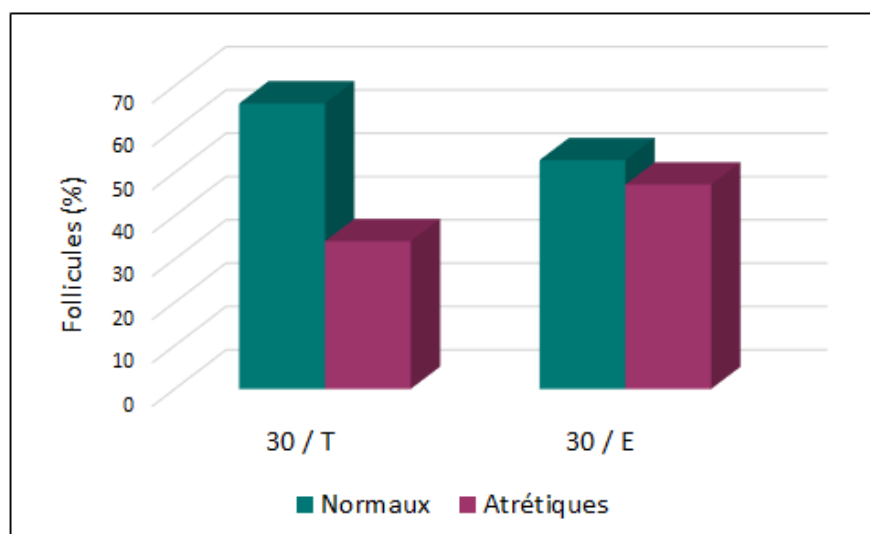


Figure 4.21 : Pourcentage des follicules normaux et atrétiques sur les ovaires T et E de 30 jours.

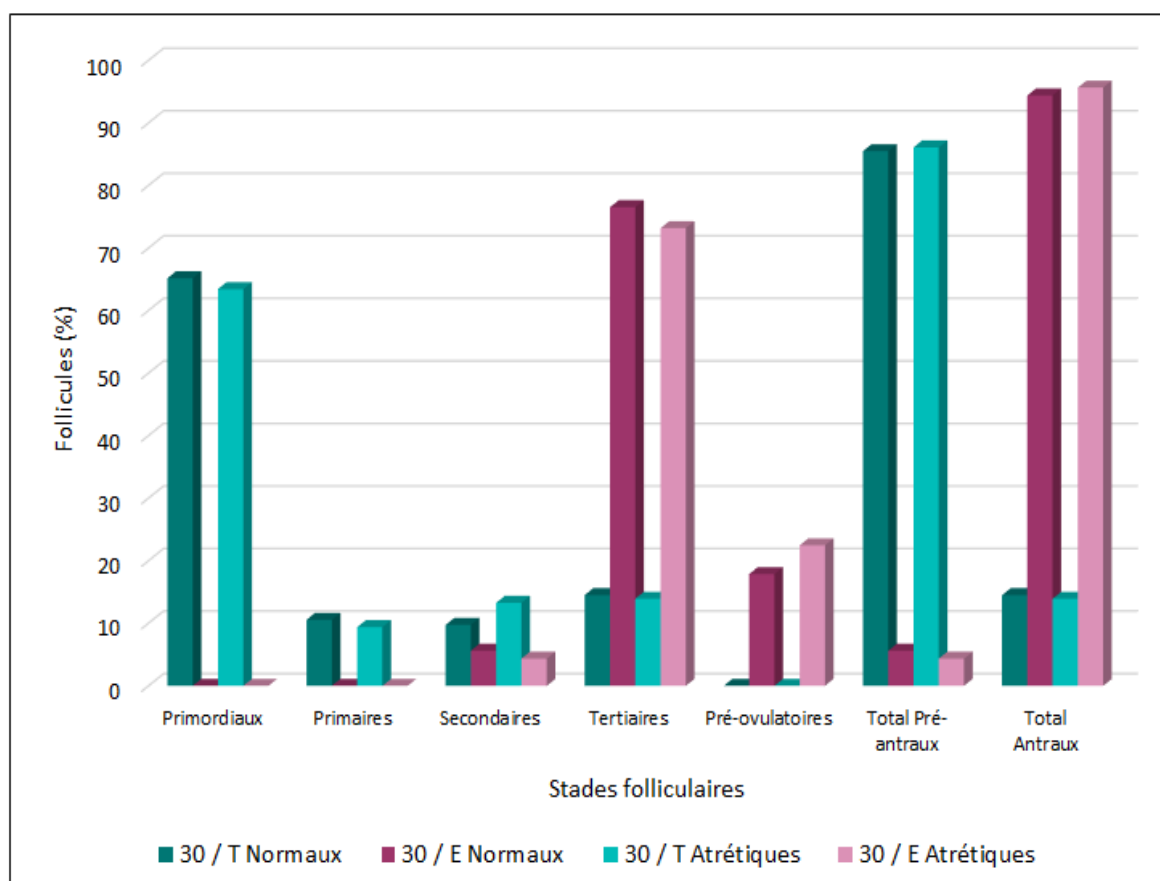


Figure 4.22 : Pourcentage des follicules normaux et atrétiques par stade folliculaire sur les ovaires T et E de 30 jours.

4.3.2.2. Ovaires de 60 jours

Sur les ovaires de 60 jours, le pourcentage de follicules atrétiques est moins important chez les femelles traitées par la leptine comparées aux témoins : 31.90 vs 43.05% (Tableau 4.4, Fig. 4.23 & 4.24). Le nombre moyen de CJ chez les femelles témoins et traitées par la leptine est similaire (59 vs 58 follicules).

Tableau 4.4 : Nombre et pourcentage des follicules normaux et atrétiques par stade folliculaire chez les femelles témoins et expérimentales âgées de 60 jours.

Follicules	60 / T				60 / E			
	Normaux		Atrétiques		Normaux		Atrétiques	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Primordiaux	113	54.07	0	0	185	58.54	0	0
Primaires	32	15.31	0	0	41	12.97	0	0
Secondaires	41	19.62	1	0.63	61	19.30	3	2.03
<i>Total Pré-antraux</i>	<i>186</i>	<i>89.00</i>	<i>1</i>	<i>0.63</i>	<i>287</i>	<i>90.82</i>	<i>3</i>	<i>2.03</i>
Tertiaires	23	11.00	140 *	88.60	27	8.54	122	82.43
Pré-ovulatoires	0	0	17	10.76	2	0.63	23 **	15.54
<i>Total Antraux</i>	<i>23</i>	<i>11.00</i>	<i>157</i>	<i>99.37</i>	<i>29</i>	<i>9.18</i>	<i>145</i>	<i>97.97</i>
TOTAL	209	100	158	100	316	100	148	100
	TOTAL (60 /T)		367	100	Total (60 /E)		464	100

* : dont 1 polyovocytaire, ** : dont 2 polyovocytaires.

Le nombre de follicules (normaux et atrétiques) par stade folliculaire et le nombre de CJ par femelle T et E sur les ovaires de 60 jours sont détaillé dans l'Appendice J'.

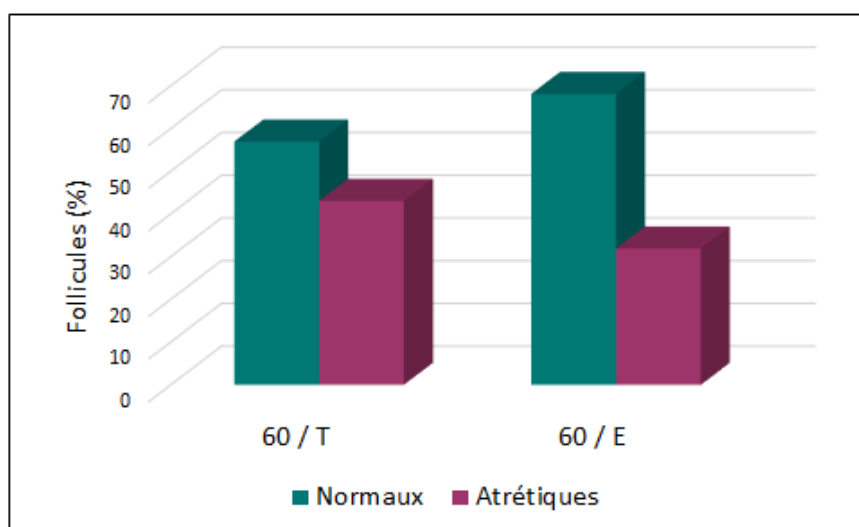


Figure 4.23 : Pourcentage des follicules normaux et atrétiques sur les ovaires T et E de 60 jours.

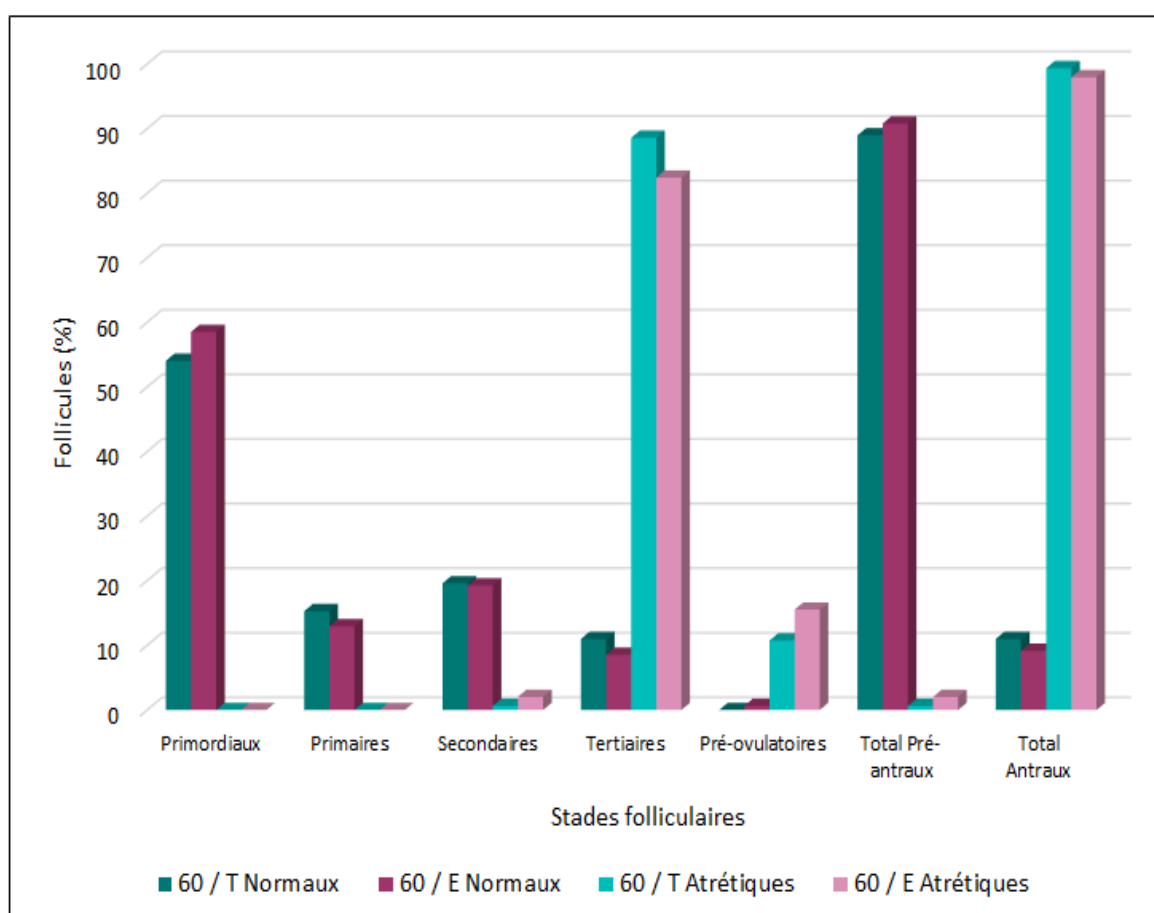


Figure 4.24 : Pourcentage des follicules normaux et atrétiques par stade folliculaire sur les ovaires T et E de 60 jours.

Le dénombrement des follicules ovariens révèle que :

- *Chez les femelles de 30 jours d'âge, le nombre de follicules atrétiques est plus important après traitement par la leptine comparé au nombre de follicules normaux, plus particulièrement les follicules tertiaires et pré-ovulatoires.*
- *Chez les femelles de 60 jours d'âge, le nombre de follicules atrétiques semble moins important après traitement par la leptine comparé au nombre de follicules normaux, plus particulièrement les follicules tertiaires, mais pas les follicules pré-ovulatoires.*

4.4. Dosages hormonaux

4.4.1. LH et FSH

Le dosage des hormones gonadotropes révèle une augmentation non significative du taux de LH à 30 jours d'âge (0.310 ± 0.026 vs 0.247 ± 0.030 UI/L, $p > 0.05$), mais significative à 60 jours (0.301 ± 0.032 vs 0.189 ± 0.02 UI/L, $p < 0.05^*$). Pour la FSH, la différence entre les témoins et les traitées n'est pas significative pour les deux âges ($p > 0.05$) (Tableau 4.5 & Fig. 4.25).

Tableau 4.5 : Niveaux plasmatiques de la LH et de la FSH chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine (Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM, Signification : $\alpha (0.05)$, > 0.05 ^{NS}, $< 0.05^*$).

FSH (UI/L)	30 / T (n=6)	30 / E (n=6)	<i>p</i>	60 / T (n=5)	60 / E (n=5)	<i>p</i>
		3.949 ± 0.365	3.994 ± 0.636	0.952 ^{NS}	4.307 ± 0.817	2.639 ± 0.297
LH (UI/L)	30 / T (n=7)	30 / E (n=7)	<i>p</i>	60 / T (n=6)	60 / E (n=7)	<i>p</i>
		0.247 ± 0.030	0.310 ± 0.026	0.141 ^{NS}	0.189 ± 0.020	0.301 ± 0.032

Les niveaux plasmatiques de la LH et de la FSH chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine des deux lots pendant la période d'essai sont détaillés dans les Appendices K et L.

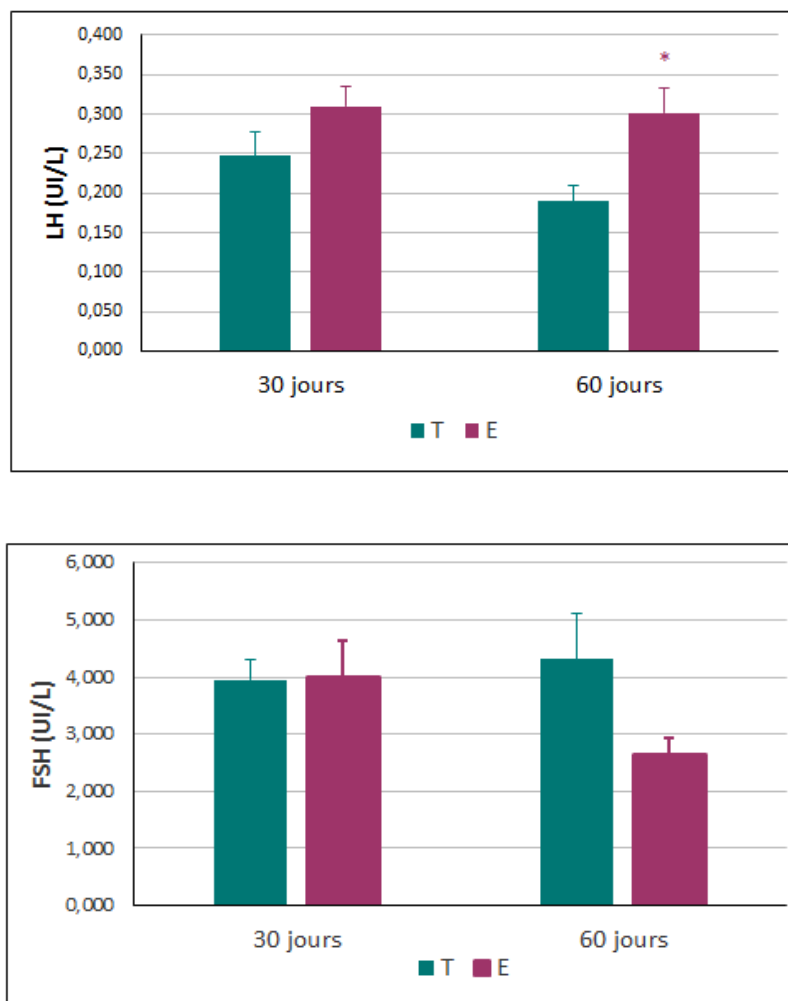


Figure 4.25 : Niveaux plasmatiques de la LH et de la FSH chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine à 30 et 60 jours d'âge.

4.4.2. 17 β -œstradiol

Le dosage de l'œstradiol montre que la leptine est sans effet sur ce stéroïde chez les femelles adultes (2931.867 ± 24.599 vs 2922.524 ± 39.909 ng/mL, $p > 0.05$) (Tableau 4.6 et 4.11 & Fig. 4.26).

Tableau 4.6 : Niveaux plasmatiques de l'œstradiol chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine (Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM, Signification : α (0.05), > 0.05 ^{NS}).

Œstradiol (ng/mL)	60 / T (n=8)	60 / E (n=5)	<i>p</i>
	2922.524 ± 39.909	2931.867 ± 24.599	

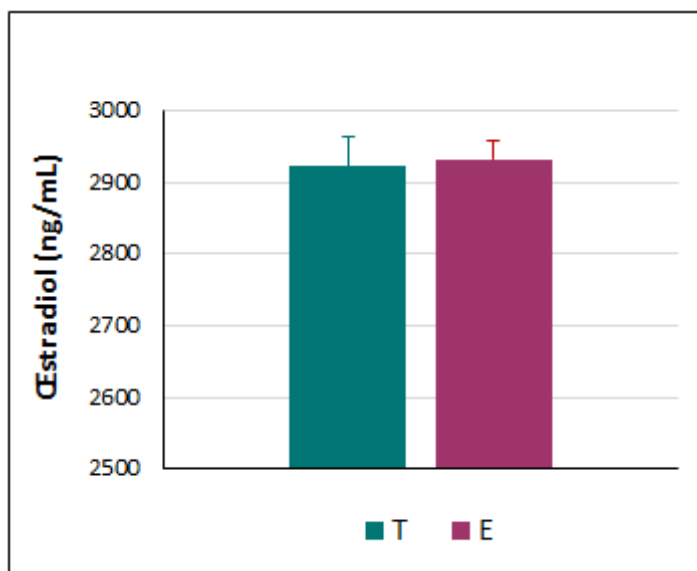


Figure 4.26 : Niveaux plasmatiques de l'œstradiol chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine à 60 jours d'âge.

4.4.3. Progestérone

Le dosage de la progestérone révèle une augmentation non significative à 30 jours d'âge (18.62 ± 2.84 vs 22.11 ± 3.50 ng/mL, $p > 0.05$) comme à 60 jours (33.39 ± 5.13 vs 41.60 ± 4.58 , $p > 0.05$) (Tableau 4.7 & Fig. 4.27).

Tableau 4.7 : Niveaux plasmatiques de la progestérone chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine (Valeurs exprimées en moyenne \pm ESM, Signification : $\alpha (0.05)$, > 0.05 *NS*).

Progestérone (ng/mL)	30 / T (n=6)	30 / E (n=6)	<i>p</i>	60 / T (n=5)	60 / E (n=5)	<i>p</i>
		18.62 ± 2.84	22.11 ± 3.50	0.453^{NS}	33.39 ± 5.13	41.60 ± 4.58

Les valeurs individuelles de la progestérone chez les femelles témoins et expérimentales de 30 et 60 jours d'âge sont détaillées dans l'Appendice M.

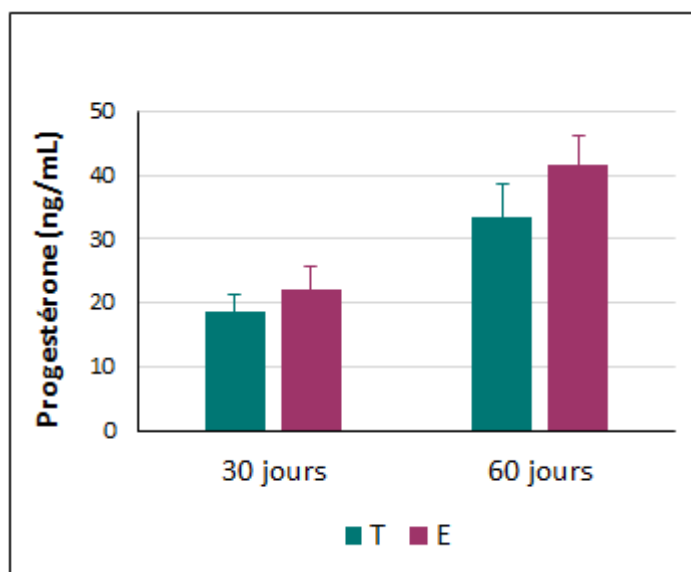


Figure 4.27 : Niveaux plasmatiques de la progestérone chez les femelles témoins et les femelles traitées par la leptine à 30 et 60 jours d'âge.

Les résultats des dosages des hormones gonadotropes montrent après traitement par la leptine à la dose de 8 µg / 100 g de poids corporel :

- *une augmentation non significative des niveaux plasmatiques de la LH chez les femelles immatures mais significative chez les femelles adultes ;*
- *une baisse non significative des niveaux plasmatiques de la FSH chez les femelles adultes traitées comparées aux femelles témoins.*

Les dosages des hormones stéroïdiennes révèlent :

- *que le taux d'œstradiol ne varie pas après traitement par la leptine et semble similaire à celui des femelles témoins ;*
- *une augmentation non significative du taux de progestérone aussi bien chez les femelles immatures que chez les adultes après traitement par la leptine comparées aux femelles témoins.*

CHAPITRE 5

DISCUSSION

Le tissu adipeux est impliqué dans l'homéostasie du glucose, la production de stéroïdes, l'immunorégulation, l'hématopoïèse et la reproduction [12,395]. La découverte de la leptine en 1994 a bouleversé la recherche dans les domaines de la nutrition, du métabolisme et de l'endocrinologie avec plus de 2 000 publications internationales consacrées à la leptine depuis sa découverte à l'année 2 000, dont 1 280 entre 1996 et 1998.

L'effet de la leptine sur le métabolisme énergétique et la reproduction a fait l'objet de nombreuses recherches majoritairement *in vitro* (de par le coût de la molécule) dont les résultats sont parfois divergents et peuvent être attribués aux différences considérables dans le nombre d'individus inclus dans les études, la dose de leptine testée, les rythmes, la voie d'injection, la durée de l'expérimentation ainsi que l'espèce étudiée.

➤ Etude pondérale

- Poids corporel

Nos résultats montrent que l'administration quotidienne de leptine à la dose de 8 µg / 100 g de poids corporel par voie intrapéritonéale à des rats femelles Wistar ne semble pas avoir d'effet sur l'évolution du poids corporel et la consommation d'aliment à 30 jours d'âge.

Nos résultats diffèrent de ceux rapportés par :

- ✓ YUAN *et al.* [396] qui observent une réduction significative du gain de poids corporel après administration quotidienne de leptine à la dose de 0,3 µg / g et de 1,0 µg / g par voie périphérique chez les rats nouveau-nés au cours de la période d'allaitement ;

- ✓ EL-SHAFAEI *et al.* [397] qui rapportent une baisse du poids corporel dès l'âge de 26 jours après des injections quotidiennes de 5 µg de leptine par voie sous-cutanée ;
- ✓ DUGGAL *et al.* [398] qui observent une diminution de la consommation d'aliment et du poids corporel suite au traitement par la leptine (30 µg à 3 heures d'intervalles pendant 15 heures par voie intrapéritonéale) à des rats immatures stimulés à l'aide de gonadotropines.

Nous notons cependant une baisse significative du poids corporel et de la consommation d'aliment chez les femelles adultes.

Ce résultat confirme le rôle de la leptine qui agit directement sur l'hypothalamus pour limiter la prise de nourriture et augmenter les dépenses énergétiques et la thermogénèse [399]. La leptine a des effets différents sur les neurones des noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation du poids corporel et la fonction de reproduction [80,82,400]. Elle agirait en inhibant les facteurs orexigènes représentés essentiellement par le NPY et stimulerait ceux à actions anorexigènes [28,381,401].

La leptine interviendrait sur les neurones à kisspeptine qui joue un rôle direct dans la fertilité en relation avec le métabolisme. En effet, le système kisspeptine serait un puissant stimulateur des neurones à GnRH chez les mammifères [271,272,402–404] et serait un stimulateur de la sécrétion de LH. Ceci a été démontré à la fois chez la souris et le rat, chez le mâle et la femelle, et aussi chez des rats prépubères, pubères, et adultes [271,405–410].

Le jeûne s'accompagne d'une diminution de l'expression du gène ob et d'une réduction du taux sérique de leptine [121,124,411–414]. La réalimentation rétablirait les taux [56,124]. D'autre part, les concentrations sériques de leptine seraient positivement corrélées à l'IMC et plus précisément avec la teneur en graisse corporelle chez les individus sains [59,415], mais négativement lorsque l'apport énergétique est réduit et que les réserves d'énergie diminuent [416]. Par ailleurs, une corrélation positive significative entre les concentrations de leptine dans le LCS et dans le plasma des individus sains a été démontée. Elle s'avère plus importante entre l'IMC et le taux de leptine dans le LCS, qu'entre IMC

et leptinémie. Ceci suggère que les concentrations de leptine dans le LCS seraient des indicateurs plus stables des réserves énergétiques alors que les niveaux plasmatiques de leptine seraient sous l'influence de facteurs à action rapide mais transitoire [1].

Même si chez l'homme, la leptinémie semble ne pas être modifiée par un repas richement lipidique ou glucidique *in vivo* [413], la composition du régime alimentaire semble influencer la leptinémie chez les rongeurs, en effet :

- une alimentation riche en lipides induit une surexpression de l'ARNm ob adipocytaire et une augmentation de la leptinémie chez le rat [417]. De plus, la composition en acides gras apportés par l'alimentation peut avoir un impact sur les taux sériques de leptine. En effet, CHA et JONES [414] ont noté chez le rat qu'une alimentation riche en acides gras n-6 et n-3-polyinsaturés (AGPI) induisait des taux de leptine sérique plus élevés qu'un régime riche en acides gras saturés (AGS) et en acides gras monoinsaturés (AGMI). En revanche, RESELAND *et al.* [418] ont montré qu'un apport élevé en n-3-AGPI diminuait l'expression du gène de la leptine à la fois *in vitro* en utilisant une lignée cellulaire humaine et *in vivo* chez le rat. Une autre étude a montré que les taux sériques de leptine diminuaient chez les patients hypertriglycéridémiques après que les AGS alimentaires aient été remplacés par les acides gras oméga-3 et les AGMI [419] ;
- un régime riche en fructose réduit l'expression du gène de la leptine dans le cerveau des rats Wistar avec des effets différentiels sur la prise de poids [420] ;
- la leptine est étroitement liée au métabolisme du glucose et de l'insuline, elle améliorerait la détection du glucose hypothalamique LDHA-dépendante (*Lactate dehydrogenase A*) pour abaisser la production du glucose chez les rats recevant un régime riche en matières grasses [421].

Chez les rongeurs, la leptinémie s'élèverait avec la prise de nourriture (de 20h jusqu'à 4h) mais pas lors d'un jeûne [56,124]. Chez l'homme, la leptinémie est maximale entre 22h et 3h, ses niveaux les plus bas se situant entre 8h et 17h. Cette élévation nocturne pourrait être due à la suppression de la prise alimentaire durant le sommeil [125,127]. La sécrétion pulsatile de leptine (quelques minutes à quelques heures) est synchrone avec celle de la LH [422]. Le nombre

d'oscillations étant corrélé à l'IMC et à la leptinémie à jeun, ceci laisse suggérer qu'il existerait des facteurs autres que la masse adipeuse, probablement nerveux ou hormonaux, capables de réguler rapidement les fluctuations des taux de leptine circulante. Chez les femmes normales, les variations circadiennes et ultradiennes du taux de leptine sont également associées à des variations minute pour minute de l'œstradiol. La chute du taux de leptine en réponse à une sous-alimentation entraîne une diminution des taux d'œstradiol et de l'aménorrhée chez les sujets souffrant d'anorexie mentale ou les athlètes en exercice [170]. Inversement, les sujets porteurs d'une mutation de la leptine ou de son récepteur présentent une obésité sévère et une hyperphagie [42] corrigées par des injections journalières de leptine recombinante. Chez les individus obèses, l'hyperleptinémie serait due à une augmentation de l'amplitude des pulses sans modification de la fréquence de la pulsativité de la sécrétion de la leptine. En outre, l'administration non pulsatile de leptine nécessite des doses totales supérieures par rapport à des administrations pulsatiles pour permettre une perte de poids équivalente [126].

Les faibles niveaux de leptine dans le sang du cordon ombilical reflètent étroitement la diminution de l'adiposité à la naissance et prédisent fortement des taux élevés de gain de poids pendant l'enfance. Chez l'adolescent, la leptinémie augmente graduellement avec l'âge avant la puberté, suggérant qu'un certain seuil de leptine serait à l'origine du déclenchement de la puberté. Chez les filles, les faibles niveaux de leptine au début de la puberté prédisent les gains en masse grasse, suggérant probablement un rôle dans la préparation à la maternité [423]. Des injections de leptine à des souris prépubères nourries *ad libitum* provoquent une avancée de l'âge de la puberté [424], ce qui laisse penser que la leptine constituerait un signal permissif nécessaire au SNC pour le déclenchement de la puberté en fonction des réserves adipeuses, et des niveaux de leptine seraient nécessaires pour l'entretien des cycles menstruels ou œstraux et la fonction de reproduction [170].

Certains auteurs ont rapporté que les concentrations plasmatiques de leptine reliées à la masse grasse corporelle semblent similaires chez l'homme et la femme [58,59]. Pour d'autres, à masse grasse équivalente, la leptinémie est

augmentée chez la femme comparée à l'homme [425]. Chez le mâle, une diminution non significative du poids corporel a également été rapportée chez des rats Sprague Dawley adultes après infusion intracérébroventriculaire de leptine à la dose de 3 µg / j pendant 4 jours [426]. Néanmoins, des injections de bolus de leptine (un bolus est une dose administrée en une seule fois et non de manière fractionnée ou quotidienne) chez des rats Wistar obèses ou l'élévation chronique de la leptinémie dans l'hypothalamus de souris après une réduction du poids provoqueraient une résistance à l'insuline, ces animaux deviennent insensibles à la leptine et retrouvent un poids comparable aux témoins [427,428]. Cette résistance à la leptine se produirait lorsque la leptine est injectée par voie intrapéritonéale mais non par voie intracérébroventriculaire [429].

Les souris obèses DIO (*Diet Induced Obese*) répondent nettement moins que des souris minces à l'administration sous-cutanée de leptine, et les souris obèses NZO (*New Zealand Obese*) sont sensibles à la leptine injectée directement dans les ventricules intracérébraux mais ne répondent pas à son administration par voie périphérique. Ceci suggère que ces deux lignées murines obèses pourraient présenter un défaut de transport de la leptine dans le cerveau [429]. Les chercheurs ont en effet constaté que dans le cas d'obésité, même si le tanycyte est capable de capter l'hormone, il ne parvient malheureusement pas à la libérer dans le cerveau et développe une leptinorésistance liée à l'altération de l'activité de son récepteur. L'altération du transport de la leptine par les tanycytes pourrait constituer le premier évènement physiopathologique conduisant à l'hormonorésistance centrale chez les individus en surpoids ou obèses. Le transport de la leptine à travers le tanycyte peut être restauré par un traitement pharmacologique permettant à la leptine de parvenir jusqu'au LCS, en activant la voie de signalisation ERK dans cette cellule. Ce traitement permet à la leptine d'activer les neurones et à terme de restaurer la sensibilité des souris à cette hormone en retrouvant progressivement un régime équilibré [93].

La résistance à la leptine liée à l'âge a également été rapportée [430]. Elle serait liée à la diminution du nombre des Ob-Rb hypothalamiques [431], à une diminution du captage de la leptine et de l'expression de l'ARNm des récepteurs à

la leptine au niveau de l'hypothalamus [432] ou à l'altération de la transduction du signal lié à la leptine dans l'hypothalamus avec l'âge [433].

MAZOR *et al.* [434] montrent en 2018 que, chez les rongeurs, l'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisses favorise l'activation dans l'hypothalamus de la MMP2 qui, à son tour, altère la signalisation induite par la leptine en favorisant la dégradation des récepteurs de la leptine (par clivage du domaine extracellulaire du récepteur). L'analyse par immunofluorescence a montré que les astrocytes et les neurones AgRP étaient responsables de la sécrétion de MMP2 chez ces souris. La suppression de MMP2 dans l'hypothalamus a augmenté l'expression des récepteurs de la leptine et réduit l'accumulation de graisse chez les souris recevant un régime riche en graisses. Ces résultats suggèrent que la MMP2 pourrait aider à traiter l'obésité en restaurant les effets anorexigéniques de la leptine.

Dans l'étude publiée en 2018 par JANSSON *et al.* [435], les chercheurs ont ajouté et retiré des charges de poids à des rongeurs et ont mesuré leurs effets sur le poids corporel. Leurs résultats ont montré qu'il existerait un homéostat de masse corporelle qui régulerait la masse grasseuse indépendamment de la leptine. Selon ces chercheurs, l'augmentation du poids corporel activerait des capteurs situés dans les ostéocytes au niveau des os longs des membres inférieurs et agirait comme des « gravitostats » qui maintiennent le poids corporel et la masse grasseuse à un niveau constant. Dans une autre étude, ces chercheurs ont comparé les effets de la leptine et de l'augmentation de la charge (stimulation gravitostatique) sur la masse grasse chez des souris de poids différents (maigres, en surpoids et obèses). Les résultats ont montré que le gravitostat régule la masse grasse chez les souris obèses, tandis que la leptine régule la masse grasse uniquement chez les souris maigres présentant de faibles niveaux de leptine sérique endogène. Ceci suggère que le gravitostat protégerait principalement contre l'obésité, alors que les faibles niveaux de leptine protégeraient contre la sous-nutrition [436].

- Poids ovarien

Nos résultats révèlent une augmentation non significative des poids moyens absolus et relatifs des ovaires droits et gauches chez les femelles immatures et adultes traitées par la leptine comparées aux témoins.

Ces résultats rejoignent ceux d'EL-SHAFAEI *et al.* [397] qui rapportent une augmentation significative du poids et de la croissance des ovaires droits et gauches chez les femelles traitées par la leptine et contredisent ceux de PANWAR *et al.* [437] qui rapportent que l'immunisation passive contre la leptine, avec ou sans gonadotropines entraîne une augmentation significative du poids ovarien par rapport aux ovaires témoins. Dans une autre étude, des souris immatures âgées de 3 semaines ont été divisées en quatre groupes et ont reçu les traitements suivants par injections sous-cutanées : (1) une solution saline ; (2) un anticorps anti-leptine (50 ug) ; (3) eCG ou *equine Chorionic Gonadotropin* (0.1 UI) ; (4) eCG (0.1 UI) + anticorps anti-leptine (50 ug). Aucune différence des poids ovariens et utérins entre les groupes expérimentaux n'a été rapportée, sauf pour le groupe eCG + anti-leptine qui présentait des ovaires et des utérus plus lourds que les contrôles. Les œufs collectés dans l'ampoule étaient en nombre plus élevé dans le groupe eCG + anti-leptine (16.1 ± 1.8) comparé au groupe témoin (1.12 ± 0.02), eCG (0.8 ± 0.03) et au groupe anti-leptine (2.8 ± 0.09) [438].

Chez les souris *ob/ob*, l'injection de leptine provoque le développement des organes reproducteurs aussi bien chez le mâle (augmentation du poids des testicules et de la vésicule séminale) que chez la femelle (augmentation du poids des ovaires et de l'utérus) [439]. Chez la femme obèse comme chez de nombreux modèles murins obèses, un profil hormonal d'hypogonadisme central par altération de la sécrétion pulsatile de la GnRH a été observé. Les mécanismes proposés semblent impliquer la kisspeptine. En effet, l'hypogonadisme central lié à l'obésité est en rapport avec l'augmentation de la concentration des œstrogènes circulants (par aromatisation périphérique des androgènes par le tissu adipeux en excès) qui inhibent les neurones à Kisspeptine, intermédiaires du rétrocontrôle stéroïdien sur la sécrétion de la GnRH. La leptine, la ghréline et le NPY, pourraient participer à la modulation du contrôle de l'axe gonadotrope *via* les kisspeptines [403]. Les neurones à Kisspeptine expriment la forme active du récepteur à la

leptine et représentent le relais hypothalamique de la signalisation de la leptine sur la sécrétion de la GnRH. En effet, chez les souris déficientes en leptine, le taux d'ARNm de Kiss dans la région arquée de l'hypothalamus est diminué mais est restauré par une injection intracérébrale de leptine [440], ceci suggère la présence d'un mécanisme de leptinorésistance des neurones à Kiss chez les patients obèses, les neurones à Kiss deviendraient alors insensibles à une stimulation par la leptine. Cette fonction essentielle de la leptine sur la reproduction a néanmoins été bouleversée par la description de la première grossesse spontanée chez une patiente porteuse d'une mutation homozygote du récepteur de la leptine [441].

➤ Frottis vaginaux

Les frottis vaginaux réalisés sur les femelles adultes et confirmés par l'étude histologique des ovaires ont permis, chez les femelles traitées, la mise en évidence essentiellement des stades dioestrus et metoestrus (postoeustrus), le stade œstrus n'a pas été observé.

Les différentes phases du cycle œstral s'accompagnent de modifications cycliques de l'épithélium vaginal sous l'effet des hormones sexuelles. Le prélèvement par frottis vaginal permet de recueillir et d'observer sur lame les cellules provenant approximativement de la moitié superficielle de l'épithélium vaginal. Il est par conséquent un outil précieux dans la détermination de la phase du cycle œstral et a été largement étudié [185,392,442–446]. Le début de la puberté est marqué par une cascade d'évènements en rapport avec la libération de la LH qui se produit chez la ratte en général après la 4^{ème} semaine *post* natale et mène à la maturation ovarienne [447]. L'ovulation se produit chez la jeune ratte adulte tous les quatre à cinq jours tout au long de l'année [448].

➤ Histologie

• Dénombrement des follicules et des corps jaunes

Le dénombrement des follicules ovariens révèle que chez les femelles de 30 jours d'âge, le nombre de follicules atrétiques est plus important après traitement par la leptine comparé au nombre de follicules normaux, plus particulièrement les

follicules tertiaires et pré-ovulatoires. Chez les femelles de 60 jours d'âge, le nombre de follicules atrétiques semble moins important après traitement par la leptine comparé au nombre de follicules normaux, plus particulièrement les follicules tertiaires.

Nos résultats relatifs à l'atrésie folliculaires montrent que la leptine semble stimuler l'apoptose à l'âge immature en favorisant l'élimination des ovocytes incompetents [449] d'une part, et d'empêcher la survenue d'une ovulation trop précoce, avant maturation de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien, d'autre part. En effet, le nombre de follicules pré-ovulatoires atrétiques après traitement est de : 62 vs 35 ($p = 0.016^*$). Par ailleurs, des CJ ont été retrouvés sur l'ovaire d'une seule femelle âgée de 30 jours ce qui laisse penser que la maturité sexuelle n'est pas atteinte à cet âge-là chez les rattes Wistar.

La mort cellulaire par apoptose peut concerner l'atrésie folliculaire comme la lutéolyse. L'activation de la Caspase 3 et l'augmentation de l'expression du Bax sont des biomarqueurs de l'apoptose. Ces deux protéines sont principalement exprimées dans les follicules atrétiques, tandis que le Bcl2 (facteur anti-apoptotique) est abondant dans les follicules pré-antraux sains [450]. L'activation de la Caspase 3 implique de manière irréversible l'apoptose.

L'effet de la leptine sur l'apoptose cellulaire est discuté :

- ✓ Pour BROWN et DUNMORE [451], SIROTKIN et GROSSMANN [452] et LAM *et al.* [453], la leptine réduit l'apoptose et induit une prolifération cellulaire, au moins en partie, par une régulation positive de l'expression du Bcl2. Les travaux d'ALMOG *et al.* [454] montrent que l'administration quotidienne de leptine réduit l'incidence des apoptoses folliculaires après 7 jours d'injections et que la leptine peut être impliquée dans l'accélération de la maturation des follicules en atténuant l'atrésie folliculaire par une augmentation du rapport Bcl2 / Bax. De même que pour DINEVA *et al.* [455], la leptine peut agir comme facteur anti-apoptotique sur les cellules lutéinisées de la granulosa en augmentant l'expression du Bcl2 et en diminuant l'activité de la caspase.

- ✓ Pour SEIFER et MERHI [456], la leptine favoriserait l'apoptose en supprimant l'action anti-apoptotique de l'AMH.
- ✓ Dans une autre expérience, SIROTKIN *et al.* [457] affirment que la leptine pourrait être impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules ovariennes et de l'apoptose :
 - en augmentant l'accumulation de la protéine p53 : il s'agit d'un facteur de transcription régulant de multiples fonctions cellulaires. Encore appelée « *gardienne du génome* », cette protéine est indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire et de ses composantes. L'arrêt du cycle cellulaire provoque l'activation de la p53. Si la réparation est effectuée, le taux de p53 revient à la normale avec reprise du cycle cellulaire. En revanche, si les dommages subis par la cellule sont irréparables, la cellule entre en apoptose ;
 - en augmentant l'accumulation du Bax, également activé par la p53 ;
 - en augmentant l'accumulation du PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Cette protéine a pour rôle d'augmenter fortement la processivité des ADN polymérases lors de la réplication de l'ADN ;
 - en diminuant la cycline B1 : protéine régulatrice impliquée dans la mitose.

Selon ces mêmes auteurs [458], la leptine stimulerait de manière dose-dépendante l'accumulation du PCNA (aux doses de 1 à 100 ng / mL), cycline B1 (à 10 ou 100 ng / mL), Bax (à 10 ou 100 ng / mL) et PKA ou *Protein Kinase A* (à des doses de 1 à 100 ng / mL) dans des cellules ovariennes humaines en culture. Ces observations suggèrent la capacité de la leptine à contrôler directement les fonctions des cellules ovariennes humaines : prolifération, apoptose et PKA messenger intracellulaire.

- ✓ Pour Bilbao *et al.* [459], la leptine aurait un effet anti-apoptotique qui dépendrait :
 - de la dose du traitement : à faible concentration, la leptine semble jouer un rôle protecteur contre le stress oxydatif, alors qu'à des concentrations élevées, elle semble être impliquée dans la mort cellulaire ;

- du type de traitement : le traitement aigu par la leptine (sur des animaux de 26 à 27 jours d'âge : 5 injections de 5 µg toutes les 15 minutes, entre 7h à 18h puis sacrifice) active l'expression de la Caspase 3 mais pas le Bax, Bcl2, ni le ROS (*Reactive Oxygen Species*). Ceci suggère que l'activation de la Caspase 3 se fait par la voie de la mort du récepteur plutôt que par voie mitochondriale. Contrairement au traitement aigu, l'administration quotidienne de leptine (à des rats de 22 jours : 3 µg / j pendant 12 jours) a diminué l'expression ovarienne de Bax et la Caspase 3, ce qui est cohérent avec le fait que ces animaux présentaient un développement folliculaire plus important d'une part, et que le tissu ovarien directement exposé à des concentrations physiologiques de leptine a provoqué l'augmentation de l'expression du Bcl2.

- Etude descriptive des ovaires

L'étude histologique révèle une altération de la folliculogénèse et une suspension de l'ovulation chez les femelles adultes traitées par la leptine.

Nos résultats se rapprochent de ceux de l'étude de McFARLANE *et al.* [438] qui montrent que la réduction des concentrations périphériques de leptine augmente la sensibilité de l'ovaire aux gonadotropines et entraîne l'ovulation (en présence de concentrations non stimulantes de gonadotropines). Dans l'étude menée par PANWAR *et al.* [437], les ovaires du groupe anti-leptine présentaient un nombre significativement plus élevé de follicules primaires par section ovarienne, suggérant une augmentation de la transition des follicules primordiaux vers les follicules primaires après traitement. De plus, les animaux traités avec un sérum anti-leptine et des gonadotropines présentaient un nombre significativement plus élevé de follicules de De Graaf dans leurs ovaires par rapport aux autres groupes. Ces résultats indiquent que la réduction de la leptine dans la circulation favorise le développement folliculaire chez les souris femelles, suggérant que la leptine périphérique agirait comme un inhibiteur du développement du follicule ovarien.

La connaissance du rôle de l'ovocyte dans le développement folliculaire est récente [460,461]. Tout au long du développement folliculaire, l'ovocyte et les cellules de la granulosa restent en contact étroit grâce aux prolongements

cytoplasmiques des cellules de la granulosa qui traversent la zone pellucide pour s'apposer contre la membrane plasmique de l'ovocyte. Ce dernier, constitué au cours de la vie foetale est caractérisé par un noyau bloqué en prophase de la première division méiotique et un cytoplasme riche en ARN. Les OMI (*Oocyte Meiosis Inhibitors*) proviennent des cellules de la granulosa et parviennent à l'ovocyte par le biais des gap-junctions [462] : il s'agit principalement du TGF- β , de l'AMH, de l'activine, de la follistatine et des Protéines G [210,463,464] :

- La leptine induirait la synthèse et la libération du TGF- β par différents types cellulaires et serait associée à l'expression du récepteur Ob-R et à l'activation de la voie de transduction du signal JAK-STAT [465,466]. Au niveau ovarien, elle antagoniserait les effets stimulateurs du TGF- β sur la production d'œstrogènes FSH-dépendante par un mécanisme impliquant l'atténuation induite par la leptine de l'activité P450 (aromatase) et l'expression de l'ARNm dans la granulosa [467].
- Une autre étude récente a montré que le traitement par « siLeptine » (*Recombinant lentiviral interference vector of leptin*) diminue la sécrétion de l'œstradiol, de l'AMH, de l'IGF-1 et du TGF- β mais augmente la sécrétion de la progestérone ainsi que l'apoptose des cellules de la granulosa [468].

L'ovocyte est pourvu de GPR3 (*G protein-coupled receptor*) dont l'activation induit la synthèse de l'AMPc [463,464]. L'arrêt méiotique est maintenu essentiellement par un niveau élevé d'AMPc intra-ovocytaire qui transite des cellules de la granulosa murale au *cumulus* et à l'ovocyte par les gap-junctions. *In vitro*, lorsque le complexe *ovocyte-cumulus* est sorti du follicule, la reprise de méiose intervient spontanément et serait due à l'arrêt de l'apport de l'AMPc. La connexine 43 (Cx43 ou GJA1) constitue la protéine des jonctions communicantes la plus abondante exprimée par le follicule ovarien, son expression est soumise au contrôle des gonadotropines : la FSH qui régule à la hausse ses niveaux, tandis que la LH les diminue. *In vivo*, le pic pré-ovulatoire de LH induit la phosphorylation de la Cx43 ce qui conduit à interrompre la communication cellule - cellule au sein du follicule ovarien, bloquant ainsi le passage de l'AMPc et interruption du couplage métabolique entre les cellules folliculaires et l'ovocyte, induisant une diminution des concentrations d'AMPc et par conséquent la reprise de la méiose [469]. La LH

inhibe l'expression de Cx43 en réduisant sa vitesse de traduction, cet effet est médié par la PKA et la MAPK [470,471].

Une étude a montré que la leptine pourrait réduire l'expression de la Cx43 et la mort cellulaire au niveau cérébral à la fois *in vivo* et *in vitro* via la voie de signalisation ERK1 / 2 et pourrait contribuer à la prévention et au traitement des lésions cérébrales ischémiques et aux accidents cardio-vasculaires (AVC) [472], elle pourrait intervenir de la même manière au niveau ovarien en régulant, en fonction du taux de gonadotropines circulants, l'expression de la Cx43.

Par ailleurs, la leptine sérique, l'ARNm de la leptine intra-tumorale et les isoformes d'Ob-R intra-tumoraux sont actuellement utilisés comme biomarqueurs tumoraux et sont considérés comme étant de mauvais prédicteurs du pronostic chez les individus cancéreux [473]. Un équilibre entre la leptine et l'adiponectine peut également jouer un rôle plus important dans la carcinogenèse mammaire (en rapport avec l'augmentation de l'œstradiol) puisque de faibles taux d'adiponectine associés à une augmentation de la leptine augmentent le risque du cancer mammaire [474,475].

Le CSF (*Cytostatic Factor*) est un facteur cytotatique responsable du maintien du blocage de l'ovocyte au stade métaphase II jusqu'à sa fécondation ou son activation parthénogénétique. La reprise de la méiose correspond à un passage entre le stade G2 et le stade M du cycle cellulaire, et repose sur l'activation du MPF (*Maturation-phase Promoting Factor*) qui permet la phosphorylation de différentes cibles (histone H1, lamine B et certaines protéines associées aux microfilaments). L'activité du MPF diminue à l'anaphase I et la phosphorylation de ses cibles est assurée par d'autres kinases (MAPK1 notamment). La méiose s'accompagne de l'activation de la kinase AKT1 (*serine-threonine protein kinase*) et de la déphosphorylation de la kinase PRKAC [210,476]. La leptine interviendrait dans la maturation des ovocytes en activant la MAPK. Cette dernière appartient elle aussi à la famille des protéines kinases sérine-thréonine qui interagissent avec le MPF dans la méiose à l'aide de *c-mos* (*Oocyte maturation factor Mos*) [477] qui joue un rôle crucial dans la morphologie normale du fuseau et des chromosomes et dans la réactivation du MPF après la première méiose [478].

Une étude a montré que la leptine améliorait la maturation méiotique des ovocytes bovins [479]. Cependant, les technologies RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*: technique couramment utilisée en biologie moléculaire pour détecter l'expression de l'ARN) n'ont pas permis la détection des ARNm de la leptine dans les ovocytes humains ou murins, la présence de la protéine suggère donc qu'elle doit être produite ailleurs puis transportée dans l'ovocyte. Il existe des signes d'adsorption de la leptine sérique dans les tissus ovariens, l'administration de leptine radioactive exogène entraîne en effet son accumulation dans l'ovaire [454] et il est prouvé que les cellules somatiques ovariennes présentent une source de leptine [362]. En utilisant la RT-PCR quantitative, RYAN *et al.* [376] ont montré que la production totale d'ARNm de leptine ovarienne augmente considérablement 2h après l'administration d'hCG (*human Chorionic Gonadotropin*), puis diminue jusqu'à atteindre des niveaux non stimulés 7h plus tard. Les transcrits de la forme longue (Ob-Rb) et de l'une des formes courtes (Ob-Ra) du récepteur de la leptine augmentent 9h après l'administration d'hCG et ont tendance à diminuer après l'ovulation. Les follicules isolés 9h après l'administration de l'hCG n'ont montré aucune augmentation de l'ARNm du récepteur par rapport aux follicules isolés avant l'administration d'hCG. La production de l'ARNm des récepteurs LH diminue après administration d'hCG [480,481] et la culture des follicules pré-ovulatoires avec l'hCG n'affecte pas la production d'ARNm des récepteurs de la leptine ou de la LH. Les variations dans l'expression de l'ARNm des récepteurs à LH à travers le cycle sont principalement dues à des changements dans l'expression des cellules de la granulosa de ce gène [480]. Le fait que les niveaux des récepteurs de la leptine n'augmentent pas dans les follicules cultivés *in vitro* et que les follicules pré-ovulatoires ne montrent pas d'augmentation des niveaux des récepteurs après exposition à l'hCG suggèrent que l'augmentation observée dans l'ovaire n'est pas liée aux follicules pré-ovulatoires (l'ARNm de la leptine étant pratiquement indétectable dans ces follicules) mais plutôt à d'autres cellules telles que les thèques d'autres follicules, les cellules endothéliales ou encore le stroma [376].

Les travaux portant sur l'expression de l'ARNm dans les ovaires de rat montrent qu'Ob-R peut être important pour l'ovulation et/ou la lutéinisation. En effet, la protéine Ob-Rb a été localisée :

- à des niveaux élevés d'expression au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de l'ovaire [376] ;
- dans la vésicule germinale et le cytoplasme de l'ovocyte [376] ;
- à des niveaux variables dans la granulosa de nombreuses espèces telles que la souris [482], le porc [483], les bovins [375] et l'homme [363], suggérant un effet direct de la leptine sur ces cellules ;
- au niveau des cellules thécales, avec des intensités semblant augmenter à mesure que les follicules mûrissent, et ce parallèlement à l'augmentation des d'ARNm juste avant l'ovulation [376] ;
- dans les CJ provenant de follicules récemment ovulés (production probable du récepteur par les cellules de la granulosa lutéinisées) [376].

Chez la souris, des niveaux élevés d'Ob-R ont été retrouvés dans la couche cellulaire des follicules pré-ovulatoires. D'autre part, le traitement avec de la leptine exogène augmente le taux de maturation ovocytaire dans les follicules pré-ovulatoires cultivés *in vitro* [482]. L'expression d'Ob-Ra et d'Ob-Rb est induite par le stimulus pré-ovulatoire de la LH dans les ovaires de rats [376]. DUPUIS *et al.* [484] rapportent que l'abondance de l'ARNm d'Ob-Ra est supérieure à celle d'Ob-Rb dans les cellules de la granulosa des follicules ovulatoires et semble avoir un rôle prédominant pendant la période péri-ovulatoire.

Les facteurs de transcription potentiels qui pourraient réguler l'expression d'Ob-R dans les follicules ovulatoires comprennent le récepteur nucléaire 5A2 (NR5A2 : *Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member*) [485], le récepteur de la progestérone [486] et le C/EBP β (*CCAAT/ Enhancer Binding Protein beta*) [487] qui jouent un rôle indispensable dans l'ovulation. De plus, l'abondance de l'ARNm d'Ob-R est réduite chez les souris *knock-out* dépourvues de C/EBP α et C/EBP β dans les cellules de la granulosa [488].

La leptine augmenterait l'expression de la PTGS2 (*prostaglandine-endoperoxyde synthase 2* ou COX-2) dans plusieurs types de cellules *in vitro* [489–491]. Cette enzyme est impliquée dans la conversion de l'acide arachidonique en PGH₂ puis en PGDE, PGE₂ et PGF notamment. Cependant, les effets directs de la leptine sur l'ovulation, étudiés à l'aide de modèles de superovulation, sont source de

confusion avec un nombre tantôt réduit, tantôt accru d'ovulations chez le rat en rapport avec la posologie de la leptine utilisée dans les traitements [454,492].

La production de leptine et de ses récepteurs est régulée de manière autocrine dans l'ovaire. En effet, les souris *db/db* et les rats *fa/fa* présentent un taux élevé de leptine circulante qui peut être attribuable à une absence de rétroaction induite par le récepteur. L'augmentation de la production d'ARNm du récepteur immédiatement après l'augmentation de la production d'ARNm de leptine suggère que la leptine peut également agir pour contrôler la production de ses propres récepteurs *via* des actions à travers les récepteurs existants [376,493].

Les niveaux plasmatiques de leptine ne varient pas [494] ou diminuent juste avant l'ovulation [495]. Des niveaux élevés d'ARNm du récepteur de la leptine n'indiquent pas nécessairement qu'il y aura une réceptivité amplifiée à l'augmentation de la leptine observée immédiatement avant l'ovulation [376]. Une augmentation d'Ob-Ra peut être nécessaire pour le transport de la leptine, éventuellement dans l'ovocyte, puisqu'on sait que l'ovocyte ne peut pas produire sa propre leptine, mais qu'il est capable de produire à la fois l'ARNm Ob-Ra et Ob-Rb [496]. Ob-Ra pourrait être impliqué dans le transport transmembranaire [497].

L'expression ovarienne de la leptine et de son récepteur, régulée par les gonadotropines est maximale à l'ovulation d'où son implication dans la maturation des ovocytes, la rupture du follicule et la formation ultérieure du CJ [376,498,499]. La leptine cible ces cellules ovariennes pour affecter la stéroïdogénèse ainsi que la phosphorylation de la tyrosine de STAT3, protéine intracellulaire majeure de transcription du signal de la leptine dans les ovocytes au stade métaphase II [482,496,500–503].

La leptine produite dans l'ovaire interviendrait au moment de l'ovulation et/ou immédiatement après l'ovulation *via* ses récepteurs fonctionnels dans toutes les parties de l'ovaire, spécifiquement au niveau des vaisseaux sanguins, l'ovocyte et les macrophages :

- La leptine pourrait affecter la folliculogénèse par la régulation du flux sanguin périfolliculaire. Les récepteurs à la leptine étant exprimés sur les cellules

- endothéliales vasculaires, cela indique son implication dans l'angiogenèse [117,163], notamment pendant le développement du CJ ;
- Elle pourrait affecter la maturation des ovocytes au moment de l'ovulation [482]. *In vitro*, l'exposition de follicules de souris à de fortes concentrations de leptine augmente la stéroïdogénèse folliculaire mais réduit la maturation des ovocytes en métaphase II [504]. Par ailleurs, des concentrations élevées de leptine dans le liquide folliculaire ont été corrélées à une réduction de la concentration intra-folliculaire d'oxygène chez les femmes subissant une fécondation *in vitro* [505]. L'action localisée de la leptine sur le système vasculaire périfolliculaire pourrait donc interférer avec l'apport en oxygène et en substances régulatrices au follicule et ainsi entraver la maturation des ovocytes [506,507]. La leptine et son récepteur ont également été retrouvés dans l'endomètre sécrétoire, dans lequel ils peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'implantation embryonnaire et de la réceptivité endométriale [508–511].
 - Au moment de l'ovulation, il existerait dans l'ovaire des niveaux élevés de macrophages [512] qui sont recrutés dans les couches des cellules thécales et dans les couches des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ovariens, et l'on sait que ces cellules expriment des récepteurs de la leptine [513]. La leptine agirait sur les macrophages ovariens ou les monocytes infiltrants en favorisant la production de cytokines. En effet, la leptine stimule la prolifération, l'activation et la production de cytokines (en particulier le CSF2 et le G-CSF [513]), d'antagonistes des récepteurs de TNF- α et LIF, et d'agonistes des récepteurs de l'IL-1 dans les monocytes humains circulants [514,515]. Elle stimule par ailleurs la phagocytose qui se produit pendant le remodelage tissulaire [516] ainsi que la phagocytose des macrophages péritonéaux murins [513]. Il a été constaté que la fonction phagocytaire des macrophages péritonéaux des souris *ob/ob* et *db/db* est diminuée et pouvait être corrigée par l'administration de leptine aux souris *ob/ob* (mais pas *db/db*), indiquant que les macrophages utilisent des récepteurs fonctionnels en réponse à la leptine [516]. Rappelons que les macrophages sont abondants dans le stroma et la thèque au moment de l'ovulation [512] et interviennent dans la rupture folliculaire [517]. Ces études indiquent clairement qu'à dose physiologique, la leptine pourrait jouer un rôle crucial dans la régulation des

réactions inflammatoires de l'ovaire qui sont intimement associées à l'ovulation et à la formation du CJ.

La déficience en leptine est responsable de l'altération de la folliculogénèse par atrophie folliculaire accrue pouvant causer l'infertilité. Chez le rat, la transcription de la leptine se produit dans les premiers stades du développement folliculaire alors que la protéine leptine apparaît uniquement dans les follicules matures [518] et intervient dans la phase lutéale subséquente.

Pour BILBAO *et al.* [459], la leptine serait capable de moduler directement le développement du follicule ovarien et en fonction de ses niveaux circulants, elle peut exercer à la fois des effets stimulants et inhibiteurs sur le processus ovulatoire. Elle peut moduler le processus de folliculogénèse en altérant directement la sensibilité de l'ovaire aux gonadotropines [519] et peut induire l'expression de la transcription neuropeptidique du CART (médiateur intra-ovarien responsable d'un dysfonctionnement ovarien et d'une fertilité réduite liée à l'obésité) dans les cellules de la granulosa des follicules ovariens *in vitro* comme *in vivo*, ce qui conduirait à une synthèse plus faible d'œstradiol et l'altération de la folliculogénèse [520]. A concentrations sériques élevées, la leptine pourrait avoir des effets inhibiteurs sur la folliculogénèse et son contrôle, comme dans le cas de l'obésité [521]. En effet, chez les souris obèses, la surcharge lipidique locale conduit à une atresie folliculaire avancée avec apoptose et défaut de stéroïdogénèse. Les changements dans le métabolisme des lipides induisent une augmentation du stress oxydatif et sont responsables de l'anovulation et d'infertilité [522]. Parallèlement, l'insuline en excès est à l'origine d'une hyperandrogénie d'origine thécale qui engendre elle aussi une atresie folliculaire prématurée favorisant l'anovulation [523].

Pour DUGGAL *et al.* [398], l'administration *in vitro* comme *in vivo* de leptine diminue le taux d'ovulations chez le rat par un effet direct sur l'ovaire, et les niveaux des récepteurs d'ARNm Ob-Rb ovariens chez cette espèce augmentent au cours du *metœstrus* [524]. Par conséquent, la leptine intervient dans la maturation ovocytaire et l'ovulation *in vivo* et *in vitro* indiquant que cette hormone a des effets étendus dans l'environnement ovarien.

Une accélération de la lutéinisation des cellules de la granulosa ainsi qu'une vasodilatation des vaisseaux sanguins du tissu lutéal chez les femelles traitées par la leptine ont également été constatées sur les coupes histologiques au niveau ovarien.

La lutéinisation précoce des cellules de la granulosa est en rapport avec l'élévation significative des niveaux de LH observée chez les femelles adultes traitées par la leptine. En effet, alors que le follicule est en plein développement, le taux élevé de leptine induit une élévation brusque du taux de LH responsable de la lutéinisation rapide des cellules de la granulosa qui se transforment en cellules lutéales synthétisant de la lutéine et élaborant de la progestérone avant même que l'ovulation n'ait eu lieu. Il en résulte une dégénérescence de l'ovocyte au sein du *corps lutéal* nouvellement formé. Cette constatation est confirmée par le résultat des dosages hormonaux et l'observation des frottis vaginaux qui révèlent essentiellement le stade *postœstrus*.

Notre résultat relatif à la lutéinisation précoce des cellules de la granulosa est similaire à celui de GARCIA [525] qui rapporte en 2017 que la leptine serait impliquée dans les processus développementaux et angiogéniques du tissu lutéal, elle accélérerait le développement du tissu lutéal en augmentant la masse tissulaire globale et formant une structure qui ressemble à un CJ mature au cours des premières étapes de la lutéogénèse. RAMIREZ *et al.* [526] rapportent la même année qu'une déficience en leptine lutéale induite au cours du développement et de la maturation du CJ altère l'architecture vasculaire en augmentant le nombre de vaisseaux de grand diamètre. En outre, les CJ déficients en leptine présentent des morphologies anormales et sous-développées et un rapport plus élevé de grosses cellules lutéales / petites cellules lutéales. Le traitement par la leptine permet de corriger ces troubles.

L'angiogenèse active survient après la poussée de LH ovulatoire et le CJ devient l'une des structures les plus fortement vascularisées du corps. Un flux sanguin adéquat fournit aux cellules lutéales une quantité importante de cholestérol nécessaire à la synthèse et à la libération de la progestérone dans la circulation [527]. A l'état normal, la vascularisation du CJ se produit par un processus angiogénique où les vaisseaux se forment à partir de réseaux vasculaires

préexistants d'un follicule ovulé. Ce processus est régulé en partie par le VEGF, le FGF2 et l'angiopoïétine 1 (Ang1) notamment [528–530].

Des études *in vitro* ont montré que la leptine aurait un effet stimulant sur la prolifération des cellules endothéliales [506] ainsi que la perméabilité vasculaire, et présenterait une action angiogénique en synergie avec le FGF2 et le VEGF chez la souris [531]. Elle interviendrait dans le remodelage matriciel en régulant l'expression des métalloprotéases matricielles et de leurs inhibiteurs tissulaires tout au long de l'ovulation et de la formation du CJ [164].

WILES *et al.* [532] rapportent eux aussi que la leptine régule à la hausse l'expression du VEGF, FGF2 et Ang1 dans les cellules lutéales de chèvres cultivées, mais cet effet stimulant est limité au début de la lutéogénèse malgré une expression lutéale soutenue de la leptine et de son récepteur dans le CJ mature.

Outre son effet angiogénique, l'effet vasodilatateur de la leptine est prouvé. En effet, il a été démontré que la leptine induisait une relaxation vasculaire par stimulation du NO dans des études utilisant des anneaux aortiques isolés de rats [533,534]. La perfusion de leptine a également provoqué une vasodilatation de l'artère brachiale [535] et de l'artère coronaire [536] chez des sujets humains non obèses et en bonne santé.

Dans notre étude, l'analyse morphométrique des diamètres des vaisseaux sanguins chez les femelles témoins et chez les femelles traitées par la leptine permettrait de confirmer l'effet vasodilatateur de la leptine au niveau ovarien.

➤ Dosages hormonaux

- Hormones gonadotropes

Le résultat des dosages des hormones gonadotropes montre que le traitement par la leptine induit une augmentation des niveaux de la LH chez les femelles de 30 jours comme chez celles de 60 jours ainsi qu'une baisse des niveaux plasmatiques de la FSH chez les femelles adultes comparées aux témoins.

Le rôle direct de la leptine au niveau central a été démontré [56]. Les récepteurs de la leptine ont été mis en évidence dans l'hypothalamus et l'hypophyse, et la leptine pourrait être impliquée dans le contrôle de la sécrétion des gonadotropines [14,537]. En effet, les souris mâles et femelles *GABA neuron-specific leptin receptor knock-out* (souris génétiquement modifiées pour inactiver un ou plusieurs gènes dans les cellules souches embryonnaires dont elles sont issues) montrent un début de puberté significativement retardé [538]. De même que les souris femelles dépourvues de récepteurs fonctionnels de la leptine dans les neurones GABAergiques ont un hypogonadisme hypogonadotrophique [539]. Les souris adultes avec *Ob-R knock-out* montrent elles aussi une diminution de la fécondité. Ces résultats suggèrent que la leptine joue un rôle crucial dans le déclenchement de la puberté et intervient dans la régulation de la fécondité faisant intervenir les neurones GABAergiques. Par conséquent, les afférences GABAergiques intègrent des signaux métaboliques pour la livraison aux neurones à GnRH [308].

Des niveaux spécifiques de leptine seraient nécessaires pour maintenir une fonction ovarienne normale. A faible concentration, la leptine accélère la pulsativité de la GnRH au niveau hypothalamique. En effet, les études *in vitro* ont montré que des taux de leptine de l'ordre de la *nanomole* stimulaient la sécrétion de la GnRH à partir des extraits d'éminence médiane et d'ARC [366]. En revanche, des concentrations en leptine de l'ordre de la *micromole* avaient un effet inverse. De même que MAGNI *et al.* [365] ont remarqué que la sécrétion de la GnRH était stimulée par de faibles concentrations en leptine (10^{-12} et 10^{-10} M) mais pas par des concentrations plus élevées (10^{-8} M) sur une lignée cellulaire de neurones sécrétant la GnRH (GT1-7) et exprimant le récepteur Ob-R.

Dans l'étude publiée en 2019 par RAMOS-LABO *et al.* [540] portant sur les conséquences à long terme de l'absence de signalisation de la leptine au début de la vie sur des souris *knock-out* pour le gène *Lep-R* (Ob-R), certains défauts précédemment considérés comme irréversibles en raison d'un déficit néonatal de signalisation par la leptine, notamment le développement médiocre des projections neuronales du noyau arqué, ont été retrouvés par réactivation de *Lep-R* à l'âge adulte. Cependant, une déficience en *Lep-R* au début de la vie a

entraîné une obésité irréversible *via* la suppression de la dépense énergétique. La réactivation de Lep-R à l'âge adulte a également entraîné une réduction persistante de l'expression des ARNm hypothalamiques de la POMC, du CART et de la PRLH (*Prolactin Releasing Hormone*), ainsi que des anomalies du système reproducteur et de la croissance du cerveau. Ces résultats suggèrent que des défauts précoces de signalisation par la leptine au début de la vie altèrent de manière permanente l'homéostasie énergétique, le système mélanocortine, ainsi que le développement du cerveau et la reproduction.

Chez le mâle comme chez la femelle, l'injection de leptine à des souris *ob/ob* provoque la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et du système reproducteur avec augmentation des concentrations plasmatiques de la FSH et de la LH, et ces souris sont capables de mener à bien une gestation, seules des anomalies partielles de l'allaitement ont été rapportées [168,439]. Les doses utilisées par BARASH *et al.* [439] sont de 50 µg de leptine sous forme d'injections de 0.5 mL par voie intrapéritonéale 2 fois / jour pendant 14 jours. L'existence d'un taux plasmatique élevé de leptine chez les jeunes femelles comme chez les jeunes mâles pourrait refléter une certaine résistance à la leptine qui permettrait de maintenir un bon niveau de prise alimentaire nécessaire à la croissance, ce qui empêcherait la survenue d'une puberté trop précoce [541].

Cependant, le traitement par la leptine de souris *db/db* qui présentent les mêmes troubles de la reproduction que les souris *ob/ob* ne semble pas modifier l'appétit, ni restaurer la fertilité puisqu'elles sont déficientes en récepteurs Ob-R. Ces mêmes mutations homozygotes du gène codant pour le récepteur à la leptine ont été décrites chez l'espèce humaine avec une obésité sévère, une absence d'apparition de la puberté, une aménorrhée primaire chez les filles et un hypogonadisme clinique chronique chez les hommes (absence de barbe, défaut de pilosité pubienne et axillaire, taille réduite des organes reproducteurs) avec des sécrétions gonadotropes de type pré-pubertaire [542]. Par ailleurs, un récepteur Ob-R fonctionnel est nécessaire à la maturation sexuelle puisque les filles présentant une mutation homozygote du gène *db* possèdent un récepteur de leptine tronqué de ses domaines transmembranaire et intracellulaire, avec absence de puberté, une atrophie des glandes mammaires, une pilosité pubienne

clairsemée, une aménorrhée ainsi que des valeurs anormalement basses (du taux de base et après stimulation par l'hCG) de l'œstradiol, de la LH et de la FSH [543].

Dans une autre étude, l'administration de leptine recombinante pendant 12 mois à un enfant de 9 ans souffrant d'une déficience congénitale en leptine a permis une réduction significative du poids et de la masse adipeuse ainsi que l'apparition d'une sécrétion pulsatile nocturne de gonadotropines caractéristique d'une puberté précoce [358].

La nutrition peut elle aussi influencer les niveaux des gonadotropines en agissant sur le système reproducteur femelle par le biais de la leptine et de l'insuline, ce qui altère la biodisponibilité de l'œstradiol et de la testostérone, en affectant la production de la SHBG (*Sex Hormone-Binding Globulin*) à partir du foie. L'insuline peut également agir directement sur l'ovaire. En effet, lors de sous-nutrition, la sécrétion de leptine baisse, ce qui induit une baisse de la GnRH et une réduction conséquente de la LH et de la FSH. L'absence de ces hormones se traduit par un manque de développement folliculaire, l'absence de stéroïdes sexuels et une absence d'ovulation. D'autre part, les injections de leptine à des souris normales sous alimentées présentant une baisse des concentrations de LH et de FSH et un allongement de l'intervalle *œstrus-œstrus*, permettent de rétablir des concentrations normales de gonadotropines ainsi qu'une cyclicité normale [56]. L'absence, dans cette expérience, d'effets sur les concentrations d'insuline, d'acides gras libres et d'hydrates de carbone suggère un rôle direct de la leptine au niveau central.

En revanche, chez les femmes obèses et/ou atteintes du SOPK (Syndrome des ovaires polykystiques), l'augmentation du nombre d'adipocytes se traduit par une cascade de changements impliquant des taux de leptine et d'insuline élevés avec augmentation des niveaux de la LH mais pas ceux de la FSH. Dans le SOPK, les ovaires sont hypertrophiés et contiennent des petits kystes, correspondant à des follicules qui ne se sont pas développés et qui n'ont pas ovulé. Le taux élevé de LH est responsable de l'augmentation de la production d'androgènes pouvant causer l'apparition d'acné, de l'embonpoint et de l'hirsutisme. Nos résultats sont comparables à ceux constatés dans le cas d'obésité ou du SOPK avec anovulation et augmentation du taux de LH mais pas celui de la FSH.

Dans une étude réalisée sur des souris, BROTHERS *et al.* [544] ont démontré que chez les patientes obèses et infertiles, l'hypophyse étant hypersensible à l'insuline, le taux de LH est fortement augmenté, et il a été démontré qu'une hypersécrétion de LH et une augmentation du rapport LH/FSH chez ces patientes sont défavorables à la folliculogénèse [545–547]. Ces changements vont stimuler le développement partiel des follicules qui sécrètent des niveaux supranormaux de testostérone, mais qui ovulent rarement de par le faible taux de progestérone [548]. GRODSTEIN *et al.* [549] ont eux aussi démontré une prévalence plus élevée d'infertilité anovulatoire chez les femmes obèses.

- Hormones stéroïdiennes

Les dosages des hormones stéroïdiennes révèlent chez les femelles adultes traitées par la leptine, un taux d'œstradiol similaire à celui des animaux témoins. Une augmentation non significative du taux de progestérone est cependant observée aussi bien chez les femelles immatures que chez les femelles adultes après traitement par la leptine comparées aux témoins.

Le système IGF constitué des IGF-1, IGF-2, leurs récepteurs, leurs protéines de liaison (IGFBPs : *Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins*) et des protéases spécifiques des IGFBPs, intervient dans la croissance folliculaire avant la phase gonadotropines dépendante où les IGFs, en stimulant la production des œstrogènes, amplifient l'action de la FSH sur les cellules de la granulosa [550]. Lors de malnutrition, des diminutions importantes des taux de leptine, d'insuline, d'IGF-1 et d'IGFBP-3 sont observées [551].

La plupart des études qui ont porté sur les effets de la leptine sur la stéroïdogénèse au niveau des cellules de la granulosa ont été réalisées *in vitro* et ont révélé des résultats contradictoires, en rapport avec les doses de leptine utilisées dans les différentes études, allant de 1 à 100 ng / mL. En fonction de la dose administrée, la leptine pourrait moduler l'activité de l'aromatase de manière positive ou négative, en inhibant les effets synergiques de l'IGF-1 et de la FSH sur la production d'œstradiol [375,552–554]. En effet, la leptine inhiberait l'augmentation de la stéroïdogénèse par l'IGF-1 dans la granulosa et les cellules thécales humaines, et les cellules de la granulosa du rat [501,555] par un

mécanisme dépendant de l'AMPK [498,500] comme pour la maturation ovocytaire. Cette inhibition « *dose-dépendante* » par la leptine de la synthèse de l'œstradiol en réponse à la stimulation par la FSH et l'IGF-1 dans des cellules de granulosa cultivées, suggère un rôle paracrine de l'hormone [506,555]. En effet, l'incubation de cellules humaines de la granulosa avec des concentrations de leptine de : 10 et 100 ng / mL inhibe la production d'œstradiol stimulée par la FSH et l'IGF-1 [363]. La leptine supprime par ailleurs l'augmentation d'IGF dans la synthèse de l'androstènedione, stimulée par la LH au niveau des cellules thécales [501].

Même si l'augmentation de la sécrétion de leptine est associée à une augmentation simultanée prolongée des concentrations nocturnes de GH et de l'IGF-1 avant l'installation de la puberté (ce qui correspond au pic nocturne de LH) [370], la leptine peut réguler la production hépatique d'IGF-1 indépendamment de la GH [556]. Dans des cellules de la granulosa humaine cultivées, la leptine agit directement pour inhiber la production (basale ou stimulée par la FSH) d'œstradiol (20 ng / mL et 100 ng / mL de leptine) et de progestérone (20 ng / mL de leptine), alors qu'à la dose de 100 ng / mL, la leptine réduit de manière significative la production de progestérone basale mais pas celle stimulée par la FSH. Ce résultat suggère la possibilité que les taux élevés de leptine circulante chez les sujets obèses puissent compromettre la fertilité par des mécanismes périphériques [557].

Chez les bovins, des études menées *in vitro* rapportent que la leptine inhibe la production des hormones stéroïdiennes par les cellules de la thèque et de la granulosa. En effet, la leptine inhibe la production de progestérone et d'œstradiol (induite par l'insuline par les cellules de la granulosa) et la production de progestérone et d'androstènedione (induite par l'insuline par les cellules thécales), et augmente la prolifération des cellules thécales (induite par l'insuline) [375,500,558].

Alors que chez les bovins la leptine inhiberait la production d'œstradiol, elle semble avoir un effet inverse chez le lapin [559]. Pour la progestérone, des effets bimodaux dose-dépendants ont été démontrés dans les cellules de la granulosa porcines [483].

Chez la brebis, l'immunisation passive contre la leptine entraîne une augmentation aiguë de la sécrétion d'œstradiol ovarien mais est sans effet sur les

concentrations de gonadotropines, l'ovulation ou la fonction lutéale suivante. A l'inverse, la perfusion de l'artère ovarienne avec une faible dose de leptine entraîne une diminution aiguë de la sécrétion d'œstradiol ovarien tandis que la dose élevée, qui induit des concentrations supraphysiologiques de leptine, n'a aucun effet sur la production d'œstradiol. Les deux doses induisent une augmentation des concentrations de progestérone au cours de la phase lutéale ultérieure [560].

Chez l'homme, à concentration sérique physiologique, la leptine stimulerait la stéroïdogénèse dans les cellules de la granulosa et de la thèque [501,561]. Cet effet semble inversé pour une concentration supérieure à 10 ng / mL avec une baisse importante du nombre d'ovulations par un effet direct sur l'ovaire [398]. A concentration supraphysiologique et à une dose donnée, la leptine pourrait ainsi être responsable de l'anovulation en inhibant la production d'œstradiol interférant avec le développement des follicules dominants et la maturation ovocytaire [562].

DUGGAL *et al.* [398], quant à eux, ont montré que l'administration de leptine, bien qu'elle diminue le nombre d'ovulations à la fois *in vivo* et *in vitro* chez la ratte, elle n'influe pas sur les niveaux des stéroïdes. Leur protocole a consisté en l'administration de leptine (30 µg à 3 heures d'intervalles pendant 15h) à des femelles immatures stimulées à l'aide de gonadotropines, ce qui a provoqué une diminution significative des ovulations *in vivo*, de 15.9 ± 2.0 ovocytes chez les femelles témoins à 5.3 ± 1.6 ovocytes dans le groupe traité par la leptine. Les taux plasmatiques de progestérone et d'œstradiol analysés immédiatement avant l'ovulation n'ont montré aucune différence significative chez les femelles traitées. Toujours dans la même étude, le traitement *in vitro* par la leptine en association avec la LH d'ovaires entiers stimulés par la FSH a diminué de manière significative les ovulations de 5.7 ± 1.6 (pour les ovaires traités avec la LH seule) à 1.3 ± 0.6 (pour ceux traités avec la LH + 1 µg / mL de leptine) et là aussi, la progestérone comme œstradiol non pas été affectés par le traitement à la leptine.

Les hormones stéroïdiennes ovariennes pourraient elles aussi affecter les concentrations plasmatiques de leptine par leur action sur le tissu adipeux : l'œstradiol favoriserait la réplique des cellules adipeuses en culture [563] qui

constituent un compartiment endocrinien dynamique et qui sont influencées par l'expression biologique des œstrogènes [564]. Néanmoins, les études concernant les effets des stéroïdes sexuels sur la sécrétion de leptine restent divergentes de par les protocoles très différents utilisés dans les expériences : LIN [565] rapporte que les variations normales du taux d'œstradiol et de progestérone au cours du cycle menstruel de la femme sont sans incidence significative sur le taux de leptine circulante. AJALA *et al.* [566] rapportent quant à eux une augmentation significative des taux sériques de leptine au jour 14 (phase ovulatoire) et au jour 21 (phase lutéale) du cycle menstruel indiquant que l'œstradiol et la progestérone pourraient jouer un rôle important dans la régulation de la libération de la leptine pendant le cycle menstruel normal, résultat en accord avec celui de l'étude menée par HARDIE *et al.* [567] qui rapportent que les niveaux circulants de leptine augmentent pendant la transition de la phase folliculaire à la phase pré-ovulatoire (le pic étant atteint à la phase lutéale, valeurs plus de 1.5 fois supérieures à celles observées dans la phase folliculaire) et coïncident avec l'élévation du taux sérique de progestérone, suggérant un effet stimulant de la progestérone qui pourrait être responsable des fluctuations des taux de leptine durant le cycle menstruel. De même que LUDWIG *et al.* [568] rapportent dans leur étude une variation considérable des niveaux de leptine tout au long du cycle menstruel, avec des niveaux plus élevés dans la phase mie-lutéale plutôt que dans la phase folliculaire. Pour ELBERS *et al.* [569], les œstrogènes stimuleraient la sécrétion de leptine tandis que les androgènes auraient un effet inverse. Pour d'autres auteurs, les œstrogènes et la progestérone n'ont pas d'effet majeur sur la sécrétion de cette adipokine [570–572].

Le 17β -œstradiol augmenterait la synthèse de l'ARNm de la leptine et des protéines dans les adipocytes [573]. Il peut également moduler l'expression d'Ob-R [88], éventuellement à travers un élément putatif sensible aux œstrogènes dans le promoteur du gène Ob-R [574]. Le dérèglement des Ob-R / leptine jouerait un rôle dans le développement d'une grande variété de tumeurs malignes notamment le cancer mammaire en rapport avec les niveaux d'œstradiol [473]. En effet, dans les cellules MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation - 7* : lignée de cellules tumorales mammaires), il a été démontré que la leptine induisait l'expression des

gènes de l'aromatase, augmentant l'activité de cette enzyme et amplifiant la synthèse des œstrogènes [554].

L'augmentation du taux de progestérone constatée dans notre étude suite au traitement par la leptine serait liée à l'augmentation rapide des niveaux de la LH qui :

- inhiberait la CYP17A1 (au niveau des cellules lutéales) [575] stimulée par l'insuline [576] ;
- amplifierait la CYP11A1 et la HSD3B2, par le biais du système Adénylcyclase / AMPc / Protéines kinases, favorisant la production de la progestérone [577].

Dans leur étude, BILBAO *et al.* [578] ont montré que la leptine était capable de réguler l'expression de la protéine HSD3B2 d'une manière dose-dépendante. En effet, le traitement aigu par la leptine (qui inhibe le processus ovulatoire) entraîne une réduction significative de l'expression ovarienne de CYP11A1 sans modification de StAR ou de HSD3B2. En revanche, le traitement quotidien (qui induit le processus ovulatoire) montre une augmentation de l'expression de la protéine HSD3B2 ovarienne, sans différence dans les autres protéines mesurées. Ces chercheurs ont également constaté que la leptine augmentait les protéines CYP11A1 et HSD3B2 à des niveaux physiologiques et inhibait à la fois l'ARNm et la protéine HSD3B2 à des concentrations plus élevées. Les résultats de ces travaux indiquent que la leptine semble exercer ses doubles effets sur la synthèse de la progestérone de manière dose-dépendante.

Outre la progestérone qui bloque la synthèse des œstrogènes, les cellules lutéales sécrètent de l'inhibine qui atténue la sécrétion de la FSH [249] et augmente celle de la LH par la thèque interne du follicule dominant [579] :

- La progestérone constitue un facteur de survie pour le CJ et s'oppose à la lutéolyse chez la ratte [248], la lapine, la chienne, le singe et la femme [580]. La lutéolyse est liée à la réduction de l'activité stéroïde déshydrogénase (HSD3B2) des cellules lutéales et est indépendante des hormones gonadotropes, puisque l'injection pulsatile de GnRH ou de LH au cours de la phase lutéale n'empêche pas la lutéolyse spontanée [244], de même que chez de nombreux mammifères (à l'exception des primates), l'hystérectomie

réalisée pendant la phase lutéale prolonge la durée du CJ. En revanche, si un extrait endométrial est excisé et réinjecté à l'animal, la lutéolyse s'opère grâce à la $\text{PGF}_{2\alpha}$ [224]. Les changements dans l'expression du gène de la leptine signalés au stade lutéal du cycle œstral peuvent être attribués à cette prostaglandine en rapport avec l'élévation de la progestérone [581]. Au niveau du CJ, la leptine régule le processus de lutéolyse en contrôlant la libération de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ et de la progestérone. L'étude menée par ZERANI *et al.* [582] soutient un rôle lutéolytique permissif de la leptine chez le lapin en utilisant la voie JAK pour augmenter la $\text{PGF}_{2\alpha}$, la MAPK et la PDE (*Phospholipase D*) spécifique de l'AMPc pour diminuer la progestérone. Selon ces mêmes chercheurs, l'oviducte pourrait lui aussi être une cible potentielle pour la régulation endocrinienne par la leptine, dont les taux circulants peuvent agir comme un signal métabolique modulant la libération des prostaglandines au niveau des oviductes par la médiation du système NOS / NO. En effet, la leptine et le NO inhibent la libération de la PGE2 mais augmentent celle de la $\text{PGF}_{2\alpha}$. De même que l'inhibiteur de la NOS seul ou avec la leptine augmente la production de la PGE2 et diminue celle de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ [583].

- L'inhibine limiterait de manière autocrine la conversion des androgènes en œstrogènes en agissant sur l'aromatase [584]. Au niveau périphérique, l'augmentation de l'inhibine inhibe la sécrétion de la FSH et ainsi la croissance d'autres follicules. La croissance du follicule dominant en l'absence de FSH est néanmoins possible grâce à l'IGF-1 synthétisé en quantité importante par ce follicule. L'IGF-1 amplifierait l'effet de la FSH [585] et stimulerait l'aromatase des androgènes en œstrogènes [586]. L'œstradiol ainsi produit stimulerait en retour la production d'IGF-1. Ce double rétrocontrôle expliquerait l'augmentation rapide de l'œstradiol dans le follicule dominant mais pas dans les follicules dominés qui ne disposent pas de ce mécanisme compensatoire et sont voués à l'atrésie [587]. L'inhibine est régulée chez les rongeurs par la leptine *in vivo*, et par l'insuline, le lipopolysaccharide (LPS) et la dexaméthasone *in vitro* [588]. Chez la femme, des concentrations élevées de leptine *in vivo* ne sont pas associées à une altération de la sécrétion de l'œstradiol, ni des inhibines A et B pendant la stimulation ovarienne [589].

La leptine stimulerait la libération de la prolactine. *In vitro*, ses actions se produisent en partie grâce à la stimulation de ERK1 / 2 [590]. Les concentrations supraphysiologiques en leptine pourraient renforcer l'effet de la PRL sur les stéroïdes. L'implication de la PRL dans la sécrétion de leptine a été démontrée, et la présence de récepteurs fonctionnels de la prolactine dans le tissu adipeux suggère un rôle important de cette hormone dans la thermorégulation et la balance énergétique. En effet, la PRL potentialise l'effet de l'insuline en augmentant significativement l'expression de la leptine [591]. Dans l'ovaire, la PRL augmente dans le liquide folliculaire au cours de la maturation des follicules puis diminue juste avant l'ovulation. La PRL interviendrait dans la maturation des follicules en inhibant la production d'œstradiol (en inhibant l'activité de l'aromatase stimulée par la FSH). Les effets de la PRL sur la formation et le maintien du CJ sont multiples (*Cf. Chapitre 2*). Chez la ratte, la PRL maintient le taux des récepteurs de la LH et de l'œstradiol dans les cellules de la granulosa. Elle participerait à la croissance du CJ en stimulant la synthèse protéique globale au niveau des cellules lutéales. En effet, la PRL stimule la déphosphorylation du facteur d'élongation 2 (EF2) qui, déphosphorylé, catalyse la translocation des ARN de transfert vers les ribosomes et active le processus d'élongation peptidique. La PRL stimule la production de progestérone en augmentant la synthèse des récepteurs des HDL (*High Density Lipoprotein*) et en stimulant l'activité cholestérol estérase 3 β -ol-déshydrogénase. Par ailleurs, elle inhibe l'expression du gène de la 20 α -HSD (*20 α -hydroxysteroid dehydrogenase*) responsable de la conversion de la progestérone en son dérivé 20 α hydroxylé, inactif chez les mammifères [354].

Enfin, LV *et al.* [592] ont démontré pour la première fois en 2019 que la mélatonine régula positivement le niveau de leptine chez la souris et la truie. Chez la souris, le blocage de la voie de signalisation de la mélatonine *via* l'inhibition de son récepteur MT1 entraîne une réduction du niveau de leptine, une faible sécrétion d'hormones stéroïdiennes et une réduction de la taille de la portée. Un supplément de leptine améliore l'ovulation et rétablit le niveau des hormones stéroïdiennes chez les souris *MT1*^{-/-}. Chez la truie, la suppression de la leptine n'affecte pas la production de mélatonine, mais réduit significativement les taux de FSH, LH et 17 β -œstradiol et augmente le taux de progestérone, de même que le

traitement à la mélatonine augmente la production de leptine chez les truies *Leptine*^{-/-}.

Le rôle de la leptine dans la fonction de la reproduction ne se limiterait pas à l'ovaire puisque les récepteurs Ob-R ont également été mis en évidence au niveau des blastocystes, de l'endomètre, du placenta, du système immunitaire maternel et des tissus fœtaux [593], ainsi qu'au niveau des cellules épithéliales mammaires. Ceci permet de suggérer que cette adipokine pourrait également avoir un rôle physiologique dans l'implantation de l'œuf fécondé [508,594–597], qu'elle serait un modulateur de la fonction endocrinienne placentaire [598–603] et qu'elle interviendrait dans la croissance fœtale intra-utérine [604–607] et néonatale [608] ainsi que dans la lactation [609–613].

CONCLUSION

La leptine injectée à la dose de 8 μg / 100 g de poids corporel quotidiennement pendant une période de 5 jours par voie intrapéritonéale ne semble pas influencer l'évolution du poids corporel et le système reproducteur chez les rats femelles Wistar de 30 jours, en raison probablement de l'absence de synthèse de ses récepteurs au niveau du système étudié. Elle semble néanmoins avoir un effet sur l'apoptose cellulaire à cet âge.

A 60 jours, la leptine interviendrait dans la régulation des poids corporel et ovarien, de la folliculogénèse ovarienne, du processus ovulatoire et de la lutéogénèse par le contrôle de l'hormone lutéinisante (LH), de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de la progestérone. En effet, la leptine provoque une diminution du poids corporel et une accélération de la maturation du follicule au niveau de l'ovaire par diminution du niveau de la FSH et augmentation du taux circulant de LH (et donc par augmentation du rapport LH / FSH) induisant une lutéinisation précoce des cellules de la granulosa avec formation d'un *corps lutéal* n'ayant pas fait suite à une ovulation normale mais ressemblant à un corps jaune et produisant de la progestérone. Elle semble par ailleurs induire une vasodilatation capillaire au niveau du tissu lutéal. La leptine ne semble néanmoins pas avoir d'effet sur les taux circulants d'œstradiol à la dose utilisée.

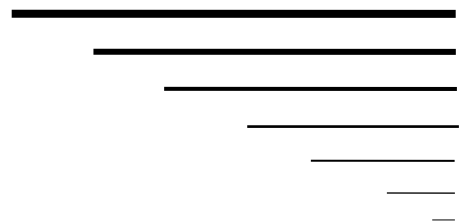
L'ensemble des résultats obtenus par la présente étude montrent que la leptine interviendrait dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien en modulant la stéroïdogénèse ovarienne *in vivo* chez le rat Wistar femelle. A concentration sérique supraphysiologique, elle semble altérer la folliculogénèse, le processus d'ovulation et la lutéogénèse. Ceci suggère que la leptine représenterait un système de régulation alternatif par lequel l'état nutritionnel peut réguler la fonction reproductive femelle. L'expression des récepteurs Ob-R sur les structures ovariennes se produirait probablement entre 30 et 60 jours d'âge.

PERSPECTIVES

Dans la poursuite de ce travail, les applications possibles des résultats obtenus nous ouvrent les perspectives suivantes :

- ✓ Etude histologique des utérus et des vagins ;
- ✓ Localisation par immunohistochimie des récepteurs à la leptine tout au long du système reproducteur, y compris au niveau des cellules germinales ;
- ✓ Etude des paramètres biochimiques : glycémie et insulinémie notamment, et chez les bovins le dosage des β -Hydroxybutyrates (BHB) ;
- ✓ En médecine vétérinaire, les échecs obtenus avec l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire en rapport avec l'infertilité notamment chez la vache laitière sont rapportés et représentent des pertes économiques considérables, l'objectif de chaque éleveur étant d'obtenir un veau par vache et par an. Le dosage de la leptinémie, de la testostéronémie et de la prolactinémie serait par conséquent intéressant chez les femelles présentant une infertilité et ce, en fonction des variations alimentaires et environnementales ;
- ✓ Enfin, le volume de leptine à tester étant calculé en fonction du poids corporel de l'animal, les expérimentations sur les grands animaux restent coûteuses. Une meilleure compréhension du blocage de l'ovulation et de l'altération de la folliculogénèse serait cependant envisageable *in vitro* sur des cultures d'ovocytes.

APPENDICES



APPENDICES

APPENDICE A : Liste des symboles et des abréviations

µg	: Microgramme
µL	: Microlitre
3V	: 3 ^{ème} Ventricule
ACTH	: Adénocorticotrophine ou Hormone corticotrope
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AGMI	: Acides gras monoinsaturés
AGPI	: Acides gras polyinsaturés
AgRP	: Agouti-related peptide
AGS	: Acides gras saturés
AK-STAT	: Janus Kinases-Signal Transducers and Activators of Transcription
AKT1	: serine-threonine protein kinase ; Alias AKT, PKB, PRKB
AMH	: Anti-Mullerian Hormone ; Alias MIS
AMP	: Adénosine monophosphate
AMPc	: Adénosine Monophosphate cyclique ou AMP cyclique
AMPK	: AMP-activated protein kinase
ARC	: Noyau arqué
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
BDNF	: Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE	: Barrière Hémato-Encéphalique
BMP15	: Bone Morphogenetic Protein 15 ; Alias GDF9B
C/EBPα	: CCAAT / Enhancer Binding Protein alpha
C/EBPβ	: CCAAT / enhancer-binding protein beta
CART	: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript

CJ	: Corps jaune
CHU	: Centre Hospitalo-Universitaire
COS-7	: CV-1 in Origin with SV40 genes (COS-7 Fibroblast-like cells)
cpm	: concentration par min
CREB1	: cAMP Responsive Element Binding protein 1; Alias CREB
CRH	: Corticotropin Releasing Hormone; Alias CRF : Corticotropin Releasing Factor
CSF	: Cytostatic Factor
Cx43	: Connexine 43 ou GIA1 (Gap junction alpha-1 protein)
CYP11A1	: Cytochrome P450, Family 11, Subfamily A, Polypeptide 1; Alias P450scc (side chain cleaving)
CYP17A1	: Cytochrome P450, Family 17, Subfamily A, Polypeptide 1; Alias P450C17, P450 17 α -hydroxylase, 17,20-lyase, 17,20 desmolase
CYP19A1	: Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1; Alias Aromatase, P450Aro
<i>db/db</i>	: Souris diabétique présentant un défaut dans le gène <i>db</i> codant pour le récepteur de la leptine
DMH	: Dorsomedial hypothalamic nucleus : Noyau dorso-médian
E	: Groupe ou femelle expérimental(e) traité(e) par la leptine
E2	: Œstradiol
eCG	: equine Chorionic Gonadotropin
EGF	: Epidermal Growth Factor
ERK	: Extracellular-Regulated Kinase
ESM	: Erreur Standard à la Moyenne ou SEM : Standard Error of the Mean
ESTR-US-CT	: Trousse pour le dosage du 17 β -œstradiol
<i>fa/fa</i>	: Rat Zucker obèse (<i>fat</i>) présentant une déficience dans la transduction du signal de la leptine
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FSH	: Folliculo-Stimulating Hormone
g	: Gramme
GABA	: Acide γ -aminobutyrique

GALP	: Galanine-like peptide
G-CSF	: Granulocyte Colony Stimulating Factor
GDF9	: Growth Differentiation Factor 9
Gène db	: code pour le récepteur à la leptine
Gène ob	: code pour la leptine
GH	: Growth Hormone ou Hormone de Croissance
GHIH	: Growth Hormone Inhibiting Hormone ; Alias SRIF (Somatotropin release inhibiting Factor ou somatostatine)
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone ou LH-RH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone
GPR3	: G Protein-coupled Receptor
hCG	: human Chorionic Gonadotropin
HDL	: High Density Lipoprotein
hGH	: human Growth Hormone
HSD3B2	: hydro-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta isomerase 2 ; Alias HSDB3, 3 β -HSD
IGF	: Insuline-like Growth Factor
IGFBP	: Insulin-like Growth Factor-Binding Protein
IL	: Interleukine
IMC	: Indice de Masse Corporelle
IRMA	: Dosage radioimmunométrique
IRS	: Insulin-Receptor Substrate
JAK	: Janus kinases
kb	: kilobase
kDa	: kilodalton
LCS	: Liquide Cérébro-Spinal ou LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LH	: Luteinizing hormone
LHA	: Lateral hypothalamic area : Aire hypophysalaire latérale
LHCGR	: luteinizing hormone / choriogonadotropin receptor ; Alias LHR
LIF	: Leukemia Inhibitory Factor
M	: Mole
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MBH	: Partie médiobasale de l'hypothalamus

ME	: Eminence médiane
mL	: Millilitre
MMP	: Matrix metalloproteinase : Métalloprotéases matricielles
MPF	: Maturation-phase Promoting Factor
MPGF	: Male Pronucleus Growth Factor
ng	: nanogramme
NK-SAPK	: NH2-terminal c-jun Kinase /S tress-Activated Protein Kinase
nmol	: Nanomole
NO	: Monoxyde d'azote
NOS	: Monoxyde d'azote Synthase
NPY	: Neuropeptide Y
NR5A2	: Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member; Alias CYP7A Promoter-Binding Factor ; LRH-1
NS	: Différence non significative
<i>ob/ob</i>	: Souris obèse présentant une mutation du gène codant pour la leptine
Ob	: Protéine Ob : Leptine
Ob-R	: Récepteur de la leptine
OMI	: Oocyte Meiosis Inhibitors
P4	: Progestérone
PAF	: Platelet Activating Factor
PC	: Poids corporel
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
pg	: Picogramme
PG	: Prostaglandine
PDE3	: Phosphodiesterase 3
PI3K	: Phosphoinositide 3-Kinase, PI 3-kinase ou PI(3)K
PKA	: Protein Kinase A
PLC	: Phospholipase C
pmol	: Picomole
POMC	: Proopiomélanocortine
PPARg	: Récepteurs d'activateurs de la prolifération des peroxysomes
PRKAC	: Protein Kinase, cAMP-dependent ; Alias PKA

PRL	: Prolactine
PTGS2	: Prostaglandine-endoperoxyde synthase 2 ; Alias Cyclooxygénase 2 ou COX-2
PTP1B	: Protein tyrosine phosphatase 1B
RIA	: Dosage radioimmunologique
ROS	: Reactive Oxygen Species
rpm	: rotation per min
RT-PCR	: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SERPINE1	: Serpin Family E Member 1
SH2	: Src Homology region 2
SHAP	: Serum derived Hyaluronic Acid binding Protein ou ITI : Inter-alpha-Trypsin Inibitor
SHBG	: Sex Hormone-Binding Globulin
SHP2	: Alias PTPN11 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11)
SNC	: Système Nerveux Central
SOCS-3	: Suppressor of cytokine signaling 3; Alias SCOS3
SOPK	: Polycystic Ovary Syndrome : Syndrome des ovaires polykystiques
SP1	: Sp1 transcription factor
StAR	: Steroidogenic acute regulatory protein
STAT	: Signal Transducer and Activators of Transcription
T	: Groupe ou femelle témoin
TGF- β	: Transforming growth factor beta
TIMP1	: Metalloproteinase inhibitor 1 precursor
TIMP2	: Metalloproteinase inhibitor 2 precursor
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TSH	: Thyroid-stimulating hormone
UI	: Unité internationale
VEGF	: Vacular Endothelial Growth Factor
VMH	: Noyau ventro-médian
α MSH	: alpha-melanocyte-stimulating hormone

APPENDICE B : Coloration au MGG

May Grünwald

- Poudre de May Grünwald 5 g
- Méthanol qsp 1 000 mL

Tampon

- Hydrogénophosphate de Na⁺ 15 g
- Déhydrogénophosphate de K⁺ 5 g
- Eau neutre = Eau tamponnée = Eau distillée qsp 5 000 mL

Giemsa (solution mère à diluer)

- Colorant de Giemsa en poudre 0.75 g
- Méthanol (CH₃OH) 65 mL
- Glycérine 65 mL

APPENDICE C : Coloration a l'Hémalun Eosine (Fiche technique)

Hématoxyline de GROAT (Préparation à froid)

Solution 1

- Acide sulfurique concentré 0.8 mL
- Alun de fer 1 g
- Eau distillée 50 mL

Solution 2

- Hématoxyline 0.5 g
- Ethanol à 95° 50 mL

Mélanger les deux solutions, laisser reposer pendant une heure puis filtrer.

Se conserve pendant 3 mois.

Eosine (à 1%)

- Eosine 1 g
- Eau distillée 100 mL

APPENDICE D : Coloration topographique au Trichrome de Masson (Fiche technique)

Hématoxyline de GROAT (Cf. APPENDICE C)

Fuchsine acide-Ponceau (Préparation à froid)

- Fuchsine acide 0.1 g
- Ponceau 0.2 g
- Eau distillée 300 mL

Après dissolution, ajouter :

- Acide acétique 0.6 mL

Conservation illimitée

Orange G-molybdique (Préparation à froid)

- Orange G 2 g
- Eau distillée 100 mL
- Acide phosphomolybdique 1 g

Conservation illimitée

Vert lumière acétique (Préparation à froid)

- Vert lumière 0.1 g
- Eau distillée 100 mL
- Acide acétique 2 mL

Conservation illimitée

APPENDICE E : Matériel nécessaire au dosage non fourni avec les trousse

LH IRMA KIT / FSH IRMA KIT

- Une micropipette de précision (100 μ L)
- Des pipettes semi-automatiques (50 μ L, 2 mL)
- Un mélangeur de type vortex
- Un agitateur à mouvement de va et vient horizontal.
- Un système d'aspiration
- Un compteur gamma calibré pour l'iode 125

ESTR-US-CT

- Micropipettes de précision ou matériel similaire à embouts jetables permettant la distribution de 100 μ L, 200 μ L, 250 μ L et 2 mL
- Distributeur de 1 mL (lavage)
- Eau distillée
- Diluant pour dilution d'échantillons ayant un taux élevé d'œstradiol : réf : 1DIL-ESTR-US (flacon de 2 mL) ou 5DIL-ESTR-US (5 flacons de 2 mL)
- Mélangeur de type Vortex
- Bain-marie (37°C)
- Papier absorbant
- Parafilm (en option)
- Tubes jetables
- Scintillateur gamma réglé pour la mesure de l'iode 125

RIA PROGESTERONE

- Une micropipette de précision (50 μ L)
- Des pipettes semi-automatiques (500 μ L)
- Un mélangeur de type vortex
- Un agitateur à mouvement de va et vient horizontal
- Un système d'aspiration
- Un compteur gamma calibré pour l'iode 125

APPENDICE F : Matériel et réactifs fournis avec les trousse

LH IRMA KIT et FSH IRMA KIT

Éléments fournis	LH IRMA	FSH IRMA
 Tubes revêtus d'anticorps anti-LH / FSH	2 X 50 tubes (prêts à l'emploi)	2 X 50 tubes (prêts à l'emploi)
 Anticorps monoclonal anti-LH / FSH marqué à l'iode 125	1 flacon de 5.5 mL (prêts à l'emploi) Le flacon contient 370 kBq, en début de lot, d'immunoglobulines marquées sous forme liquide avec de l'albumine bovine, de l'azide de sodium (<0.1%) et un colorant.	1 flacon de 5.5 mL (prêts à l'emploi) Le flacon contient 370 kBq, en début de lot, d'immunoglobulines marquées sous forme liquide avec des protéines, de l'azide de sodium (<0.1%) et un colorant.
 Calibrateurs	6 flacons (lyophilisés) Les flacons de calibrateurs constituent entre 0 à environ 180 UI/ L de LH dans le sérum de cheval en présence d'azide de sodium (< 0.1%). Les calibrateurs ont été calibrés par rapport au standard international WHO 2nd IS 80/552.	6 flacons de 1 mL (prêts à l'emploi) Les flacons de calibrateurs contiennent entre 0 à environ 180 UI/L de FSH d'origine humaine dans du sérum humain. Les calibrateurs ont été calibrés par rapport au standard international WHO 94/632.
 Sérum de contrôle	1 flacon (lyophilisé) Le flacon contient de la LH humaine lyophilisée dans un sérum humain.	2 flacons (lyophilisés) Le flacon contient de la FSH lyophilisée dans du sérum humain avec de l'azide de sodium (<0,1%).
 Solution de lavage (20 X)	2 flacons de 50 mL	1 flacon de 50 mL Solution concentrée, à diluer avant usage.

kBq : kilobecquerel.

ESTR-US-CT

Éléments fournis	Œstradiol
Tubes revêtus d'anticorps anti-œstradiol	2 X 50 tubes (prêts à l'emploi)
Traceur œstradiol marqué à l'iode 125	1 flacon de 6 mL (solution concentrée) ŒSTRADIOL marquée à l'iode 125, tampon, colorant, et conservateur ≤85 kBq (≤2,3μCi)
Calibrateur 0	1 flacon de 2 mL (prêt à l'emploi) Sérum bovin, conservateur et azoture de sodium
Calibrateurs 1 à 5	5 flacons de 2 mL (prêts à l'emploi) ŒSTRADIOL, sérum humain, conservateur et azoture de sodium 10 - 25 - 100 - 500 et 2000 pmol/L (*)
Tampon	1 flacon de 45 mL (prêt à l'emploi) Tampon et conservateur A utiliser pour dilution du traceur et tampon d'incubation
Solution de lavage	1 flacon de 10 mL (Solution concentrée) Eau distillée, détergent
Sachet plastique	1

* : Les calibrateurs ont été étalonnés par rapport à une gamme de calibrateurs étalons préparés en interne par gravimétrie. Les valeurs indiquées ci-dessus sont les valeurs cibles. Les valeurs réelles sont indiquées sur les étiquettes. La traçabilité des calibrateurs est réalisée par rapport à la méthode de référence qui est la spectrométrie de masse par dilution isotopique (IDMS).

kBq : kilobecquerel.

RIA PROGESTERONE

Éléments fournis	Progestérone
Tubes revêtus d'anticorps anti-progestérone	2 X 50 tubes (prêts à l'emploi)
Traceur progestérone marqué à l'iode 125	1 flacon de 55 mL (prêt à l'emploi) Le flacon contient 185 kBq, en début de lot, de progestérone marquée sous forme liquide en tampon avec des protéines et de l'azide de sodium (<0.1%) et un colorant.
Calibrateurs	6 flacons de 0.5 mL (lyophilisés) Les flacons de calibrateurs liquides contiennent des concentrations de progestérone permettant d'établir une gamme d'étalonnage de 0 à environ 50 ng/mL. Les calibrateurs sont fabriqués dans du sérum humain, en présence d'azide de sodium (<0.1%). Les calibrateurs ont été calibrés par rapport à la solution de référence BCR 347.
Sérum de contrôle	1 flacon de 0.5 mL (prêt à l'emploi) Le sérum de contrôle contient de la progestérone dans du sérum humain et de l'azide de sodium (<0.1%).

kBq : kilobecquerel.

APPENDICE G : Poids corporel et quantité d'aliment consommé par les femelles T et E âgées de 30 jours pendant la période d'essai

Identité de l'animal	Poids corporel (g)					Aliment consommé (g)				
	J1	J2	J3	J4	J5	J1	J2	J3	J4	J5
30 / T1	45	50	54	57	65	9	8	10	11	14
30 / T2	39	44	46	48	46	7	7	7	9	7
30 / T3	35	37	40	41	44	5	8	5	5	6
30 / T5	50	56	58	61	65	7	6	9	9	10
30 / T6	60	68	73	77	80	8	11	12	13	13
30 / T7	54	58	61	66	70	9	8	10	11	10
30 / T8	51	53	55	58	64	8,5	8	8	10	10
30 / T9	72	74	78	85	90	10,5	11	11	13	13
30 / T10	53	57	61	65	68	9	9	9	9	12
30 / T11	50	55	58	62	66	9	10	8	7	12
30 / T12	77	80	83	88	85	9	12	11	11	10
30 / T13	81	82	87	90	95	11	10	12	12	12
Moyenne (30 / T)	55,58	59,50	62,83	66,50	69,83	8,63	9,00	9,33	10,00	10,75
ESM	4,17	4,02	4,19	4,50	4,53	0,47	0,52	0,61	0,69	0,70
30 / E1	46	51	56	61	64	7,5	8	9	10	9
30 / E2	39	44	48	48	55	7,5	6	8	8	9
30 / E3	37	40	44	47	53	5,5	7	7	6	9
30 / E5	33	38	41	44	47	5,5	8	7	7	8
30 / E6	52	57	61	66	71	8	9	9	12	11
30 / E7	63	65	68	71	73	8	8	11	12	10
30 / E8	55	58	62	66	69	8,5	8	10	11	10
30 / E9	74	78	82	87	83	12,50	12	11	13	9
30 / E10	54	55	58	59,	65	9	8	8	8	10
30 / E11	52	57	61	55	67	9,5	9	9,	7	12
30 / E12	78	82	88	93	98	12	11	11	14	13
30 / E13	82	77	89	95	100	10	9	11	12	13
Moyenne (30 / E)	55,42	58,50	63,17	66,00	70,42	8,63	8,58	9,25	10,00	10,25
ESM	4,64	4,23	4,64	5,08	4,75	0,63	0,47	0,45	0,78	0,48

APPENDICE G' : Poids corporel et quantité d'aliment consommé par les
femelles T et E âgées de 60 jours pendant la période d'essai

Identité de l'animal	Poids corporel (g)					Aliment consommé (g)				
	J1	J2	J3	J4	J5	J1	J2	J3	J4	J5
60 / T1	151	157	150	158	157	18	18	13	20	15
60 / T2	140	136	141	146	150	15	12	17	19	21
60 / T3	151	153	149	157	159	14	16	12	16	15
60 / T4	151	155	162	162	163	18	18	18	19	18
60 / T6	159	164	161	165	164	18	21	16	19	19
60 / T7	142	146	150	151	155	17	14	18	16	17
60 / T10	153	146	149	154	135	16,5	15	16	14	8
60 / T11	167	164	168	166	167	17	15	17	16	18
60 / T12	144	167	164	166	170	11,5	20	16	16	16
Moyenne (60 / T)	150,89	154,22	154,89	158,33	157,78	16,11	16,56	15,89	17,22	16,33
ESM	2,83	3,40	3,01	2,36	3,51	0,74	0,97	0,70	0,68	1,22
60 / E1	126	126	122	126	127	14	15	11	12	15
60 / E2	140	140	141	141	142	15	15	16	16	16
60 / E4	160	158	159	159	162	15	16	16	17	16
60 / E5	157	160	159	160	159	18	19	15	18	14
60 / E6	160	161	160	161	155	19,5	16	15	16	15
60 / E7	149	151	153	156	150	16,5	15	15	15	14
60 / E10	156	152	153	156	158	14	12	14	15	14
60 / E12	156	154	152	153	151	15	14	15	14	14
Moyenne (60 / E)	150,50	150,25	149,88	151,50	150,50	15,88	15,25	14,63	15,38	14,75
ESM	4,22	4,19	4,53	4,27	4,02	0,70	0,70	0,56	0,65	0,31

APPENDICE H : Poids absolus et relatifs des ovaires des femelles T et E
âgées de 30 jours

Identité de l'animal	PC (g) à J6	Poids Absolu (g)			Poids Relatif (g / 100 g de PC)		
		OD	OG	OD + OG	OD	OG	OD + OG
30 / T1	59	0,0369	0,0418	0,0787	0,0625	0,0708	0,1334
30 / T2	45	0,0255	0,0242	0,0497	0,0567	0,0538	0,1104
30 / T3	36	0,0126	0,0165	0,0291	0,0350	0,0458	0,0808
30 / T5	58	0,0433	0,0341	0,0774	0,0747	0,0588	0,1334
30 / T6	78	0,0441	0,0391	0,0832	0,0565	0,0501	0,1067
30 / T7	65	0,0355	0,0476	0,0831	0,0546	0,0732	0,1278
30 / T8	53	0,0266	0,0329	0,0595	0,0502	0,0621	0,1123
30 / T9	75	0,0387	0,0362	0,0749	0,0516	0,0483	0,0999
30 / T10	58	0,0262	0,0284	0,0546	0,0452	0,0490	0,0941
30 / T11	57	0,0243	0,0238	0,0481	0,0426	0,0418	0,0844
30 / T12	78	0,0344	0,0440	0,0784	0,0441	0,0564	0,1005
30 / T13	82	0,0545	0,0448	0,0993	0,0665	0,0546	0,1211
Moyenne (T / 30)	62,00	0,0336	0,0345	0,0680	0,0533	0,0554	0,1087
ESM	4,08	0,0032	0,0028	0,0057	0,0032	0,0028	0,0051
30 / E1	51	0,0236	0,0296	0,0532	0,0463	0,0580	0,1043
30 / E2	43	0,0202	0,0229	0,0431	0,0470	0,0533	0,1002
30 / E3	43	0,0206	0,0236	0,0442	0,0479	0,0549	0,1028
30 / E4	40	0,0192	0,0211	0,0403	0,0480	0,0528	0,1008
31 / E5	64	0,0528	0,0356	0,0884	0,0825	0,0556	0,1381
32 / E6	70	0,0444	0,0392	0,0836	0,0634	0,0560	0,1194
32 / E7	63	0,0583	0,0465	0,1048	0,0925	0,0738	0,1663
30 / E9	83	0,0526	0,0604	0,1130	0,0634	0,0728	0,1361
30 / E10	54	0,0237	0,0269	0,0506	0,0439	0,0498	0,0937
30 / E11	56	0,0355	0,0273	0,0628	0,0634	0,0488	0,1121
30 / E12	84	0,0570	0,0590	0,1160	0,0679	0,0702	0,1381
30 / E13	85	0,0391	0,0410	0,0801	0,0460	0,0482	0,0942
Moyenne (E / 30)	61,33	0,0373	0,0361	0,0733	0,0593	0,0578	0,1172
ESM	4,72	0,0045	0,0039	0,0081	0,0046	0,0027	0,0066
p	-	0,510	0,736	0,596	0,296	0,530	0,322

PC : Poids Corporel ; OD : Ovaire droit ; OG : Ovaire gauche.

APPENDICE H' : Poids absolus et relatifs des ovaires des femelles T et E
âgées de 60 jours

Identité de l'animal	PC (g) à J6	Poids Absolus (g)			Poids Relatifs (g / 100 g de PC)		
		OD	OG	OD+OG	OD	OG	OD + OG
60 / T1	138	0,1401	0,2022	0,3423	0,1015	0,1465	0,2480
60 / T2	135	0,1603	0,2279	0,3882	0,1187	0,1688	0,2876
60 / T3	150	0,2018	0,2025	0,4043	0,1345	0,1350	0,2695
60 / T4	147	0,1892	0,1652	0,3544	0,1287	0,1124	0,2411
60 / T6	153	0,2966	0,3075	0,6041	0,1939	0,2010	0,3948
60 / T7	141	0,1641	0,2318	0,3959	0,1164	0,1644	0,2808
60 / T10	122	0,0700	0,0686	0,1386	0,0574	0,0562	0,1136
60 / T11	153	0,2648	0,1786	0,4434	0,1731	0,1167	0,2898
60 / T12	160	0,1510	0,1286	0,2796	0,0944	0,0804	0,1748
Moyenne (60 / T)	144,33	0,1820	0,1903	0,3723	0,1243	0,1313	0,2556
ESM	3,86	0,0225	0,0225	0,0417	0,0136	0,0151	0,0262
60 / E1	114	0,0944	0,1360	0,2304	0,0828	0,1193	0,2021
60 / E2	133	0,1713	0,1621	0,3334	0,1288	0,1219	0,2507
60 / E4	146	0,1318	0,1512	0,2830	0,0903	0,1036	0,1938
60 / E5	148	0,1780	0,1270	0,3050	0,1203	0,0858	0,2061
60 / E6	142	0,3954	0,3122	0,7076	0,2785	0,2199	0,4983
60 / E7	138	0,1426	0,1554	0,2980	0,1033	0,1126	0,2159
60 / E10	143	0,1199	0,1413	0,2612	0,0838	0,0988	0,1827
60 / E12	139	0,3331	0,2854	0,6185	0,2396	0,2053	0,4450
Moyenne (60 / E)	137,88	0,1958	0,1838	0,3796	0,1409	0,1334	0,2743
ESM	3,80	0,0384	0,0255	0,0633	0,0267	0,0178	0,0439
p	-	0,762	0,851	0,925	0,590	0,929	0,720

PC : Poids Corporel ; OD : Ovaire droit ; OG : Ovaire gauche.

APPENDICE I : Résultats du frottis vaginal et stade œstral juste avant le sacrifice des femelles T et E âgées de 60 jours

Identité de l'animal	Cellules nucléées	Cellules kératinisées	Leucocytes	Stade œstral
60 / T1	+	+	+++	<i>Metœstrus</i>
60 / T2	++		+	Début du <i>proœstrus</i>
60 / T3	+	+++		Début de l' <i>œstrus</i>
60 / T4	+	+++		Début de l' <i>œstrus</i>
60 / T5	++	+	+	<i>Metœstrus</i>
60 / T6			+++	<i>Dicœstrus</i>
60 / T7	+++	+		<i>Proœstrus</i>
60 / T10		++		<i>Œstrus</i>
60 / T11	+++	+		<i>Proœstrus</i>
60 / T12	+		+++	Fin du <i>dicœstrus</i>
60 / E1	+		+++	Fin du <i>dicœstrus</i>
60 / E2	+		++	<i>Dicœstrus</i>
60 / E3	+	+	++	<i>Dicœstrus</i>
60 / E4	+++	+		<i>Proœstrus</i>
60 / E5	++		+	Début du <i>proœstrus</i>
60 / E6	++	+	++	<i>Metœstrus</i>
60 / E7		++	+++	Fin du <i>proœstrus</i>
60 / E10			+	<i>Metœstrus</i>
60 / E11	++		++	Fin du <i>dicœstrus</i>
60 / E12	+		+++	Fin du <i>dicœstrus</i>

APPENDICE J : Nombre de follicules (normaux et atrétiques) par stade folliculaire et nombre de CJ par femelle T et E sur les ovaires de 30 jours

Identité de l'animal	Follicules Normaux (Ovaires de 30 jours)								
	Follicules Primordiaux	Follicules Primaires	Follicules Secondaires	Follicules Tertiaires	Follicules Pré-ovulatoires	Follicules PO	Total Pré-antraux Normaux	Total Antraux Normaux	Total Follicules Normaux
30 / T1	86	2	7	7	0	0	95	7	102
30 / T2	38	5	2	2	0	0	45	2	47
30 / T3	20	3	6	2	0	0	29	2	31
30 / T4	4	3	2	15	0	0	9	15	24
30 / T8	26	6	6	7	0	0	38	7	45
30 / T9	4	0	1	3	0	0	5	3	8
30 / T10	17	7	7	3	0	0	31	3	34
30 / T11	6	4	5	3	0	0	15	3	18
30 / T12	6	3	0	12	0	0	9	12	21
30 / T13	40	7	1	1	0	0	48	1	49
Total (30 / T)	247	40	37	55	0	0	324	55	379
Moyenne (30 / T)	24,70	4,00	3,70	5,50	0,00	0,00	32,40	5,50	37,90
ESM	8,03	0,71	0,87	1,49	0,00	0,00	8,51	1,49	8,30
30 / E1	7	5	10	5	0	0	22	5	27
30 / E2	25	2	2	4	0	0	29	4	33
30 / E3	8	3	5	3	0	0	16	3	19
30 / E4	26	7	1	3	0	0	34	3	37
30 / E8	27	3	3	5	0	0	33	5	38
30 / E9	18	2	6	10	0	0	26	10	36
30 / E10	4	1	1	2	0	0	6	2	8
30 / E11	19	0	6	3	0	0	25	3	28
30 / E12	41	2	4	7	0	0	47	7	54
30 / E13	21	4	3	1	0	0	28	1	29
Total (30 / E)	196	29	41	43	0	0	266	43	309
Moyenne (30 / E)	19,60	2,90	4,10	4,30	0,00	0,00	26,60	4,30	30,90
ESM	3,53	0,64	0,87	0,83	0,00	0,00	3,46	0,83	3,87
p	0,572	0,267	0,750	0,494	-	-	0,540	0,494	0,458



(Suite)	Follicules Atrétiques (Ovaires de 30 jours)										Total Follicules	Total CJ
	Identité de l'animal	Follicules Primordiaux	Follicules Primaires	Follicules Secondaires	Follicules Tertiaires	Follicules Pré-ovulatoires	Follicules PO	Stade Follicules PO	Total Pré-antraux Atrétiques	Total Antraux Atrétiques		
30 / T1	0	0	1	17	3	2	Secondaire	3	20	23	125	0
30 / T2	0	0	0	13	3	1	Antral	0	17	17	64	0
30 / T3	0	0	0	15	3	1	Secondaire	1	18	19	50	0
30 / T4	0	0	0	30	6	0	-	0	36	36	60	0
30 / T8	0	0	1	19	7	3	Antral	1	29	30	75	0
30 / T9	0	0	0	6	1	1	Antral	0	8	8	16	0
30 / T10	0	0	1	19	1	0	-	1	20	21	55	0
30 / T11	0	0	0	12	3	1	Antral	0	16	16	34	0
30 / T12	0	0	1	3	5	1	Antral	1	9	10	31	0
30 / T13	0	0	4	8	3	1	Antral	4	12	16	65	0
Total (30 / T)	0	0	8	142	35	11	-	11	185	196	575	0
Moyenne (30 / T)	0	0,00	0,80	14,20	3,50	1,10	-	1,10	18,50	19,60	57,50	0,00
ESM	0,00	0,00	0,39	2,45	0,62	0,28	-	0,43	2,73	2,69	9,43	0,00
30 / E1	0	0	1	31	6	0	-	1	37	38	65	0
30 / E2	0	0	0	12	7	1	Antral	0	20	20	53	0
30 / E3	0	0	0	37	8	0	-	0	45	45	64	0
30 / E4	0	0	0	11	4	0	-	0	15	15	52	0
30 / E8	0	0	0	15	6	1	Antral	0	22	22	60	0
30 / E9	0	0	0	19	4	1	Antral	0	24	24	60	0
30 / E10	0	0	0	10	3	1	Antral	0	14	14	22	0
30 / E11	0	0	10	15	4	0	-	10	19	29	57	0
30 / E12	0	0	0	35	10	1	Antral	0	46	46	100	5
30 / E13	0	0	1	12	10	0	-	1	22	23	52	0
Total (30 / E)	0	0	12	197	62	5	-	12	264	276	585	5
Moyenne (30 / E)	0,00	0,00	1,20	19,70	6,20	0,50	-	1,20	26,40	27,60	58,50	0,50
ESM	0,00	0,00	0,99	3,32	0,80	0,17	-	0,99	3,75	3,68	6,01	0,50
<i>p</i>	-	-	0,713	0,201	0,016 *	0,083 *	-	0,928	0,108	0,098	0,930	0,343

PO : Follicule polyovocytaire

APPENDICE J' : Nombre de follicules (normaux et atrétiques) par stade folliculaire et nombre de CJ par femelle T et E sur les ovaires de 60 jours

Identité de l'animal	Follicules Normaux (Ovaires de 60 jours)								
	Follicules Primordiaux	Follicules Primaires	Follicules Secondaires	Follicules Tertiaires	Follicules Pré-ovulatoires	Follicules PO	Total Pré-antraux Normaux	Total antraux Normaux	Total Follicules Normaux
60 / T1	6	5	2	1	0	0	13	1	14
60 / T2	2	6	7	6	0	0	15	6	21
60 / T3	15	1	3	2	0	0	19	2	21
60 / T4	6	1	7	2	0	0	14	2	16
60 / T5	0	0	4	0	0	0	4	0	4
60 / T6	0	1	3	4	0	0	4	4	8
60 / T7	53	12	6	5	0	0	71	5	76
60 / T10	0	2	2	3	0	0	4	3	7
60 / T11	21	4	4	0	0	0	29	0	29
60 / T12	10	0	3	0	0	0	13	0	13
Total (60 / T)	113	32	41	23	0	0	186	23	209
Moyenne (60 / T)	11,30	3,20	4,10	2,30	0,00	0,00	18,60	2,30	20,90
ESM	5,14	1,18	0,60	0,68	0,00	0,00	6,32	0,68	6,57
60 / E1	0	3	9	2	0	0	12	2	14
60 / E2	11	6	6	0	1	0	23	1	24
60 / E3	45	2	2	1	1	0	49	2	51
60 / E4	4	6	11	7	0	0	21	7	28
60 / E5	0	2	10	2	0	0	12	2	14
60 / E6	31	6	8	2	0	0	45	2	47
60 / E7	3	3	4	6	0	0	10	6	16
60 / E10	26	2	2	4	0	0	30	4	34
60 / E11	18	3	1	0	0	0	22	0	22
60 / E12	47	8	8	3	0	0	63	3	66
Total (60 / E)	185	41	61	27	2	0	287	29	316
Moyenne (60 / E)	18,50	4,10	6,10	2,70	0,20	0,00	28,70	2,90	31,60
ESM	5,69	0,69	1,15	0,75	0,13	0,00	5,68	0,69	5,61
p	0,360	0,521	0,146	0,697	0,168	-	0,250	0,545	0,232



(Suite)

Identité de l'animal	Follicules Atrétiques (Ovaires de 60 jours)										Total Follicules	Total CJ
	Follicules Primordiaux	Follicules Primaires	Follicules Secondaires	Follicules Tertiaires	Follicules Pré-ovulatoires	Follicules PO	Stade Follicules PO	Total Pré-antraux Atrétiques	Total antraux Atrétiques	Total Follicules Atrétiques		
60 / T1	0	0	0	13	2	0	-	0	15	15	29	3
60 / T2	0	0	0	7	2	0	-	0	9	9	30	6
60 / T3	0	0	0	17	0	1	Antral	0	18	18	39	5
60 / T4	0	0	0	9	0	0	-	0	9	9	25	4
60 / T5	0	0	1	18	1	0	-	1	19	20	24	5
60 / T6	0	0	0	12	2	0	-	0	14	14	22	3
60 / T7	0	0	0	18	4	0	-	0	22	22	98	3
60 / T8	0	0	0	5	3	0	-	0	8	8	15	12
60 / T9	0	0	0	18	1	0	-	0	19	19	48	3
60 / T10	0	0	0	22	2	0	-	0	24	24	37	15
Total (60 / T)	0	0	1	139	17	1	-	1	157	158	367	59
Moyenne (60 / T)	0,00	0,00	0,10	13,90	1,70	0,10	-	0,10	15,70	15,80	36,70	5,90
ESM	0,00	0,00	0,10	1,77	0,40	0,10	-	0,10	1,79	1,81	7,44	1,33
60 / E1	0	0	0	7	5	0	-	0	12	12	26	7
60 / E2	0	0	0	8	3	0	-	0	11	11	35	3
60 / E3	0	0	1	9	0	0	-	1	9	10	61	4
60 / E4	0	0	1	11	2	0	-	1	13	14	42	6
60 / E5	0	0	0	14	1	0	-	0	15	15	29	3
60 / E6	0	0	1	13	2	0	-	1	15	16	63	9
60 / E7	0	0	0	16	0	0	-	0	16	16	32	4
60 / E8	0	0	0	22	2	0	-	0	24	24	58	6
60 / E9	0	0	0	15	2	2	Antral	0	19	19	41	5
60 / E10	0	0	0	7	4	0	-	0	11	11	77	11
Total (60 / E)	0	0	3	122	21	2	-	3	145	148	464	58
Moyenne (60 / E)	0,00	0,00	0,30	12,20	2,10	0,20	-	0,30	14,50	14,80	46,40	5,80
ESM	0,00	0,00	0,15	1,51	0,50	0,20	-	0,15	1,40	1,36	5,44	0,83
p	-	-	0,290	0,474	0,541	0,662	-	0,290	0,604	0,664	0,308	0,950

PO : Follicule polyovocytaire

APPENDICE K : Valeurs individuelles de la LH plasmatique (en UI/L) chez les femelles témoins et expérimentales de 30 et 60 jours d'âge

Identité de l'animal	LH 30	Identité de l'animal	LH 60
30 / T5	0.368	60 / T2	0.175
30 / T6	0.175	60 / T3	0.213
30 / T7	0,169	60 / T4	0.126
30 / T9	0,170	60 / T5	0.212
30 / T11	0,261	60 / T6	0.146
30 / T12	0,315	60 / T12	0.263
30 / T13	0,272	Moyenne (T / 60)	0.189
Moyenne (T / 30)	0,247	ESM	0.020
ESM	0,030	60 / E1	0.291
30 / E2	0,397	60 / E4	0.340
30 / E4	0.382	60 / E5	0.450
30 / E5	0.315	60 / E6	0.347
30 / E9	0.327	60 / E7	0.240
30 / E10	0.223	60 / E11	0.206
30 / E11	0.303	60 / E12	0.233
30 / E13	0.220	Moyenne (E / 60)	0.301
Moyenne (E / 30)	0.310	ESM	0.032
ESM	0.026	<i>p</i>	0.015
<i>p</i>	0.142		

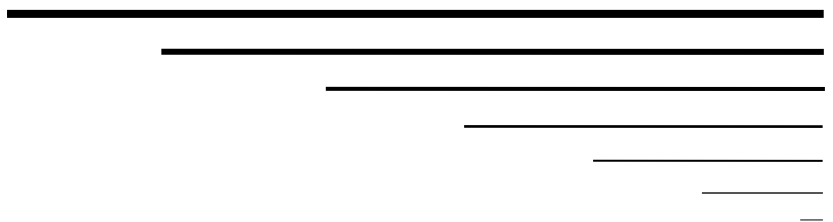
APPENDICE L : Valeurs individuelles de la FSH plasmatique (en UI/L) chez les femelles témoins et expérimentales de 30 et 60 jours d'âge

Identité de l'animal	FSH 30	Identité de l'animal	FSH 60
30 / T8	3.232	60 / T3	3.867
30 / T9	4.192	60 / T6	1.432
30 / T10	4.134	60 / T10	5.432
30 / T11	2.806	60 / T11	4.624
30 / T12	3.936	60 / T12	6.181
30 / T13	5.394	Moyenne (T / 60)	4.307
Moyenne (T / 30)	3.949	ESM	0.817
ESM	0.365	60 / E1	2.438
30 / E1	4.942	60 / E3	3.012
30 / E8	1.896	60 / E6	1.611
30 / E9	5.029	60 / E10	3.348
30 / E10	5.625	60 / E11	2.786
30 / E11	4.222	Moyenne (E / 60)	2.639
30 / E12	2.252	ESM	0.297
Moyenne (E / 30)	3.994	<i>p</i>	0.112
ESM	0.636		
<i>p</i>	0.952		

APPENDICE M : Valeurs individuelles de la progestérone plasmatique (en ng/mL)
chez les femelles témoins et expérimentales de 30 et 60 jours d'âge

Identité de l'animal	P4 / 30 J	Identité de l'animal	P4 / 60 J
30 / T1	16.799	60 / T2	15.030
30 / T3	18.436	60 / T3	39.224
30 / T9	10.242	60 / T5	47.505
30 / T10	10.232	60 / T6	31.309
30 / T11	22.265	60 / T7	13.734
30 / T12	20,346	60 / T8	16.036
30 / T13	32,023	60 / T10	55.980
Moyenne (T / 30)	18,620	60 / T11	38.134
ESM	2,844	60 / T12	43.533
30 / E1	32,660	Moyenne (T / 60)	33.387
30 / E2	18.540	ESM	5.134
30 / E3	11.181	60 / E2	27.195
30 / E9	15.009	60 / E3	56.048
30 / E10	29.677	60 / E5	50.543
30 / E11	38.134	60 / E6	25.997
30 / E12	15.968	60 / E7	34.847
30 / E13	15.701	60 / E10	46.316
Moyenne (E / 30)	22.109	60 / E11	50.259
ESM	3.502	Moyenne (E / 60)	41.601
<i>p</i>	0.453	ESM	4.584
		<i>p</i>	0.253

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mantzoros C., Flier J.S., Lesem M.D., Brewerton T.D. and Jimerson D.C., "Cerebrospinal fluid leptin in anorexia nervosa: correlation with nutritional status and potential role in resistance to weight gain", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 82, n° 4, (1997), 1066 - 1070.
2. Mouffok C., Madani T., Smara L., Baitiche M., Allouche L. and Belkasmi F., "Relationship between body condition score, body weight, some nutritional metabolites changes in blood and reproduction in Algerian Montbeliarde cows", *Veterinary World*, V. 4, n° 10, (2011), 461 - 466.
3. Miroud K., Hadeif A., Khelef D., Ismail S. et Kaidi R., « Bilan de reproduction de la vache laitière dans le nord-est de l'Algérie », *Livestock Research for Rural Development*, V. 26, n° 6, (2014), Article 107.
<http://www.lrrd.org/lrrd26/6/miro26107.htm>, Page consultée le : 02/05/2018
4. Abdelli A., Belabdi I., Souames S. et Iguer-Ouada M., « Facteurs affectant la réussite de la première insémination artificielle dans des exploitations laitières de la région de Tizi-Ouzou, Algérie », *Renc Rech Ruminants*, V. 2, (2015), 215.
5. Kalem A., Hanzen C., Abdelli A. and Kaidi R., "Body condition score, some nutritional parameters in plasma, and subsequent reproductive performance of Montbéliarde cows in Algeria", *Livestock Research for Rural Development*, V. 29, n° 1, (2017).
<http://www.lrrd.org/lrrd29/1/kale29002.htm>, Page consultée le : 02/05/2018
6. Bruneau G., Vaisse C., Caraty A. et Monget P., "La leptine : une clé pour la reproduction". *m/s*, V. 15, n° 2, (1999), 191 - 196.
7. Schwartz M.W., Peskind E., Raskind M., Boyko E.J. and Porte D. Jr., "Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans", *Nat Med*, V. 2, n° 5, (1996a), 589 - 593.
8. Basdevant A. et Guy-Grand B., « Traité de Médecine de l'Obésité ». Flammarion Médecine Sciences, Paris, (2004), 431 p.
9. WHO: World Health Organization, "Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity", Geneva, (3 - 5 June 1997) (WHO/NUT/NCD/98.1), 276p.

<http://www.who.int/iris/handle/10665/63854>, Page consultée le : 02/05/2018

10. Frisch R.E. and McArthur J.W., "Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset", *V.185*, n° 4155, (1974), 949 - 951.
11. Masuzaki H., Ogawa Y., Sagawa N., Hosoda K., Matsumoto T., Mise H., Nishimura H., Yoshimasa Y., Tanaka I., Mori T. and Nakao K., "Nonadipose tissue production of leptin : Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans", *Nat Med*, V. 3, n° 9, (1997), 1029 - 1033.
12. Norman R.J. and Clark A.M., "Obesity and reproductive disorders: a review", *Reprod Fertil Dev*, V. 10, n° 1, (1998), 55 - 63.
13. Messinis I.E. and Milingos S.D., "Leptin in human reproduction", *Human Reproduction Update*, V. 5, n° 1, (1999), 52 - 63.
14. Pasquali R. and Gambineri A., "Metabolic effects of obesity on reproduction", *Reproductive Biomedicine Online*, V. 12, n° 5, (2006), 542 - 551.
15. Ingalls A.M., Dickie M.D. and Snell G.D., "Obese, new mutation in the mouse", *J Heredl*, V. 41, n° 12, (1950), 317 - 318.
16. Kennedy G.C., "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat", *Proc R Soc*, V. 140, n° 901, (1953), 578 - 592.
17. Hervey G.R. "The effects of lesions of the hypothalamus in parabiotic rats", *J Physiol*, V. 145, n° 2, (1958), 336 - 352.
18. Hausberger F.X., "Parabiosis and transplantation experiments in hereditary obese mice", *Anat Ret*, V. 130, (1959), 313.
19. Coleman D.L., "Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice", *Diabetologia*, V. 9, n° 4, (1973), 294 - 298.
20. Coleman D.L., "Obese and Diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice", *Diabetologia*, V. 14, n° 3, (1978), 141 - 148.
21. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L. and Friedman J.M., "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue" *Nature*, V. 372, n° 6505, (1994), 425 - 432.
22. Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowia D, Lallone R.L., Burley S.K. and Friedman J.M., "Weight reducing effect of the plasma protein encoded by the obese gene", *Science*, V. 269, n° 5223 (1995), 543 - 546.

23. Pellemounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., Hecht R., Winters D., Boone T. and Collins F., "Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice" *Science*, V. 269, n° 5223, (1995), 540 - 543.
24. Cabanac M. and Richard, D., "The Nature of Ponderostat: Hervey's Hypothesis Revived", *Appetite*, n° 26, (1996), 45 - 54.
25. Tartaglia L.A., "The leptin receptor", *J Biol Chem.*, V. 272, n° 10, (1997), 6093 - 6096.
26. Kawai M., Yamaguchi M., Murakami T., Shima K., Murata Y. and Kishi K., "The placenta is not the main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissues", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 240, n° 3, (1997), 798 - 802.
27. Elmquist J.K., Bjørbaek C., Ahima R.S., Flier J.S. and Saper C.B., "Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain", *J Comp Neurol*, V. 395, n° 4, (1998), 535 - 547.
28. Elmquist J.K., Elias C.F. and Saper CB., "From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight", *Neuron*, V. 22, n° 2, (1999), 221 - 232.
29. Coleman D.L., "A historical perspective on leptin", *Nat Med*, V. 16, n° 10, (2010), 1097 - 1099.
30. MINHLIU. "Leptin: a piece of the obesity pie". SCQ : The Science Creative Quarterly, (August 2004), <https://www.scq.ubc.ca/leptin-a-piece-of-the-obesity-pie/>, Page consultee le : 20/02/2019
31. Isse N., Ogawa Y., Tamura N., Masuzaki H., Mori K., Okasaki T., Satoh N., Shigemoto M., Yoshimasa Y., Nishi S., Hosoda K., Inazawa J. and Nakao K., "Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene", *J Biol Chem*, V. 270, n° 46, (1995), 27728 - 27733.
32. Ogawa Y., Masuzaki H., Isse N., Okazaki T., Mori K., Shigemoto M., Satoh N., Tamura N., Hosoda K. and Yoshimasa Y., "Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (*fa/fa*) rats", *J Clin Inverr*, V. 96, n° 3, (1995), 1647 - 1652.
33. Bado A., Levasseur S., Attoub S., Kermogant S., Laigneau J.P., Bortoluzzi M.N., Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo N., Le Marchand-Brustel Y. and Lewin M.J.M., "The stomach is a source of leptin". *Nature*, V. 394, n° 6695, (1998), 790 - 793.
34. He Y., Chen H., Quon M.J., Reitman M., "The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha", *J Biol Chem*, V. 270, n° 48, (1995), 28887 - 28891.

35. MacDougald O.A., Hwang C.S., Fan H. and Lane M.D., "Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 92, n° 20, (1995), 9034 - 9037.
36. Miller S.G., De Vos P., Guerre-Millo M, Wong K, Hermann T, Staels B, M.R. and Auwerx J. "The adipocyte specific transcription factor C/EBP alpha modulates human ob gene expression", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 93, n° 11, (1996), 5507 - 5511.
37. De Vos P., Lefebvre A.M., Miller S.G., Guerre-Millo M., Wong K., Saladin R., Hamann L.G., Staels B., Briggs M.R. and Auwerx J., "Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma", *J Clin Invest*, V. 98, n° 4, (1996), 1004 - 1009.
38. Zhang B., Graziano M.P., Doebber T.W., Leibowitz M.D., White-Carrington S., Szalkowski D.M., Hey P.J., Wu M., Cullinan C.A., Bailey P., Lollmann B., Frederick R., Flier J.S., Strader C.D. and Smith R.G., "Down-regulation of the expression of the obese gene by an antidiabetic thiazolidinedione in Zucker diabetic fatty rats and db/db mice", *J Biol Chem*, V. 271, n° 16, (1996a), 9455 - 9459.
39. Hollenberg A.N., Susulic V.S., Madura J.P., Zhang B., Moller D.E., Tontonoz P., Sarraf P, Spiegelman BM, Lowell BB., "Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter", *J Biol Chem* V. 272, n° 8 , (1997), 5283 - 5290.
40. Madej T., Boguski M.S. and Bryant S.H., "Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine", *FEBS Lett.*, V. 373, n° 1, (1995), 13 - 18.
41. Zhang F., Basinski M.B., Beals J.M., Briggs S.L., Churgay L.M., Clawson D.K., DiMarchi R.D., Furman T.C., Hale J.E., Hsiung H.M., Schoner, B.E., Smith, D.P., Zhang, X.Y., Wery, J.P. and Schevitz, R.W., "Crystal structure of the obese protein leptin-E100", *Nature*, V. 387, n° 6629, (1997a), 206 - 209.
42. Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P. Soos M.A., Rau H., Wareham N.J., Digby J.E., Mohammed S.N., Hurst J.A., Cheetham C.H., Earley A.R. Barnett A.H., Prins J.B. and O'Rahilly S., "Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans", *Nature*, V. 387, n° 6636, (1997), 903 - 908.
43. Imagawa K., Numata Y., Katsuura G., Sakaguchi I., Morita A., Kikuoka S, Matumoto Y, Tsuji T, Tamaki M, Sasakura K, Teraoka H, Hosoda K, Ogawa Y and Nakao K., "Structure-function studies of human leptin", *J Biol Chem*, V. 273, n° 52, (1998), 35245 - 35249.

44. Maffei M., Fei h., Lee G.H., Dani C., Leroy P., Zhang Y., Proenca R., Negrel R., Ailhaud G. and Friedman J.M., "Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus", *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, V 92, n° 15, (1995a), 6957-6960.
45. Hamilton B.S., Paglia D., Kwan A.Y. and Deitel M., "Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans", *Nat Mes*, V. 1, n° 9, (1995), 953 - 956.
46. Leroy P., Dessolin S., Villageois P., Moon B.C., Friedman J.M., Ailhaud G. and Dani C., "Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin", *J Biol Chem*, V. 271, n° 5, (1996), 2365 - 2368.
47. Klein S., Coppack S.W., Mohamed-Ali V. and Landt M., "Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans", *Diabetes*, V. 45, n° 7, (1996), 984 - 987.
48. Breidert M., Miehke S., Glasow A., Orban Z., Stolte M., Ehninger G., Bayerdörffer E., Nettesheim O, Halm U., Haidan A. and Bornstein S.R., "Leptin and its receptor in normal human gastric mucosa and in Helicobacter pylori-associated gastritis", *Scand J Gastroenterol*, V. 34, n° 10, (1999), 954 - 961.
49. Mix H., Manns M.P., Wagner S., Widjaja A. and Brabant G., "Expression of leptin and its receptor in the human stomach", *Gastroenterology*, V. 117, n° 2, (1999), 509.
50. Sobhani I., Bado A., Vissuzaine C., Buyse M., Kermogant S., Laigneau J.P., Attoub S., Lehy T., Henin D., Mignon M. and Lewin M.J. "Leptin secretion and leptin receptor in human stomach", *Gut*, V. 47, n° 2, (2000), 178 - 183.
51. Esler M., Vaz M., Collier G., Nestel P., Jennings G., Kaye D., Seals D. and Lambert G., "Leptin in human plasma is derived in part from the brain, and cleared by the kidney", *Lancet*, V. 351, n° 9106, (1998), 879.
52. Wang M.Y., Koyama K., Shimabukuro M, Newgard C.B. and Unger R.H., "OB-Rb gene transfer to leptin-resistant islets reverses diabetogenic phenotype", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 95, n° 2, (1998a), 714 - 718.
53. Taouis M., Chen J.W., Daviaud C., Dupont J., Derouet M. and Simon J., "Cloning the chicken leptin gene", *Gene*, V. 208, n° 2, (1998), 39 - 242.
54. Potter J.J., Womack L., Mezey E. and Anania F.A., "Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 244, n° 1, (1998), 178 - 182.
55. Sinha M.K., Openranova I., Ohannesian J.P., Kolaczynski J.W, Heiman M.L., Hale J., Becker G.W., Bowsher R.R., Stephens T.W. and Caro J.F., "Evidence of free and

bound leptin in human circulation: studies in lean and obese subjects and during short-term fasting”, *J Clin Invest*, V. 98, n° 6, (1996a), 1277 - 1282.

56. Ahima R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., Qu D., Lowell B., Maratos-Flier E. and Flier J.S., “Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting”, *Nature*, V. 382, n° 6588, (1996), 250 - 252.
57. Banks W.A., Kastin A.J., Huang W., Jaspan J.B. and Maness L.M. “Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin”, *Peptides*, V. 17 n° 2, (1996), 305 - 311.
58. Maffei M., Halaas J., Ravussin E., Pratley R.E., Lee G.H., Zhang Y., Fei H., Kim S., Lallone R., Ranganathan S., Kern P.A. and Friedman J.M., “Leptin levels in human and rodent : measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weigh-reduced subjects”, *Nature Medl.*, V. 1, n° 11, (1995b), 1155 - 1161.
59. 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 immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans”, *N Engl J Med*, V. 334, n° 5, (1996), 292 - 295.
60. Dagogo-Jack S., Fanelli C., Paramore D, Brothers J. and Landt M., “Plasma leptin and insulin relationships in obese and nonobese humans”, *Diabetes*, V. 45, n° 5, (1996), 695 - 698.
61. Piquet H., « Influence de la leptine sur la fonction de reproduction des mammifères », Thèse Médecine Vétérinaire, ENV Nantes, (2007), 77 p.
62. Cumin F., Baum H.P. and Levens N., “Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney”, *Int. J Obes Relat Metab Disord*, V. 20, n° 12, (1996), 1120 - 1126.
63. Tartaglia L.A., Dembski M.,Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G., Campfield L., Clark F. and Deeds J. “Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell”, V. 83, n° 7, (1995), 1263 - 1271.
64. Hoggard N., Mercer J.G., Rayner D.V., Moar K., Trayhurn P. and Williams L.M., “Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by Rt-PCR and in situ hybridization” *Biochem Biophys Res Commmun*, V. 232, n° 2, (1997a), 383 - 387.
65. Jensen M.D., Moller N., Nair K.S., Eisenberg P., Landt M. and Klein S., “Regional leptin kinetics in humans”, *Am J Clin Nutr*, V. 69, n° 1, (1999), 18 - 21.
66. Meyer C., Robson D., Rackovsky N., Nadkarni V. and Gerisch J., “Role of the kidney in human leptin metabolism” *Am J Physiol*, V. 273, n° 5, Pt 1, (1997), 903 - 907.

67. Zeng J., Patterson B.W., Klein S., Martin D.R., Dagogo-Jack S., Kohrt W.M., Miller S.B. and Landt M., "Whole body leptin kinetics and renal metabolism *in vivo*", *Am J Physiol*, V. 273, n° 6, (1997), 1102 - 1106.
68. Lee G.H., Proenca R., Montez J.M., Carroll K.M., Darvishzadeh J.G., Lee J.I. and Friedman J.M., "Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice", *Nature*, V. 379, n° 6566, (1996), 632 - 635.
69. Chua S.C. Jr., Chung W.K., Wu-Peng X.S., Zhang Y., Liu S.M., Tartaglia L. and Leibel RL., "Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor", *Science*, V. 271, n° 5251, (1996), 994 - 996.
70. Chua S.C. Jr., Koutras I.K., Han L., Liu S.M., Kay J., Young S.J. and Leibel RL., "Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts", *Genomics*, V. 45, n° 2, (1997), 264 - 270.
71. Cioffi J.A., Shafer A.W., Zupancic T.J., Smith-Gbur J., Mikhail A., Platika D. and Snodgrass H.R., "Novel B219/OB receptor isoforms : possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction", *Nat Med*, V. 2, n° 5, (1996), 585 - 589.
72. Wang M.Y., Zhou Y.T., Newgard C.B. and Unger RH., "A novel leptin receptor isoform in rat", *FEBS Lett*, V. 392, n° 2, (1996), 87 - 90.
73. Malik K.F. and Young W.S. 3rd., "Localization of binding sites in the central nervous system for leptin (OB protein) in normal, obese (*ob/ob*), and diabetic (*db/db*) C57BL/6J mice", *Endocrinology*, V. 137, n° 4, (1996), 1497 - 1500.
74. Hoggard N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P. and Mercer JG., "Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 94, n° 20, (1997b), 11073 - 11078.
75. Li C., Ioffe E., Fidahusein N., Connolly E. and Friedman JM., "Absence of soluble leptin receptor in plasma from dbPas/dbPas and other db/db mice. *J Biol Chem*, V. 273, n° 16, (1998), 10078 - 10082.
76. Fong T.M., Huang R.R.C., Tota M.R., Mao C., Smith T., Varnerin J., Karpitskiy V.V., Krause J.E. and Van der Ploeg L.H., "Localization of leptin binding domain in the leptin receptor", *Mol Pharmacol*, V. 53, n° 2, (1998), 234 - 240.
77. Crouse J.A., Elliot G.E., Burgess T.L., Chiu L., Bennet L., Moore J., Nicolson M. and Pacifici R.E., "Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation", *J Biol Chem*, V. 273, n° 29, (1998), 18365 - 18373.
78. Buyse M., Sobhani I. et Bado A. « Leptine, obésité et tractus gastro-intestinal. Hépatogastro & oncologie digestive (HGOD) », V. 9, n° 4, (2002), 309 - 316.

79. Baskin D.G., Schwartz M.W., Seeley R.J., Woods S.C., Porte D. Jr., Breininger J.F., Jonak Z., Schaefer J., Krouse M., Burghardt C., Campfield L.A., Burn P. and Kochan JP., "Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus", *J Histochem Cytochem*, V. 47, n° 3, (1999), 353 - 362.
80. Fei H., Okanoh.J., Li C., Lee G.H., Zhao C. and Darnell R., "Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 94, n° 13, (1997), 7001 - 7005.
81. Cheung C.C., Clifton D.K. and Steiner R.A., "Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus", *Endocrinology*, V. 138, n° 10, (1997), 4489 - 4492
82. Mercer J.G., Moar K.M., Rayner D.V., Trayhurn P. and Hoggard N. "Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (*ob/ob*) and cold-exposed lean mice", *FEBS Lett.*, V. 402, n° 2-3, (1997), 185 - 188.
83. Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J. and Liu, X.H. (2001), "The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes", *Physiol Behav*, V. 74, n° 4-5, (2001), 683 - 701.
84. Smith P.M. and Ferguson A.V., "Neurophysiology of hunger and satiety" *Dev Disabil Res Rev*, V. 14, n° 2, (2008), 96 - 104.
85. Couvreur O. « Le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique : impact de l'environnement maternel et implication du CNTF », THESE pour obtenir le grade de Docteur de L'Université Paris-Sud 11, (2011), 171 p.
86. Emilsson V., Liu Y.L., Cawthorne M.A., Morton N.M. and Davenport M., "Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion", *Diabetes*, V. 46, n° 2, (1997), 313 - 316.
87. Löllmann B., Gruninger S., Stricker-Krongrad A. and Chiesi M., "Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b and, e in different mouse tissues", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 238, n° 2, (1997), 648 - 652.
88. Bennett P.A., Lindell K., Karlsson C., Robinson I.C., Carlsson L.M. and Carlsson B., "Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen", *Neuroendocrinology*, V. 67, n° 1, (1998), 29 - 36.
89. Kieffer T.J., Heller R.S. and Habener J.F., "Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 224, n° 2, (1996), 522 - 527.

90. Fehmann H.C., Peiser C., Bode H.P., Stamm M., Staats P., Hedetoft C., Lang R.E. and Göke B., "Leptin : a potent inhibitor of insulin secretion", *Peptides*, V. 18, n° 8, (1997), 1267 - 1273.
91. Houseknecht K.L. and Portocarrero C.P., "Leptin and its receptors: regulators of whole-body energyhomeostasis" *Dom Anim Endocrinol*, V. 15, n° 6, (1998), 457 - 475.
92. Houseknecht K.L., Mantzoros C.S., Kuliawat R., Hadros E., Flier J.S. and Kahn B.B., "Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans : modulation with obesity", *Diabetes*, V. 45, n° 11, (1996), 1638 - 1643.
93. Balland E., Dam J., Langlet F., Caron E., Steculorum S, Messina A., Rasika S., Falluel-Morel A., Anouar Y., Dehouck B., Trinquet E., Jockers R, Bouret SG. and Prévot V., "Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain. *Cell metabolism*", V. 19, n° 2, (2014), 293 - 301.
94. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Stoffel M. and Friedman JM., "Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and *ob/ob* mice but not *db/db* mice", *Nature Genet*, V. 14, n° 1, (1996), 95 - 97.
95. Vaisse C., « Leptine : après le récepteur, la voie de transduction », *Med Sci (Paris)*, V. 13, n° 1, (1997), 99 - 101.
96. Wabisch M., Blum W.F., Muche R., Braun M., Hube F., Rascher W., Heinze E., Teller W. and Hauner H., "Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents" *J Clin Invest*, V. 100, n° 4, (1997), 808 - 813.
97. Cassy S., Dridi S., Picard M. et Taouis M., « La leptine chez le poulet », *INRA prod anim*, V. 14, n° 3, (2001), 161 - 169.
98. Bjorbaek C., Uotani S., da Silva B. and Flier J.S., "Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor", *J Biol Chem*, V. 272, n° 51, (1997), 32686 - 32695.
99. Ghilardi N. and Skoda R.C., "The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line", *Mol Endocrinol*, V. 11, n° 4, (1997), 393 - 399.
100. Kellerer M., Koch M., Metzinger E., Mushack J., Capp E. and Haring H.U., "Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways", *Diabetologia*, V. 40, n° 11, (1997), 1358 - 1362.

- 101.** Carpenter L.R., Farruggella T.J., Symes A., Karow M.L., Yancopoulos G.D. and Stahl N., "Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 95, n° 11, (1998), 6061 - 6066.
- 102.** Lubis A.R., Widia F., Soegondo S. et Setiawati A., « Le rôle de la protéine SOCS-3 dans la résistance à la leptine et l'obésité », *Acta Med Indonésie.*, V. 40, n° 2, (2008), 89 - 95.
- 103.** Cho H., "Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity", *Vitam Horm.*, V. 91, (2013), 405 - 424.
- 104.** Takahashi Y., Okimura Y., Mizuno I., Takahashi T., Kaji H, Uchiyama T., Abe H. and Chihara K., "Leptin induces tyrosine phosphorylation of cellular proteins including STAT-1 in human renal adenocarcinoma cells, ACHN", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 228, n° 3, (1996), 859 - 864.
- 105.** Bjørbaek C., Uotani S., da Silva B. and Flier J.S., "Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor", *J Biol Chem.*, V. 272, n° 51, (1997), 32686 - 32695.
- 106.** White D.W., Kuropatwinski K.K., Devos R., Baumann H. and Tartaglia L.A., "Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization", *J Biol Chem*, V. 272, n° 7, (1997a), 4065 - 4071.
- 107.** White D.W., Wang Y.P., Chua S.C. Jr., Morgenstern J.P., Leibel R.L., Baumann H. and Tartaglia L.A., "Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Gln-->Pro extracellular domain fatty mutation", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 94, n° 20, (1997b), 10657 - 10662.
- 108.** Wang Y., Kuropatwinski K.K., White D.W., Hawley T.S, Hawley R.G., Tartaglia L.A. and Baumann H., "Leptin receptor action in hepatic cells", *J Biol Chem*, V. 272, n° 26, (1997), 16216 - 16223.
- 109.** Siegrist-Kaiser C.A., Pauli V., Juge-Aubry C.E., Boss O., Pernin A., Chin W.W., Cusin I., Rohner-Jeanrenaud F., Burger A.G., Zapf J. and Meier C.A., "Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue", *J Clin Invest*, V. 100, n° 11, (1997), 2858 - 2864.
- 110.** Morton N.M., Emilsson V., Liu Y.L. and Cawthorne M."A., "Leptin action in intestinal cells", *J Biol Chem*, V. 273, n° 40, (1998), 26194 - 26201.
- 111.** Murakami T., Yamashita T., Iida M., Kuwajima M. and Shima K., "A short form of leptin receptor performs signal transduction", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 231, n° 1, (1997), 26 - 29.

112. Woods AJ. and Stock MJ., "Leptin activation in hypothalamus", *Nature*, V. 381, (1996), 745.
113. Barrachina M.D., Martinez V., Wang L., Wei J.Y. and Taché Y., "Synergistic interaction between leptin and cholecystinin to reduce short-term food intake in lean mice", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 94, n° 19, (1997), 10455 - 10460.
114. Marroqui L., Gonzalez A., Neco P., Caballero-Garrido E., Vieira E., Ripoll C., Nadal A. and Quesada I., "Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signaling pathways", *Journal of Molecular Endocrinology*, V. 49, n° 1, (2012), 9 - 17
115. Takahashi Y., Okimura Y., Mizuno I., Iida K., Takahashi T., Kaji H., Abe H. and Chihara K., "Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells.", *J Biol Chem*, V. 272, n° 20, (1997), 12897 - 12900.
116. Tanabe K., Okuya S., Tanizawa Y., Matsutani A. and Oka Y., "Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 241, n° 3, (1997), 765 - 768.
117. Bouloumié A., Drexler H.C.A., Lafontan M. and Busse R., "Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis", *Circ Res*, V. 83, n° 10, (1998), 1059 - 1066.
118. Bouloumié A., Marumo T., Lafontan M., Busse R., "Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells", *FASEB J*, V. 13, n° 10, (1999), 1231 - 1238.
119. Paz-Filho G., Mastronardi C., Franco C.B., Wang K.B., Wong M.L. and Licinio J., "Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications", V. 56, n° 9, (2012), 597 - 607.
120. Kolaczynski J.W., Ohannesian J.P., Considine R.V., Marco C.C. and Caro J.F., "Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 81, n° 11, (1996), 4162 - 4165.
121. Igel M., Kainulainen H., Brauers A., Becker W., Herberg L. and Joost HG., "Long-term and rapid regulation of ob mRNA levels in adipose tissue from normal (Sprague Dawley rats) and obese (*db/db* mice, *fa/fa* rats) rodents", *Diabetologia*, V. 39, n° 7, (1996), 758 - 765.
122. Koistinen H.A., Koivisto V.A., Andersson S., Karonen S.-L., Kontula K., Oksanen L. and Teramo K.A., "Leptin concentration in cord blood correlates with intrauterine growth", *J Clin Endocr Metab*, V. 82, n° 10, (1997), 3328 - 3330
123. Matsuda J., Yokota I., Iida M., Murakami T., Naito E., Ito M., Shima K. and Kuroda Y. "Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender", *J Clin Endocr Metab*, V. 82, n° 5, (1997), 1642 - 1644.

124. Saladin R., De Vos P., Guerre-Millo M., Leturque A., Girard J., Staels B. and Auwerx J., "Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration", *Nature*, V. 377, n° 6549, (1995), 527 - 529.
125. Sinha M.K., Ohannesian J.P., Heiman M.L., Kraucinnas A., Stephens M.W., Magosin S., Marco C. and Caro J.F., "Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-independent diabetes mellitus subjects", *J Clin Invest*, V. 97, n° 5, (1996b), 1344 - 1347.
126. Licinio J., Mantzoros C., Negrao A.B., Cizza G., Wong M.L., Bongiorno P.B., Chrousos G.P., Karp B., Allen C., Flier J.S. and Gold P.W., "Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function", *Nat Med*, V. 3, n° 5, (1997), 575 - 579.
127. Saad M.F., Riad-Gabriel M.G., Khan A., Sharma A., Michael R., Jinagouda S.D., Boyadjian R. and Steil G.M., "Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin : effects of gender and adiposity", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 83, n° 2, (1998), 453 - 459.
128. Ríos-Lugo M.J., Cano P., Jiménez-Ortega V., Fernández-Mateos M.P., Scacchi P.A., DP Cardinali D.P. and Esquifino A.I., "Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats", V. 49, n° 4, (2010), 342 - 348.
129. Chilliard Y., Bocquier F. and Doreau M., "Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction: a review", *Reprod Nutr Dev*, V. 38, n° 2, (1998), 131 - 152.
130. Chilliard Y., Bocquier F., Delavaud C., Faulconnier Y., Martin P. et Ferlay A., « La leptine chez le ruminant. Facteurs de variation physiologiques et nutritionnels », *INRA Productions Animales*, V. 12, n° 3, (1999), 225 - 237.
131. Chilliard Y. et Bocquier F., "Direct effects of photoperiod on lipid metabolism, leptin synthesis and milk secretion in adult sheep", *IXth Int Symp Ruminant Physiology Pretoria, Afrique du Sud*, (18 - 22 October 1999).
132. Waller C.A., Thompson D.L. Jr., Cartmill J.A., Storer W.A., Huff N.K., "Reproduction in high body condition mares with high versus low leptin concentrations", *Theriogenology*, V. 66, n° 4, (2006), 923 - 928.
133. Korhonen T. and Saarela S., "Rôle of adiposity hormones in the mouse during fasting and winter acclimatization", *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular and Integrative Physiology*, V. 140, n° 2, (2005), 217 - 223.
134. Mizuno T.M., Bergen H., Funabashi T., Kleopoulos S.P., Zhong Y.G., Bauman W.A. and Mobbs C.V., "Obese gene expression : reduction by fasting and stimulation by

insulin and glucose in lean mice, and persistent elevation in acquired (diet-induced) and genetic (yellow agouti) obesity”, Proc Natl Acad Sci USA, V. 93, n° 8, (1996), 3434 - 3438.

135. Cusin I., “The ob gene and insulin”, A relationship leading to clues to the understanding of obesity”, Diabetes, V. 44, n° 12, (1995), 1467 - 1470.
136. Kulkarni R.N., Wang Z.L., Wang R.M., Hurley J.D., Smith D.M., Ghatei M.A., Withers D.J., Gardiner J.V., Bailey C.J. and Bloom S.R., “Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, *in vivo*, in mice”, J Clin Invest, V. 100, n° 11, (1997), 2729 - 2736.
137. Woods S.C., Seeley R.J., Porte D. Jr. and Schwartz M.W., “Signals that regulate food intake and energy homeostasis”, Science, V. 280, n° 5368, (1998), 1378 - 1383.
138. Cusin I. et Rhoner-Jeanrenaud F., « Boucle régulatrice entre le neuropeptide Y et la leptine et son altération chez le rongeur obèse », Med Sci, V. 14, n° 8-9, (1998), 907 - 913.
139. Sainsbury A., Cusin I., Rohner-Jeanrenaud F. and Jeanrenaud B., “Adrenalectomy prevents the obesity syndrome produced by chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats”, Diabetes., V. 46, n° 2, (1997), 209 - 214.
140. Sliker L.J., Sloop K.W., Surface P.L., Kriauciunas A., Laquier F., Manetta J., Bue-Valleskey J. and Stephens T.W., “Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP”, J Biol Chem, V. 271, n° 10, (1996), 5301 - 5304.
141. Considine R.V., Nyce M.R., Kolaczynski J.W., Zhang P.L., Ohannessian J.P., Moore J.H. Jr., Fox J.W. and Caro J.F. “Dexamethasone stimulates leptin release from human adipocytes: unexpected inhibition by insulin”, J Cell Biochem, V. 65, n° 2, (1997), 254 - 258.
142. De Vos P., Saladin R., Auwerx J. and Staels B., “Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake”, J Biol Chem, V. 270, n° 27, (1995), 15958 -15961.
143. Papaspyrou-Rao S., Schneider S.H., Petersen R.N. and Fried S.K., “Dexamethasone increases leptin expression in humans *in vivo*”, J Clin Endocrinol Metab, V. 82, n° 5, (1997), 1635 - 1637.
144. Halleux C.M., Servais I., Reul B.A., Detry R., Brichard S.M., “Multihormonal control of ob gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue increased responsiveness to glucocorticoids in obesity”, J Clin Endocrinol Metab, V. 83, n° 3, (1998), 902 - 910.

145. Zakrezewska K.E., Cusin I., Sainsbury A., Rohner-Jeanraud F. and Jeanrenaud B., "Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance", *Diabetes*, V. 46, n° 4, (1997), 717 - 719.
146. Krief S., Lönnqvist F., Raimbault S., Baude B., Van Spronsen A., Arner P., Strosberg A.D., Ricquier D. and Emorine L.J., "Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man", *J Clin Invest*, V. 91, n° 1, (1993), 344 - 349.
147. Sauerwein H., Heintges U., Hennies M., Selhorst T. and Daxenberger A. "Growth hormone induced alterations of leptin serum concentrations in dairy cows as measured by a novel enzyme immunoassay", *Journal of Dairy Science*, V. 87, n° 2-3, (2004), 189 - 195.
148. Remesar X., Rafecas I., Fernandez-Lopez J.A. and Alemany M., "Is leptin an insulin counter-regulatory hormone?", *FEBS Lett.*, V. 402, n° 1, (1997), 9 - 11.
149. Flier J.S., "What's in a name? in search of leptin's physiologic role", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 83, n°5, (1998), 1407 - 1413.
150. Gualillo O., Lago F., Garcia M., Menendez C., Senaris R., Casanueva F.F. and Dieguez C., "Prolactin stimulates leptin secretion by ratwhite adipose tissue", *Endocrinol*, V. 140, n° 11, (1999), 5149 - 5153.
151. Florkowski C.M., Collier G.R., Zimmet P.Z., Livesey J.H., Espiner E.A. and Donald R.A., "Low-dose growth hormone replacement lowers plasma leptin and fat stores without affecting body mass index in adults with growth hormone deficiency", *Clin Endocrinol*, V. 45, n° 6, (1996), 769 - 773.
152. Carro E., Senaris R.M., Seoane L.M., Frohman L.A., Arimura A., Casanueva F.F. and Diéguez C. "Role of growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin on leptin-induced GH secretion", *Neuroendocrinology*, V. 69, n° 1, (1999), 3 - 10.
153. Quintela M., Senaris R., Heiman M.L., Casanueva F.F. and Dieguez C., "Leptin inhibits *in vitro* hypothalamic somatostatin mRNA levels", *Endocrinology*, V. 138, n° 12, (1997), 5641 - 5644.
154. Iritani N., "Nutritional and insulin regulation of leptin gene expression", *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, V. 3, n° 4, (2000), 275 - 279.
155. Wang J., Liu R., Hawkins M., Barzilai N. and Rossetti L., "An nutrient-sensing pathway regulates leptin gene in muscle and fat", *Nature*, V. 393, n° 6686, (1998b), 684 - 688.
156. Boden G., Chen X., Kolaczynski J.W. and Polansky M., "Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects", *J Clin Invest*, V. 100, n° 5, (1997), 1107 - 1113.

157. Grunfeld C., Zhao C., Fuller J., Pollack A., Moser A., Friedman J., Feingold K.R., "Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters", *J Clin Invest*, V. 97, n° 9, (1996), 2152 - 2157.
158. Sarraf P., Frederich R.C., Turner E.M., Ma G., Jaskowiak N.T., Rivet D.J. 3rd., Flier J.S., Lowell B.B., Fraker D.L., and Alexander H.R., "Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels : potential role in inflammatory anorexia", *J Exp Med*, V. 185, n° 1, (1997), 171 - 175.
159. Zumbach M.S., Boehme M.W.J., Wahl P., Stremmel W., Ziegler R. and Nawroth P.P., "Tumor Necrosis Factor increases serum leptin levels in humans", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 82, n° 12, (1997), 4080 - 4082.
160. Janik J.E., Curti B.D., Considine R.V., Rager H.C., Powers G.C., Alvord W.G., Smith J.W. 2nd., Gause B.L. and Kopp W.C., "Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 82, n° 9, (1997), 3084 - 3086.
161. Bornstein S.R., Licinio J., Tauchnitz R., Engelmann L., Negro A.B., Gold P. and Chrousos GP., "Plasma leptin levels are increased in survivors of acute sepsis : associated loss of diurnal rhythm in cortisol and leptin secretion", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 83, n° 1, (1998), 280 - 283.
162. Fantuzzi G. and Faggioni R., "Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis", *J Leukoc Biol*, V. 68, n° 4, (2000), 437 - 446.
163. Sierra-Honigmann M.R., Nath A.K., Murakami C., García-Cardeña G., Papapetropoulos A., Sessa W.C., Madge L.A., Schechner J.S., Schwabb M.B., Polverini P.J., Flores-Riveros J.R., "Biological action of leptin as an angiogenic factor", *Science*, V. 281, n° 5383, (1998), 683 - 686.
164. Park H.Y., Kwon H.M., Lim H.J., Hong B.K., Lee J.Y., Park B.E., Jang Y., Cho S.Y. and Kim H.S., "Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases *in vivo* and *in vitro*", *Exp Mol Med*, V. 33, n° 2, (2001), 95 - 102.
165. Margetic S., Gazzola C., Pegg G.G. and Hill R.A., "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions", *Int J Obes Relat Metab Disord*, V. 26, n° 11, (2002), 1407 - 1433.
166. Umemoto Y., Tsuji K., Yang F., Ebihara Y., Kaneko A., Furukawa S. and Nakahata T., "Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells", *Blood*, V. 90, n° 9, (1997), 3438 - 3443.
167. Ahima R.S., Dushay J., Flier S.N., Prabakaran D. and Flier J.S. "Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice", *J Clin Invest*, V. 99, n° 3, (1997), 391 - 395.

168. Chehab F.F., Lim M.E. and Lu R., "Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin", *Nat Genet*, V. 12, n° 3, (1996), 318 - 320.
169. Harris RB., "Leptin, much more than a satiety signal", *Annu Rev Nutr*, V. 20, (2000), 45 - 75.
170. Mantzoros C.S., "Role of leptin in reproduction", *Ann NY Acad Sci*, V. 900, (2000), 174 - 183.
171. Sagawa N., Yura S., Itoh H., Mise H., Kakui K., Korita D., Takemura M., Nuamah M.A., Ogawa Y., Masuzaki H., Nakao K. and Fujii S., "Role of leptin in pregnancy – a review", *Placenta, Trophoblast research*, V. 23 (Suppl A), 16, (2002), S80 - S86.
172. Raynaud A., *In: « Traité de zoologie », Grassé p.p. : Tome : XVI, Fascicule VI, Paris : Masson, (1969), 636 p.*
173. Vaissaire J.P., « Sexualité et Reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire ». Paris : Maloine Editeur, (1977), 457 p.
174. Van De Graaff K.M., Morton D.A. and Crawley J.L., "A Photographic Atlas for the Anatomy and Physiology Laboratory", Morton Publishing Company, 7th Edition, (2011), 220 p.
175. Mattei A., "Anatomie de l'appareil génital femelle du cobaye", Thèse Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. These Med Vet Alfort, V. 66, n° 38, (1966), 50 p.
176. Barone R., « Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3. Splanchnologie (fascicule 2). Appareil urogénital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale », Paris, Vigot, (1978), 951 p.
177. Derivaux J. et Ectors F., « Reproduction chez les animaux domestiques », 3^{ème} édition, Cabay, Louvain-La-Neuve, Paris : Academia éditions, (1986), 1141 p.
178. Hegelen M. et Thiriet A., « Atlas photographique de l'anatomie clinique des NAC (petits mammifères à l'exception du furet »), Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (2012), 186 p.
179. Heape W., "The 'sexual season' of mammals and the relation of the '*pro-oestrum*' to menstruation", *Q J Microsc Sci*, V. 44, (1900), 1 - 70.
180. Freeman M. E., "The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat". *In: "The physiology of reproduction"*, Knobil E. and Neill J.D. editors, New York, Raven Press, (1994), 613 - 658.
181. Goldman J.M., Laws S.C., Balchak S.K., Cooper R.L. and Kavlock R.J., "Endocrine-Disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation

and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations”, *Critical Reviews in toxicology*, V. 30, n° 2, (2000), 135 - 196.

182. Kim H.S., Shin J.H., Moon H.J., Kim T.S., Kang I.H., Seok J.H., Kim I.Y., Park K.L. and Han S.Y., “Evaluation of the 20-Day Pubertal Female Assay in Sprague-Dawley Rats treated with DES, Tamoxifen, Testosterone and Flutamide”, *Society of toxicology, Toxicological science*, V. 67, n° 1, (2002), 52 - 62.
183. Kennedy G.C. and Mitra J., “Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat”, *J Physiol*, V. 166, n° 2, (1963), 408 - 418.
184. Mandl A.M., “The phases of the estrous cycle in the adult white rat”, *J Exp Biol*, V. 28, (1951), 576 - 584.
185. Long J.A. and Evans H.M., “The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena”, *Mem Univ Calif*, V. 6, (1922), 1 -128.
186. Astwood E.B., “Changes in weight and water content of the uterus of the normal adult rat”, *Am J Physiol*, V. 126, (1939), 162 - 170.
187. Thibault C. et Levasseur M.C., « La reproduction chez les mammifères et l’homme », Ed. INRA Ellipses, (1991), 756 p.
188. Norris D.O. and Lopez K.H., “Endocrinology of the mammalian Ovary”. *In*: Norris D.O. & Lopez K.H. (eds.), *Hormones and reproduction of vertebrates*, Elsevier Ed., Londres (UK), V. 5, (2011), 59 - 72.
189. Mauléon P., “Oogenesis and folliculogenesis”. *In*: *Reprod Domest Anim*, Cole H.H., Cupps P.T., (Ed), Academic Press, New York, (1969), 187 - 215.
190. Monniaux D., Caraty A., Clement F., Dalbies-Tran R., Dupont J., Fabre S., Gerard N., Mermillod P., Monget P. et Uzbekova S., « Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères », *INRA Productions animales*, V. 22, n° 2, (2009), 59 - 76.
191. Monniaux D., Mandon-Pépin B. et Monget P., « L’atrésie folliculaire, un gaspillage programmé », *Synthèse, Med Sci (Paris)*, V. 15, n° 2, (1999), 157 - 166.
192. Kumar T.R., Wang Y., Lu N. and Matzuk M.M., “Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility”, *Nat Genet*, V. 15, n° 2, (1997), 201 - 204.
193. Thibault C., Szöllösi D. and Gérard M., “Mammalian oocyte maturation”, *Reprod Nutr Dev*, V. 27, n° 5, (1987), 895 - 896.

194. Gougeon A., "Dynamique of human follicular growth: a morphologic perspective", *In*: "The ovary", Adashi E.Y and Leung P.C.K. Edition, Raven Press, Ltd., New York, (1993), 21 - 39.
195. Fortune J.E., Cushman R.A., Wahl C.M. and Kito S., "The primordial to primary follicule transition", *Mol Cell Endocrinol*, V. 163, n° 1-2, (2000), 53 - 60.
196. Kezele P., Nilsson E. and Skinner MK., "Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development.", *Front Biosci.*, V. 7, (2002), d1990 - d1996.
197. Da silva-Buttkus P., Jayasooriya G.S., Mora J.M., Mobberley M., Ryder T.A., Baithun M., Stark J., Franks S. and Hardy K., "Effect of cell shape and packing density on granulose cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary", *J Cell Science*, V. 121, Pt 23, (2008), 3890 - 3900.
198. Lee VH. Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. *Biology of Reproduction*, V. 63, n° 2, (2000), 401 - 408.
199. Driancourt M.A., Gougeon A., Monniaux D., Royere D. et Thibault C., « Folliculogenèse et ovulation », *In*: « La reproduction chez les mammifères et l'homme », THIBAUT C. et LEVASSEUR M.C. (Eds), Ellipse, Paris, (2001), 316 - 347.
200. Bristol-Gould S. and Woodruff TK., "Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*)" *Theriogenology*, V. 66, n° 1, (2006), 5 - 13.
201. Thibault C. et Levasseur M.C., « La fonction ovarienne chez les mammifères », Tome 1, INRA ed. Masson, Paris, (1979), 99 p.
202. Monniaux D., Huet C, Besnard N., Clément F., Bosc M., Pisselet C., Monget P. and Mariana JC., "Follicular growth and ovarian dynamics in mammals", *J reprod Fertil Supp*, V. 51, (1997), 3 - 23.
203. Kessel B., Liu Y.X., Jia X.C. and Hsueh A.J., "Autocrine role of estrogens in the augmentation of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells", *Biol Reprod*, V. 32, n° 2, (1985), 1038 - 1050.
204. Hsueh A.J., "Paracrine mechanisms involved in granulosa cell differentiation", *Clin Endocrinol Metab*, V. 15, n° 1, (1986), 117 - 134.
205. Albertini D.F., Combelles C.M., Benecchi E. and Carabatsos M.J., "Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development", *Reproduction*, V. 121, n° 5, (2001), 647 - 653.
206. Thomas F.H. and Vanderhyden B.C., "Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth", *Reprod Biol Endocrinol*, V. 4, (2006), 19 - 26.

- 207.** Fortune J.E., "The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles", *Anim reprod Sci*, V. 78, n° 3-4, (2003), 135 - 163.
- 208.** Visser J.A. and Themmen A.P., "Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis", *Mol Cell Endocrinol*, V. 234, n° 1-2, (2005), 81-86.
- 209.** Zheng P. and Dean J., "Oocyte-specific genes affect folliculogenesis, fertilization, and early development", *Semin Reprod Med*, V. 25, n° 4, (2007), 243 - 251.
- 210.** Mermillod P. and Marchal R., "Mammalian oocyte maturation: The future of reproductive medicine", *Med Sci (Paris)*, V. 15, n° 2, (1999), 148 - 156.
- 211.** Verdin C., « La superovulation chez les mammifères, application à la jument », Thèse pour le grade de Docteur Vétérinaire, Université Claude-Bernard - LYON I (Médecine - Pharmacie), VETAGRO SUP, Campus Vétérinaire de Lyon, (2014), 120 p.
- 212.** Evans AC., "Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals", *Reprod Dom Anim*, V. 38, n° 4, (2003), 240 - 246.
- 213.** Gougeon A., "Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses", *Endocr Rev*, V. 17, n° 2, (1996), 121 - 155.
- 214.** McGee E.A. and Hsueh A.J., "Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles", *Endocrine Rev*, V. 21, n° 2, (2000), 200 - 214.
- 215.** Sasseville M., « Le rôle des phosphodiésterases dans le follicule ovarien » Thèse de Doctorat en Sciences animales, Université Laval, (2007), 2007-10.
<http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/24848/ch01.html>, Page consultée le : 15/04/2018
- 216.** Wurth E.M., « Etude comparative de l'ovulation chez les mammifères », Thèse de Doctorat Vétérinaire, Faculté de médecine, Créteil, (2010), 98 p.
- 217.** Larsen W.J. Wert S., Chen L., Russel P. and Hendrix E.M., "Expansion of the cumulus-oocyte complex during the preovulatory period: Possible roles in oocyte maturation, ovulation and fertilization", *In: "Ultrastructure of the ovary"*, Makabe G. and Motta P.M. (eds), Khniwer Academic Publishers, (1991), 45 - 61.
- 218.** Davis J.S., Weakland L.L., West L.A. and Farese R.V., "Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol trisphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. Evidence for phospholipase C generated second messengers in the action of luteinizing hormone", *Biochem J*, V. 238, n° 2, (1986), 597 - 604.
- 219.** Richards J.S. and Hedin L., "Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization", *Ann Rev Physiol*, V. 50, (1988), 441 - 463.

220. Szöllösi D., « Maturation de l'ovocyte », *In*: « La Reproduction chez les mammifères et l'homme », Thibault C.H. et Levasseur M.C. ed. INRA Ellipses, (1991), 299 - 314.
221. Plancha C.E. and Albertini D.F., "Protein synthesis requirements during resumption of Meiosis in the hamster oocyte: Early nuclear and microtubule configuration", *Mol Reprod Dev*, V. 33, n° 2, (1992), 324 - 332.
222. Brunet S. and Maro B., "Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space", *Reproduction*, V. 130, n° 6, (2005), 801 - 811.
223. Terret M.E. and Wassmann K., "Meiotic weakness: the first division", *Med Sci*, (Paris), V. 24, n° 2, (2008), 197 - 203.
224. Johnson M.H. and Everitt B.J., "Essential Reproduction", 5th ed. Malden: Blackwell Science, (2000), 285 p.
225. Tosti E., "Calcium ion currents mediating oocyte maturation events", *Reprod Biol Endocrinol*, V. 4, (2006), 26.
226. Eppig J.J., "Regulation of mammalian oocyte maturation", *In*: "The ovary", Adashi EY. and Leung P.C.K. Eds, Raven Press, Ltd, New York, (1993), 185 - 208.
227. Salustri A., Hascall V.C., Camaioni A. and Yanagishita M., "Oocyte-granulosa cell interactions", *In*: "The ovary", Adashi EY. and Leung P.C.K. Eds, Raven Press, Ltd., New York, (1993), 209 - 225.
228. Richards J.S., Russell D.L., Ochsner S., Hsieh M. Doyle K.H., Falender A.E., Yuet K.L. and Sharma S.C., "Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization", V. 57, (2002), 195 - 220.
229. Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M. and de Kruif A., "Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization", *Mol Reprod Dev*, V. 61, n° 3, (2002), 414 - 424.
230. Espey L.L., "Ovulation as an inflammatory reaction-a hypothesis", *Biol Reprod*, V. 22, n° 1, (1980), 73 - 106.
231. Gérard N., Caillaud M., Martoriati A., Goudet G. and Lalmanach A.C., "The interleukin-1 system and female reproduction", *J Endocrinol*, V. 180, n° 2, (2004), 203 - 212.
232. Liu Y.X., "A factor from granulosa cells can stimulate oocyte tissue plasminogen activator activity", *Sci China B.*, V. 32, n° 12, (1989), 1449 - 1456.
233. Beers W.H., Strickland S. and Reich E., "Ovarian plasminogen activator: relationship to ovulation and hormonal regulation", *Cell*, V. 6, n° 3, (1975), 387 - 394.

- 234.** Adashi E.Y. and Rohan R.M., "Intraovarian regulation: Peptidergic signaling systems", *Trends endocrinol, Metab*, V.3, n° 7, (1992), 243 - 248.
- 235.** Stern J. and Coulam C.B., "New concepts in ovarian regulation: An immune insight", *Amer J repro immunol*, V. 27, n° 3-4, (1992), 136 - 144.
- 236.** Iriani F. and Hodgen G.D., "Mechanism of ovulation", *Endocrinol Metab Clinics North America*, V. 21, n° 1, (1992), 19 - 36.
- 237.** Driancourt M.A., Gougeon A., Royere D. et Thibault C.H., « La fonction ovarienne », *In: « La Reproduction chez les mammifères et l'homme »*, Thibault C.H. et Levasseur M.C., ed. INRA Ellipses, (1991), 273 - 298.
- 238.** Curry T.E. Jr. and Smith M.F., "Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition", *Semin Reprod Med*, V. 24, n° 4, (2006), 228 - 241.
- 239.** Gougeon A., « Régulation intragonadique de la folliculogénèse humaine : faits et hypothèses », *Symposium : Physiopathologie de la reproduction. Ann Endocrinol*, V. 55, (1994), 63 - 73.
- 240.** LeMaire W.J., "Mechanism of mammalian ovulation", *Steroids*, V. 54, n° 5, (1989), 45 - 69.
- 241.** Self D.A. Schroeder P.C and Gown A.M., "Hamster thecal cells express muscle characteristics", *Biol reprod*, N. 39, n° 1, (1988), 119-130.
- 242.** Muglia U., Vizza E., Familiari G. and Motta P.M., "The smooth muscle cells in the ovary". *In: Ultrastructure of smooth muscle*, P.M. Motta (ed.), Kluwer Academic Publishers, (1990), 221 - 235.
- 243.** Leymarie P. et Benhaim A., « Notions récentes concernant le corps jaune », *Reprod Nutr Develop*, V. 28, n° 6, (1988), 1673 - 1680.
- 244.** Leymarie P. et Martal J., « Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif » *In: « La Reproduction chez les mammifères et l'homme »*, Thibault C.H. et Levasseur M.C., ed. INRA Ellipses, (2001), 479 - 504.
- 245.** Magoffin D.A., "Regulation of differentiated functions in ovarian theca cells", *Sem Reprod Endocrinol*, V. 9, (1991), 321 - 331.
- 246.** Niswender G.D., Juengel J.L., Rollyson P. and Mcintosh E.W., "Mechanisms controlling the function and life span of corpus luteum", *Physiol Rev*, V. 80, n° 1, (2000), 1 - 29.
- 247.** Rothchild I., "The regulation of the mammalian corpus luteum", *Recent Prog Horm Res.*, V. 37, (1981), 183 - 298.

- 248.** Goyeneche A.A., Deis R.P. Gibori G. and Telleria C.M., "Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors", *Biol Reprod*, V. 68, n° 1, (2003), 151 - 158.
- 249.** Leymarie P. et Martal J., « Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif », *In*: « La Reproduction chez les mammifères et l'homme », Thibault C.H. et Levasseur M.C., ed. INRA Ellipses, (1991), 403 - 421.
- 250.** Chartrel N. et Vaudy H., « La relaxine. une ancienne hormone trouve enfin ses récepteurs. The receptor for relaxin has finally been identified », *Med Sci (Paris)*, V. 18, n° 11, (2002), 1061- 1063.
- 251.** Martal J. and Chêne N., "Function of embryonic interferons and the main serum proteins specific for pregnancy", *Troph. Res.* V. 6, (1992), 73 - 122, *in* : "Placental signals : autocrine and paracrine control of pregnancy", Cerdard L. and Firth A., Firth, eds, University of Rochester Press. 375p.
- 252.** Martal J., Lacroix M.C., Loudes C., Saunier M., Wintenberger-Torrès S., "Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep", *J Reprod Fertil*, V. 56, n° 1, (1979), 63 - 73.
- 253.** Meyer HH., "Luteal *versus* placental progesterone: the situation in the cow, pig and bitch", *Exp Clin Endocrinol*, V. 102, n° 3, (1994), 190 - 192.
- 254.** Gharib S., Wierman M.E., Shupnik M.A. and Chin W.W., "Molecular biology of the pituitary gonadotropins", *Endocrinol Rev*, V. 11, n° 1, (1990), 177 - 199.
- 255.** Fontaine Y.A., « Les hormones gonadotropes de l'hypophyse : biochimie et biologie compares, spécificité et evolution », *Reprod Nutr Develop*, V. 20, n° 2, (1980), 381 - 418.
- 256.** Kim I. and Greenwald G.S., "Hormonal requirements for maintenance of follicular and luteal function in the hypophysectomized cycle master", *Biol Reprod*, V. 30, n° 5, (1984), 1063 - 1072.
- 257.** Wang X.N. and Greenwald G.S., "Hypophysectomy of the cyclic mouse. II. Effects of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing Hormone on folliculogenesis, FSH and human chorionic gonadotropin receptors and steroidogenesis", *Biol Reprod*, V. 48, n° 3, (1993), 595 - 605.
- 258.** Shupnik M.A. "Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone", *Biol Reprod*, V. 54, n° 2, (1996), 297 - 286.
- 259.** Counis R., Combarous Y., Chabot V. et Taragnat C. « Chapitre 4. Libération pulsatile des gonadotropines, de la prolactine et de la GH. Le contrôle de la

pulsatilité de LH ». *In*: « La reproduction chez les mammifères et l'homme », Thibault C. et Levasseur M.C., Ellipses Edition Marketing S.A., (2001), 85 - 99.

- 260.** Freeman ME., "Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat", *In*: "The Physiology of Reproduction", 3rd Eds, Knobil E. and Neill J. D., New York, Raven Press, (2006), 2328 - 2388.
- 261.** Conn P.M., Ulloa-Aguirre A., Ito J. and Janovick J.A., "G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue *in vivo*", *Pharmacol Rev*, V. 59, n° 3, (2007), 225 - 250.
- 262.** Varela L. and Horvath T.L., "Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis", *EMBO Rep*, V. 13, n° 12, (2012), 1079 - 1086.
- 263.** Cussa D. and Ecclesia F.J. "Puberty begins with a kiss", (2012).
<http://flipper.diff.org/app/pathways/info/3997>, Page consultée le : 04/04/2018
- 264.** Caraty A., Duittoz A., Pellitier J., Thiéru J.C., Tillet Y. et Bouchard P., « Régulation de la synthèse et de la régulation des gonadotropines hypophysaires ». *In*: « La reproduction chez les mammifères et l'homme ». Thibault C. et Levasseur M.C., Ellipses Edition Marketing S.A., (2001) : 65 - 84.
- 265.** Weiner R.I., Findel P.R. and Kordon C., "Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin", *In*: "The Physiology of Reproduction", Knobil E. and Neil J.D. Eds., Raven Press, Ltd, Nex York, (1988), 1235 - 1238.
- 266.** Smeets W.J. and Gonzalez A., "Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach", *Brain Res*, V. 33, n° 2-3, (2000), 308 - 379.
- 267.** Howlett T.A. and Lesley H.R., "Endogenous opioid peptides and human reproduction", *Oxford Rev*, V. 9, (1987), 260 - 293.
- 268.** Seminara S.B., Messenger S., Chatzidaki E.E., Thresher R.R., Acierno J.S. Jr., Shagoury J.K., Bo-Abbas Y., Kuohung W., Schwinof K.M., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Kaiser U.B., Slaugenhaupt S.A., Gusella J.F., O'Rahilly S., Carlton M.B., Crowley W.F. Jr., Aparicio S.A. and Colledge W.H., "The GPR54 gene as a regulator of puberty", *N Engl J Med*, V. 349, n° 17, (2003), 1614 - 1627.
- 269.** Funes S., Hedrick J.A., Vassileva G., Markowitz L., Abbondanzo S., Golovko A., Yang S., Monsma F.J. and Gustafson E.L., "The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 312, n° 4, (2003), 1357 - 1363.

- 270.** De Roux N., Genin E., Carel J.C., Matsuda F., Chaussain J.L. and Milgrom E., "Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54", *Proc Natl Acad Sci U S A*, V. 100, n° 19, (2003), 10972 - 10976.
- 271.** Gottsch M.L., Cunningham M.J., Smith J.T., Popa S.M., Acohido B.V., Crowley W.F., Seminara S., Clifton D.K. and Steiner R.A., "A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse", *Endocrinology*, V. 145, n° 9, (2004), 4073 - 4077.
- 272.** Mayer C. and Boehm U. "Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling", *Nat Neurosci*, V. 14, n° 6, (2011), 704 - 710.
- 273.** Han S.K., Gottsch M.L., Lee K.J., Popa S.M., Smith J.T., Jakawich S.K., Clifton D.K., Steiner R.A. and Herbison A.E., "Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty", *J Neurosci*, V. 25, n° 49, (2005), 11349 - 11356.
- 274.** Pielecka-Fortuna J. and Moenter S.M., "Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an oestradiol-dependent manner", *Endocrinologie*, V. 151, n° 1, (2010), 291 - 300.
- 275.** Rettori V., Canteros G., Renoso R., Gimeno M. and McCann S.M., "Oxytocin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamic explants by releasing nitric oxide", *Proc Natl Acad Sci U S A*, V. 94, n° 6, (1997), 2741 - 2744.
- 276.** Akema T., Praputpittaya C. and Kimura F., "Effects of Preoptic Microinjection of Neurotensin on Luteinizing Hormone Secretion in Unanesthetized Ovariectomized Rats with or without Estrogen Priming", *Neuroendocrinology*, V. 46, n° 4, (1987), 345 - 349.
- 277.** Evans J.J. and Anderson G.M., "Balancing ovulation and anovulation: integration of the reproductive and energy balance axes by neuropeptides", *Hum Reprod Update*, V. 18, n° 3, (2012), 313 - 332.
- 278.** Horvath T.L., Naftolin F., Leranth C., Sahu A. and Kalra S.P., "Morphological and pharmacological evidence for neuropeptide Y-galanin interaction in the rat hypothalamus", *Endocrinology*, V. 137, n° 7, (1996), 3069 - 3078.
- 279.** Bergonzelli G.E., Pralong F.P., Glauser M., Cavadas C., Grouzmann E. and Gaillard R.C., "Interplay between galanin and leptin in the hypothalamic control of feeding via corticotropin-releasing hormone and neuropeptide Y", *Diabetes*, V. 50, n° 12, (2001), 2666 - 2672.

- 280.** Kuramochi M., Onaka T., Kohno D., Kato S. and Yada T., "Galanin-like peptide stimulates food intake via activation of neuropeptide Y neurons in the hypothalamic dorsomedial nucleus of the rat", *Endocrinology*, V. 147, n° 4, (2006), 1744 - 1752.
- 281.** Kesterson R.A., Huszar D., Lynch C.A., Simerly R.B. and Cone R.D., "Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome", *Mol Endocrinol*, V. 11, n° 5, (1997), 630 - 637.
- 282.** Polkowska J., Wojcik-Gladysz A. and Wankowska M., "The effect of intracerebroventricular infusions of leptin on the immunoreactivity of neuropeptide Y and gonadotrophin releasing hormone neurons in the hypothalamus of prepubertal sheep in conditions of short fasting", *J Chem Neuroanat*, V. 32, n° 1, (2006), 65 - 73.
- 283.** Schwartz M.W., Seeley R.J., Campfield L.A., Burn P. and Baskin D.G., "Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus", *J Clin Invest*, V. 98, n° 5, (1996b), 1101 - 1106.
- 284.** Schwartz M.W., Sipols A.J., Marks J.L., Sanacora G., White J.D., Scheurink A., Kahn S.E., Baskin D.G., Woods S.C., Figlewicz D.P. and Porte D. Jr., "Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin", *Endocrinology*, V. 130, n° 6, (1992), 3608 - 3616.
- 285.** Fu L.Y. and van den Pol A.N., "Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism", *J Neurosci*, V. 30, n° 30, (2010), 10205 - 10219.
- 286.** Asakawa A., Inui A., Kaga T., Yuzuriha H., Nagata T., Ueno N., Makino S., Fujimiya M., Nijima A., Fujino M.A. and Kasuga M., "Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin", *Gastroenterology*, V. 120, n° 2, (2001), 337 - 345.
- 287.** Cowley M.A., Smith R.G., Diano S., Tschöp M., Pronchuk N., Grove K.L., Strasburger C.J., Bidlingmaier M., Esterman M., Heiman M.L., Garcia-Segura L.M., Nillni E.A., Mendez P., Low M.J., Sotonyi P., Friedman J.M., Liu H., Pinto S., Colmers W.F., Cone R.D. and Horvath T.L., "The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis", *Neuron*, V. 37, n° 4, (2003), 649 - 661.
- 288.** Kamegai J., Tamura H., Shimizu T., Ishii S., Sugihara H. and Wakabayashi I., "Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats", *Diabetes*, V. 50, n° 11, (2001), 2438 - 2443.

- 289.** Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. and Matsukura S., "A role for ghrelin in the central regulation of feeding", *Nature*, 409, n° 6817, (2001), 194 -198.
- 290.** Riediger T., Traebert M., Schmid H.A., Scheel C., Lutz T.A. and Scharrer E., "Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus", *Neurosci Lett*, V. 341, n° 2, (2003), 151 - 155.
- 291.** Nogueiras R., Tovar S., Mitchell S.E., Rayner D.V., Archer Z.A., Dieguez C. and Williams L.M., "Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin", *Diabetes*, V. 53, n° 10, (2004), 2552 - 2558.
- 292.** Forbes S., Li X.F., Kinsey-Jones J. and O'Byrne K., "Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat", *Neurosci Lett*, V. 460, n° 2, (2009), 143 - 147.
- 293.** Schwartz M.W., Seeley R.J., Woods S.C., Weigle D.S., Campfield L.A., Burn P. and Baskin D.G., "Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus", *Diabetes*, V. 46, n° 12, (1997), 2119 - 2123.
- 294.** Spiegelman B.M. and Flier J.S., "Obesity and the regulation of energy balance", *Cell*, V. 104, n° 4, (2001), 531 - 543.
- 295.** Benoit S.C., Air E.L., Coolen L.M., Strauss R., Jackman A., Clegg D.J., Seeley R.J., Woods S.C., "The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins", *J Neurosci*, V. 22, n° 20, (2002), 9048 - 9052.
- 296.** Broberger C., Landry M., Wong H., Walsh J.N. and Hokfelt T., "Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus", *Neuroendocrinology*, V. 66, n° 6, (1997), 393 - 408.
- 297.** Bouret S., Croix D., Mariot M., Loyens A., Prevot V., Jegou S., Vaudry H., Beauvillain J.C. and Mitchell V., "Galanin modulates the activity of proopiomelanocortin neurons in the isolated mediobasal hypothalamus of the male rat", *Neuroscience*, V. 112, n° 2, (2002), 475 - 485.
- 298.** Kinney G.A., Emmerson P.J. and Miller R.J., "Galanin receptor-mediated inhibition of glutamate release in the arcuate nucleus of the hypothalamus", *J Neurosci*, V. 18, n° 10, (1998), 3489 - 3500.
- 299.** Poulain P., Decroq N. and Mitchell V., "Direct inhibitory action of galanin on hypothalamic arcuate nucleus neurones expressing galanin receptor Gal-r1 mRNA", *Neuroendocrinology*, V. 78, n° , (2003), 105 - 117.

300. Hansen K.R., Krasnow S.M., Nolan M.A., Fraley G.S., Baumgartner J.W., Clifton D.K. and Steiner R.A., "Activation of the sympathetic nervous system by galanin-like peptide-a possible link between leptin and metabolism", *Endocrinology*, V. 144, n° 11, (2003), 4709 - 4717.
301. Tung Y.C., Ma M., Piper S., Coll A., O'Rahilly S. and Yeo G.S., "Novel leptin-regulated genes revealed by transcriptional profiling of the hypothalamic paraventricular nucleus", *J Neurosci*, V. 28, n° 47, (2008), 12419 - 12426.
302. Jureus A., Cunningham M.J., McClain M.E., Clifton D.K. and Steiner R.A., "Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat", *Endocrinology*, V. 141, n° 7, (2000), 2703 - 2706.
303. Fraley G.S., Scarlett J.M., Shimada I., Teklemichael D.N., Acohido B.V., Clifton D.K. and Steiner R.A., "Effects of diabetes and insulin on the expression of galanin-like peptide in the hypothalamus of the rat", *Diabetes*, V. 53, n° 5, (2004), 1237 - 1242.
304. Cheung C.C., Hohmann J.G., Clifton D.K. and Steiner R.A., "Distribution of galanin messenger RNA-expressing cells in murine brain and their regulation by leptin in regions of the hypothalamus", *Neuroscience*, V. 103, n° 2, (2001), 423 - 432.
305. Sahu A., "Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus", *Endocrinology*, V. 139, n° 2, (1998a), 795 - 798.
306. Sahu A., "Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat", *Endocrinology*, V. 139, n° 11, (1998b), 4739 - 4742.
307. Awapara J., Landau A. J., Fuerst R. and Seale B., "Free γ -aminobutyric acid in brain", *J Biol Chem*, V. 187, n° 1, (1950), 35 - 39.
308. Watanabe M., Fukuda A. and Nabekura J., "The role of GABA in the regulation of GnRH neurons", *Front Neurosci*, V. 8, (2014), 387.
309. Kottler M.L. et Richard N., « La GnRH ». *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie*, V. 10, n° 2, (2008), 105-13.
310. Caldwell J.D., Walker C.H., Pedersen C.A., Barakat A.S. and Mason G.A., "Estrogen increases affinity of oxytocin receptors in the medial preoptic area anterior hypothalamu", *Peptides*, V. 15, n° 6, (1994), 1079 - 1084.
311. Cunningham M.J., Shahab M., Grove K.L., Scarlett J.M., Plant T.M., Cameron J.L., Smith M.S., Clifton D.K. and Steiner R.A., "Galanin-like peptide as a possible link

between metabolism and reproduction in the macaque”, *J Clin Endocrinol Metab*, V. 89, n° 4, (2004), 1760 - 1766.

312. Uenoyama Y., Tsukamura H., Kinoshita M., Yamada S., Iwata K., Pheng V., Sajapitak S., Sakakibara M., Ohtaki T., Matsumoto H. Maeda KI., “Oestrogen-dependent stimulation of luteinising hormone release by galanin-like peptide in female rat”, *J Neuroendocrinol*, V. 20, n° 5, (2008), 626 - 631.
313. Sahu A., Crowley W.R., Tatemoto K., Balasubramaniam A. and Kalra S.P., “Effects of neuropeptide Y (NPY), NPY analog (norleucine-NPY), galanin and neuropeptide K on LH release in ovariectomized (OVX) and OVX, estrogen, progesterone treated rats”, *Peptides*, V. 8, n° 5, (1987), 921 - 926.
314. Lopez F.J. and Negro-Vilar A., “Galanin stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments *in vitro*: involvement of an alpha-adrenergic mechanism”, *Endocrinology*, V. 127, n° 5, (1990), 2431 - 2436.
315. Ceresini G., Merchenthaler A., Negro-Vilar A. and Merchenthaler I., “Aging impairs galanin expression in luteinizing hormone-releasing hormone neurons: effect of ovariectomy and/or oestradiol treatment”, *Endocrinology*, V. 134, n° 1, (1994), 324 - 330.
316. Marks D.L., Lent K.L., Rossmannith W.G., Clifton D.K. and Steiner R.A., “Activation-dependent regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat”, *Endocrinology*, V. 134, n° 5, (1994), 1991 - 1998.
317. Rossmannith W.G., Marks D.L., Clifton D.K. and Steiner R.A., “Induction of galanin mRNA in GnRH neurons by oestradiol and its facilitation by progesterone”, *J Neuroendocrinol*, V. 8, n° 3, (1996), 185 - 191.
318. Splett C.L., Scheffen J.R., Desotelle J.A., Plamann V. and Bauer-Dantoin A.C., “Galanin enhancement of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone secretion in female rats is estrogen dependent”, *Endocrinology*, V. 144, n° 2, (2003), 484 - 490.
319. Smith J.T., Cunningham M.J., Rissman E.F., Clifton D.K. and Steiner R.A., “Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse”, *Endocrinology*, V. 146, n° 9, (2005a), 3686 - 3692.
320. Dhillon W.S., Chaudhri O.B., Thompson E.L., Murphy K.G., Patterson M., Ramachandran R., Nijher G.K., Amber V., Kokkinos A., Donaldson M., Ghatei M.A. and Bloom SR., “Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women”, *J Clin Endocrinol Metab*, V. 92, n° 10, (2007), 3958 - 3966.

- 321.** Quennell J.H., Mulligan A.C., Tups A., Liu X., Phipps S.J., Kemp C.J., Herbison A.E., Grattan D.R., Anderson G.M., "Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function", *Endocrinology*, V. 150, n° 6, (2009), 2805 - 2812.
- 322.** Donato J. Jr., Cravo R.M., Frazao R., Gautron L., Scott M.M., Lachey J., Castro I.A., Margatho L.O., Lee S., Lee C., Richardson J.A., Friedman J., Chua S. Jr., Coppari R., Zigman J.M., Elmquist J.K. and Elias C.F., "Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons", *J Clin Invest*, V. 121, n° 1, (2011), 355 - 368.
- 323.** Rometo A.M., Krajewski S.J., Voytko M.L. and Rance N.E., "Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 92, n° 7, (2007), 2744 - 2750.
- 324.** Alde S. and Celis M.E., "Influence of alpha-melanotropin on LH release in the rat. *Neuroendocrinology*", V. 31, n° 2, (1980), 116 - 120.
- 325.** Celis M.E., "Release of LH in response to alpha-MSH administration", *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*, V. 35, n° 3, (1985), 281- 290.
- 326.** Volosin M. and Celis M.E., "Evidence for the role of alpha-MSH in the induction of pseudopregnancy in the rat", *Neuroendocrinology*, V. 39, n° 1, (1984), 13 - 18.
- 327.** Kerkerian L., Guy J., Lefevre G. and Pelletier G., "Effects of neuropeptide Y (NPY) on the release of anterior pituitary hormones in the rat", *Peptides*, V. 6, n° 6, (1985), 1201 - 1204.
- 328.** Crowley W.R., and Kalra S.P., "Neuropeptide Y stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamus *in vitro*: modulation by ovarian hormones", *Neuroendocrinology*, V. 46, n° 2, (1987), 97 - 103.
- 329.** Khorram O., Pau K.Y.F. and Spies H.G., "Bimodal effects of neuropeptide Y on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone in conscious rabbits", *Neuroendocrinology*, V. 45, n° 4, (1987), 290 - 297.
- 330.** Kaynard A.H., Pau K-Y.F., Hess D.L. and Spies H.G., "Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized Rhesus macaques", *Endocrinology*, V. 127, n° 5, (1990), 2437 - 2444.
- 331.** Jain M.R., Pu S., Kalra P.S. and Kalra S.P., "Evidence that stimulation of two modalities of pituitary luteinizing hormone release in ovarian steroid-primed ovariectomized rats may involve neuropeptide Y Y1 and Y4 receptors", *Endocrinology*, V. 140, n° 11, (1999), 5171 - 5177.

- 332.** Woller M.J. and Terasawa E., "Estradiol enhances the action of Neuropeptide Y on *in vivo* luteinizing hormone-releasing hormone release in the ovariectomized Rhesus monkey", *Neuroendocrinology*, V. 56, n° 6, (1992), 921 - 925.
- 333.** Raposinho P.D., Broqua P., Pierroz D.D., Hayward A., Dumont Y., Quirion R., Junien J-L. and Aubert M.I., "Evidence that the inhibition of luteinizing hormone secretion exerted by central administration of neuropeptide Y (NPY) in the rat is predominantly mediated by the NPY-Y5 receptor subtype", *Endocrinology*, V. 140, n° 9, (1999), 4046 - 4055.
- 334.** Barreiro M.L. and Tena-Sempere M., "Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility?", *Mol Cell Endocrinol*, V. 226, n° 1-2, (2004), 1 - 9.
- 335.** Lebrethon M.C., Aganina A., Fournier M., Gerard A., Parent A.S. and Bourguignon J.P., "Effects of *in vivo* and *in vitro* administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty", *J Neuroendocrinol*, V. 19, n° 3, (2007), 181 - 188.
- 336.** Vulliémoz N.R., Xiao E., Xia-Zhan L., Germond M., Rivier J. and Ferin M., "Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 89, n° 11, (2004), 5718 - 5723.
- 337.** Brüning J.C., Gautam D., Burks D.J., Gillette J., Schubert M., Orban P.C., Klein R., Krone W., Muller-Wieland D. and Kahn C.R., "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction", *Science*, V. 289, n° 5487, (2000), 2122 - 2125.
- 338.** Burcelin R., Thorens B., Glauser M., Gaillard R.C. and Pralong F.P., "Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin", *Endocrinology*, V. 144, n° 10, (2003), 4484 - 4491.
- 339.** Mounzih K., Lu R. and Chehab F.F., "Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese *ob/ob* males", *Endocrinology*, V. 138, n° 3, (1997), 1190 - 1193.
- 340.** Lin K.C., Sagawa N., Yura S., Itoh H. and Fujii S., "Simultaneous increases of leptin and gonadotropin-releasing hormone following exogenous estrogen administration in women with normally menstrual cycle", *Endocr J*, V. 52, n° 4, (2005), 449 - 454.
- 341.** Gao Q. and Horvath T.L., "Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus", *Am J Physiol Endocrinol Metab*, V. 294, n° 5, (2008), E817 - E826.
- 342.** Vale W., Rivier J., Vaughan J., McClintock R., Corrigan A., Woo W., Karr D. and Spiess J., "Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid", *Nature*, V. 321, n° 6072, (1986), 776 - 779.

- 343.** Ling N., Ying S.Y., Ueno N., Shimasaki S., Esch F., Hotta M. and Guillemin R., "Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin", *Nature* V. 321, n° 6072, (1986), 779 - 782.
- 344.** Carroll R.S., Corrigan A.Z., Gharib S.D., Vale W. and Chin W.W., "Inhibin, activin and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels", *Mol Endocrinol*, V. 3, n° 12, (1989), 1969 - 1976.
- 345.** Esch F.S., Shimasaki S., Mercado M., Cooksey K., Ling N., Ying S., Ueno N. and Guillemin R., "Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad", *Mol Endocrinol*, V. 1, n° 11, (1987), 849 - 855.
- 346.** Robertson D.M., Klein R., de Vos F.L., McLachlan R.I., Wettenhall R.E., Hearn M.T., Burger H.G. and de Kretser D.M., "The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 149, n° 2, (1987), 744 - 749.
- 347.** Ueno N., Ling N., Ying S.Y., Esch F., Shimasaki S. and Guillemin R., "Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 84, n° 23, (1987), 8282 - 8286.
- 348.** Miyamoto K., Hasegawa Y., Fukuda M., Nomura M., Igarashi M., Kangawa K. and Matsuo H., "Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 129, n° 2, (1985), 396 - 403.
- 349.** Rivier J., Spiess J., McClintock R., Vaughan J. and Vale W., "Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 133, n° 1, (1985), 120 - 127.
- 350.** Djiane J. et Kelly P.A., « La prolactine », *In* : « La reproduction chez les mammifères et l'homme », Thibault C. et Levasseur M.C., Edition Markeing INRA Ellipses, (1991), 113 - 126.
- 351.** McNeilly A.S., "Lactational control of reproduction", *Reprod Fertil Dev*, V. 13, n° 7-8, (2001), 583 - 590.
- 352.** Bachelot A. and Binart N., "Reproductive role of prolactin", *Reproduction*, V. 133, n° 2, (2007), 361 - 369.
- 353.** Ben-Jonathan N., LaPensee C.R. and LaPensee E.W., "What can we learn from Rodents about Prolactin in Humans", *Endocrine Reviews*, V. 29, n° 1, (2008), 1 - 41.

- 354.** Pétridou B., Cassy S. et Djiane J., « La prolactine, ses récepteurs et ses actions biologiques », In: « La reproduction chez les mammifères et l'homme », Thibault C. et Levasseur M.C., Ellipses Edition Marketing S.A., (2001), 122 - 143.
- 355.** Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A. and Nagy G.M., "Prolactin: structure, function and regulation of secretion", *Physiol Rev*, 80, n° 4, (2000), 1523 - 1631.
- 356.** Ducornet B., Aviven G. et Raffin-Sanson M.-L., « Contrôle hypothalamique des sécrétions hormonales hypophysaires », *EMC - Endocrinologie*, V. 2, n° 9, (2005), 209 - 230.
- 357.** Smith M.S., Freeman M.E. and Neill J.D., "The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy", *Endocrinology*, V. 96, n° 1, (1975), 219 - 226.
- 358.** Farooqi I.S., Jebb S.A., Langmack G., Lawrence E., Cheetham C.H., Prentice A.M., Hughes I.A., McCamish M.A. and O'Rahilly S., "Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency", *N Engl J Med*, V. 341, n° 12, (1999), 879 - 884.
- 359.** Jin L., Burguera B.G., Couce M.E., Scheithauer B.W., Lamsan J., Eberhardt N.L., Kulig E. and Lloyd R.V., "Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 84, n° 8, (1999), 2903 - 2911.
- 360.** Sir-Petermann T., Maliqueo M., Palomino A., Vantman D., Recabarren S.E. and Wildt L., "Episodic leptin release is independent of luteinizing hormone secretion", *Hum Reprod*, V. 14, n° 11, (1999), 2695 - 2599.
- 361.** Sir-Petermann T., Recabarren S.E., Lobos A., Maliqueo M. and Wildt L., "Secretory pattern of leptin and LH during lactational amenorrhoea in breastfeeding normal and polycystic ovarian syndrome women", *Hum Reprod*, V. 16, n° 2, (2001), 244 - 249.
- 362.** Cioffi J.A., Van Blerkom J., Antczak M., Shafer A., Wittmer S. and Snodgrass H.R., "The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles", *Mol Hum Reprod*, V. 3, n° 6, (1997), 467 - 472.
- 363.** Karlsson C., Lindell K., Svensson E., Bergh C., Lind P., Billig H., Carlsson L.M. and Carlsson B., "Expression of functional leptin receptors in the human ovary", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, V. 82, n° 12, (1997), 4144 - 4148.
- 364.** Foster D.L. and Nagatani S., "Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty", *Biol Reprod*, V. 60, n° 2, (1999), 205 - 215.

- 365.** Magni P., Vettor R., Pagano C., Calagno A., Beretta E., Messi E., Zanisi M., Martini L. and Motta M., "Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone secreting neurons", *Endocrinology*, V. 140, n° 4, (1999), 1581 - 1585.
- 366.** Yu W.H., Kiruma M., Walczewska A., Karanah S. and McCann S.M., "Role of leptin in hypohalamic-pituitary function", *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, V. 94, n° 3, (1997a), 1023 - 1028.
- 367.** Yu W.H., Walczewska A., Karanah S. and McCann S.M., "Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland", *Endocrinology* V. 138, n° 11, (1997b), 5055 - 5058.
- 368.** Kristensen P., Jusge M.E., Thim L., Ribel U., Christjansen K.N., Wulf B.S., Clausen J.T., Jensen P.B., Madsen O.D., Vrang N., Larsen P.J. and Hastrup S., "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin", *Nature*, V. 393, n° 6680, (1998), 72 - 76.
- 369.** Lebrethon M.C., Vandersmissen E., Gerard A., Parent A.S., Junien J.L. and Bourguignon J.P., "*In vitro* stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms", *Endocrinology*, V. 141, n° 4, (2000), 1464 - 1469.
- 370.** Caprio M., Fabbrini E., Isidori A.M., Aversa A. and Fabbri A., "Leptin in reproduction", *Trends in Endocrinology and Metabolism*, V. 12, n° 2, (2001), 65 - 72.
- 371.** Mizuno T.M., Kleopoulos S.P., Bergen H.T., Roberts J.L., Priest C.A. and Mobbs C.V., "Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting in *ob/ob* and *db/db* mice, but is stimulated by leptin", *Diabetes*, V. 47, n° 2, (1998), 294 - 297.
- 372.** Erickson J.C., Hollopeter G. and Palmiter R.D., "Attenuation of the obesity syndrome of *ob/ob* mice by the loss of neuropeptide Y", *Science*, V. 274, n° 5293, (1996), 1704 - 1707.
- 373.** Huszar D., Lynch C.A., Fairchild-Huntress V., Dunmore J.H., Fang Q. and Berkemeier L.R., "Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice", *Cell*, V. 88, n° 1, (1997), 131 - 141.
- 374.** Chen A.S., Marsh D.J., Trumbauer M.E., Frazier E.g. and Guan X.M. and Yu H., "Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass", *Nat Genet*, V. 26, n° 1, (2000), 97 - 102.
- 375.** Spicer L.J. and Francisco C.C., "The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function", *Endocrinology*, V. 138, n° 8, (1997), 3374 - 3379.

- 376.** Ryan N.K., Van der Hoek K.H., Robertson S.A. and Norman R.J., "Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary", *Endocrinology*, V. 144, n° 11, (2003), 5006 - 5013.
- 377.** Muñoz-Gutiérrez M., Findlay P.A., Adam C.L., Wax G., Campbell B.K., Kendall N.R., Khalid M., Forsberg M. and Scaramuzzi R.J., "The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion", *Reproduction*, V. 130, n° 6, (2005), 869 - 881.
- 378.** da Silveira Cavalcante F., Gombar F.M., Ferreira R.V., da Silva Faria T., Costa W.S., Sampaio F.J. and da Fonte Ramos C., "Maternal protein-energy and energy-restricted diets during lactation possibly could program folliculogenesis and the ovarian expression of leptin and its different isoform receptors in rats", *Fertil Steril*, V. 92, n° 5, (2009), 1755 - 1757.
- 379.** Ishikawa T., Fujioka H., Ishimura T., Takenaka A. and Fujisawa M., "Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients", *Andrologia*, V. 39, n° 1, (2007), 22 - 27.
- 380.** Chou S.H. and Mantzoros C., "20 years of leptin: role of leptin in human reproductive disorders", *J Endocrinol*, V. 223, n° 1, (2014), T49 - 62.
- 381.** Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D. Jr., Seeley R.J. and Baskin D.G., "Central nervous system control of food intake", *Nature*, V. 404, n° 6778, (2000), 661 - 671.
- 382.** Reichenbach A., Stark R. and Andrews B.Z. Hypothalamic control of food intake and energy metabolism Article · January (2012).
https://www.researchgate.net/publication/229433055_Hypothalamic_control_of_food_intake_and_energy_metabolism, Page consultée le : 05/04/2018.
- 383.** Sandalinas F., Drai J. Dugas J., Reitzer C., Copin N., Hausser F., Schweitzer B., Schontz D., Blanc S. et Simon C. « Le statut en vitamines anti-oxydantes module les effets de l'activité physique sur le niveau de leptine et sur les caractéristiques métaboliques liées au sur poids chez l'adolescent ». Elsevier Masson SAS, (2011), PO10, A26.
- 384.** Langeron M., « Précis de Microscopie », 7th ed. Masson & Cie, Paris, (1949), 1430 p.
- 385.** Pedersen T. and Peters H. "Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary", *J Reprod Fertil*, V. 17, n° 3, (1968) 555 - 557.
- 386.** Moss S., Wrewn T.R. and Sykes J.F., "Some histological and histochemical observations of the bovine ovary during the estrous cycle". *Anat. Rec.*, V. 120, (1954), 409 - 433.

- 387.** Byskov A.G., "Cell kinetic studies on follicular atresia in the mouse ovary", *J Reprod Fertil*, V. 37, (1974), 277 – 285
- 388.** Arrau J. et Chesne P., « Cinétique folliculaire et maturation ovocytaire chez le veau traité par l'acétate de fluorogestone et la PMSG », *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, V. 14, n° 4A, (1974), 633 - 650.
- 389.** Hage A.J., Groen-Klevant A.C. and Welschen R., "Follicle growth in the immature rat ovary", *Acta Endocrinol (Copenh)*, V. 88, n° 2, (1978), 375 - 382.
- 390.** Osman P., "Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat", *J Reprod Fertil*, V. 73, n° 1, (1985), 261- 270.
- 391.** Gosden R.G., Telfer E., Faddy M.J. and Brook D.J, "Ovarian cyclicity and Follicular recruitment in unilaterally ovariectomized mice", *J. Reprod.Fertility*, V. 87, (1989), 257 - 264.
- 392.** Yuan Y. and Foley G.L., "Female reproductive system", *In: "Handbook of Toxicologic Pathology"*, 2nd ed., V. 2., Haschek W.M., Rousseaux C.G. and Wallig M.S. eds., Academic Press, London, (2002), 847 - 894.
- 393.** Westwood F.R., "The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging", *Toxicol. Pathol*, V. 36, n° 3, (2008), 375 - 384.
- 394.** Coleman D.L., Dagg C.P., Fuller J.L., Green M.C., Kaliss N., Russell E.S. and Staats J.L.F.J., "Biology of the Laboratory Mouse", 2nd ed, Dover Publications, INC., New York: McGraw-Hill Book Company, (1966), 706 p.
- 395.** Bohler H., Mokshagundam S. and Winters S.J., "Adipose tissue and reproduction in women", *Fertil Steril*, V. 94, n° 3, (2010), 795 - 825.
- 396.** Yuan C.S., Attele A.S., Zhang L., Lynch J.P., Xie J.T. and Shi Z.Q., "Leptin reduces body weight gain in neonatal rats", *Pediatr Res*, V. 48, n° 3, (2000), 380 - 383.
- 397.** El-Shafaei M.A.A., Helmi A.M., Saaban M.M. and Mourad G.M., "Histological study of the effect of leptin hormone on the maturation of ovarian follicles of albinos rat", *Bull Alex Fac Med*, V. 42, n° 3, (2006), 867- 884.
- 398.** Duggal P.S., Van Der Hoek K.H., Milner C.R., Ryan N.K., Armstrong D.T., Magoffin D.A. and Norman R.J. "The *in vivo* and *in vitro* effects of exogenous leptin on ovulation in the rat", *Endocrinology*, V. 141, n° 6, (2000), 1971 - 1976.
- 399.** Kahn A., « Une confirmation : le produit du gène ob est bien une hormone agissant comme un lipostat », *Med Sci (Paris)*, V. 11, n° 10, (1995), 1463.

400. Luque R.M., Kineman R.D. and Tena-Sempere M., "Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line", *Endocrinology*, V. 148, n° 10, (2007), 4601 - 4611.
401. Sawchenko P.E., "Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in", *J Comp Neurol*, V. 402, n° 4, (1998), 435 - 441.
402. Castellano J.M., Navarro V.M., Fernández-Fernández R., Nogueiras R., Tovar S., Roa J., Vazquez M.J., Vigo E., Casanueva F.F., Aguilar E., Pinilla L., Dieguez C. and Tena-Sempere M., "Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition", *Endocrinology*, V. 146, n° 9, (2005), 3917 - 3925.
403. Castellano J.M., Bentsen A.H., Mikkelsen J.D. and Tena-Sempere M., "Kisspeptins: bridging energy homeostasis and reproduction", *Brain Res*, V. 1364, (2010), 129 - 138
404. Luo Q.Q., Hou Y., Yin N. and Zhang H.Q., "Expression of kisspeptin/kiss1r system in developing hypothalamus of female rat and the possible effects on reproduction development and maintenance", *J Chin Med Assoc*, V. 79, n° 10, (2016), 546 - 553.
405. Irwig M.S., Fraley G.S., Smith J.T., Acohido B.V, Popa S.M., Cunningham M.J., Gottsch M.L., Clifton D.K. and Steiner R.A., "Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat" *Neuroendocrinology*, V. 80, n° 4, (2004), 264 - 272.
406. Matsui H., Takatsu Y., Kumano S., Matsumoto H. and Ohtaki T., "Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 320, n° 2, (2004), 383 - 388.
407. Navarro V.M., Castellano J.M., Fernandez-Fernandez R., Barreiro M.L., Roa J., Sanchez-Criado J.E., Aguilar E., Dieguez C., Pinilla L. and Tena-Sempere M., "Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide" *Endocrinology*, V. 145, n° 10, (2004), 4565 - 4574.
408. Messager S., Chatzidaki E.E., Ma D., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Thresher R.R., Malinge I., Lomet D., Carlton M.B., Colledge W.H., Caraty A. and Aparicio S.A., "Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 102, n° 5, (2005), 1761 - 1766.
409. Shahab M., Mastronardi C., Seminara S.B., Crowley W.F., Ojeda S.R. and Plant T.M., "Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 102, n° 6, (2005), 2129 - 2134.

- 410.** Smith J.T., Dungan H.M., Stoll E.A., Gottsch M.L., Braun R.E., Eacker S.M., Clifton D.K. and Steiner R.A., "Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse", *Endocrinology*, V. 146, n° 7, (2005b), 2976 - 2984.
- 411.** Trayhurn P., Duncan J.S. and Rayner D.V., "Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system", *Biochem J*, V. 311, Pt 3, (1995), 729 - 733.
- 412.** Scholz G.H., Englaro P., Thiele I., Scholz M., Klusmann T., Kellner K., Rascher W. and Blum W.F., "Dissociation of serum leptin concentration and body fat content during long term dietary intervention in obese individuals", *Horm Metab Res*, V. 28, n° 12, (1996), 718 - 723.
- 413.** Weigle D.S., Duell P.B., Connor W.E., Steiner R.A., Soules M.R. and Kuijper J.L., "Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 82, n° 2, (1997), 561 - 565.
- 414.** Cha M.C. and Jones P.J., "Dietary fat type and energy restriction interactively influence plasma leptin concentration in rats", *J Lipid Res*, V. 39, n° 8, (1998), 1655 - 1660.
- 415.** Monti V., Carlson J.J., Hunt S.C. and Adams T.D., "Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults", *J Am Diet Assoc*, V. 106, n° 6, (2006), 822 - 828.
- 416.** Boden G., Chen X., Mozzoli M. and Ryan I., "Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 81, n° 9, (1996), 3419 - 3423.
- 417.** Collins S. and Surwit R.S., "Pharmacologic manipulation of ob expression in a dietary model of obesity", *J Biol Chem*, V. 271, n° 16, (1996), 9437 - 9440.
- 418.** Reseland J.E., Haugen F., Hollung K., Solvoll K., Halvorsen B., Brude I.R., Nenseter M.S., Christiansen E.N. and Drevon C.A., "Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids", *J Lipid Res*, V. 42, n° 5, (2001), 743 - 750.
- 419.** Pieke B., von Eckardstein A., Gülbahçe E., Chirazi A., Schulte H., Assmann G. and Wahrburg U., "Treatment of hypertriglyceridemia by two diets rich either in unsaturated fatty acids or in carbohydrates: effects on lipoprotein subclasses, lipolytic enzymes, lipid transfer proteins, insulin and leptin", *Int J Obes Relat Metab Disord*, V. 24, n° 10, (2000), 1286 - 1296.
- 420.** López-Rodríguez G., Kotasek Osuna S., Galván García M. and Suárez Dieguez T., "Effects of dietary high fructose corn syrup on regulation of energy intake and leptin gene expression in rats", *Rev Nutr, Campinas*, V. 28, n° 6, (2015), 597 - 605.

- 421.** Abraham M.A., Rasti1 M., Bauer P.V. and Lam T.K.T., "Leptin enhances hypothalamic LDHA-dependent glucose sensing to lower glucose production in high-fat fed rats", *J Biol Chem*, V. 293, n° 11, (2018), 4159 - 4166.
- 422.** Licinio J., Negrao A.B., Mantzoros C., Kaklamani V., Wong M. and Bongiorno P.B., "Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and oestradiol in healthy women", *Proc Natl Acad Sci*, V. 95, n° 5, (1998), 2541 - 2546.
- 423.** Ong K.K., Ahmed M.L. and Dunger D.B., "The role of leptin in human growth and puberty", *Acta Paediatr Suppl*, V. 88, n° 433, (1999), 95 - 98.
- 424.** Chehab F.F., Mounzih K., Lu R. and Lim ME., "Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin", *Science*, V. 275, n° 5296, (1997), 88-90.
- 425.** Ongphiphadhanakul B., Rajatanavin R., Chanprasertyothin S., Piaseu N. and Chailurkit L. "Serum leptin concentrations in relation to body fat, gender, sex hormones and metabolic covariates in Thais", *J Med Assoc Thai*, V. 82, n° 9, (1999), 862 - 867.
- 426.** Peters J.H., Simasko S.M. and Ritter R.C., "Leptin analog antagonizes leptin effects on food intake and body weight but mimics leptin-induced vagal afferent activation", *Endocrinology*, V. 148, n° 6, (2007), 2878 - 2885.
- 427.** Buisson A., Pellizzon M., Ordiz F. Jr. and Jen K.L., "Augmenting leptin circadian rhythm following a weight reduction in diet-induced obese rats: short- and long-term effects", *Metabolism*, V. 53, n° 6, (2004), V 782 - 789.
- 428.** Zhang Y. and Scarpace P.J., "The role of leptin in leptin resistance and obesity", *Physiol Behav*, V. 88, n° 3, (2006), 249 - 256.
- 429.** Van Heek M., Compton DS., France C.F., Tedesco R.P., Fawzi A.B., Graziano M.P., Sybertz E.J., Strader C.D. and Davis Jr. H.R., "Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin", *J Clin Invest*, V. 99, n° 3, (1997), 385 - 390.
- 430.** Sasaki T., "Age-Associated Weight Gain, Leptin, and SIRT1: A Possible Role for Hypothalamic SIRT1 in the Prevention of Weight Gain and Aging through Modulation of Leptin Sensitivity", *Front Endocrinol (Lausanne)*, (2015), V. 6, 109.
- 431.** Toste F.P., de Moura E.G., Lisboa P.C., Fagundes A.T., de Oliveira E. and Passos M.C., "Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats", *Br J Nutr*, V. 95, n° 4, (2006), 830 - 837.

- 432.** Fernandez-Galaz C., Fernandez-Agullo T., Campoy F., Arribas C., Gallardo N., Andres A., Ros M. and Carrascosa J.M., “Decreased leptin uptake in hypothalamic nuclei with ageing in Wistar rats”, *J Endocrinol*, V. 171, n° 1, (2001), 23 - 32.
- 433.** Scarpace P.J., Matheny M. and Tümer N., “Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats”, *Neuroscience*, V. 104, n° 4, (2001), 1111 - 1117.
- 434.** Mazar R., Friedmann-Morvinski D., Alsaigh T., Kleifeld O., Kistler E.B., Rousso-Noori L., Huang C., Li J.B., Verma I.M. and Schmid-Schönbein G.W., “Cleavage of the leptin receptor by matrix metalloproteinase-2 promotes leptin resistance and obesity in mice”, *Sci Transl Med*, V. 10, n° 455, (2018), pii: eaah6324.
- 435.** Jansson J.O., Palsdottir V., Hägg D.A., Schéle E., Dickson S.L., Anesten F., Bake T., Montelius M., Bellman J., Johansson M.E., Cone R.D., Drucker D.J., Wu J., Aleksic B., Törnqvist A.E., Sjögren K., Gustafsson J.Å., Windahl S.H. and Ohlsson C., “Body weight homeostat that regulates fat mass independently of leptin in rats and mice”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, V. 115, n° 2, (2018), 427 - 432.
- 436.** Ohlsson C., Hägg D.A., Hammarhjelm F., Dalmau Gasull A., Bellman J., Windahl S.H., Palsdottir V. and Jansson J.O., “The Gravitostat Regulates Fat Mass in Obese Male Mice While Leptin Regulates Fat Mass in Lean Male Mice”. *Endocrinology*, V. 159, n° 7, (2018), 2676 - 2682.
- 437.** Panwar S., Herrid M., Kauter K.G. and McFarlane J.R., “Effect of passive immunization against leptin on ovarian follicular development in prepubertal mice”, *J Reprod Immunol*, V. 96, n° 1-2, (2012), 19 - 24.
- 438.** McFarlane J., Herrid M. and Palanisamy S., “Ovarian Sensitivity to Gonadotrophins is Increased by Passive Immunization Against Leptin”, Conference Paper, The annual scientific meeting of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology, At Melbourne, (2014).
- 439.** Barash I.A., Cheung C.C., Weigle D.S., Ren H., Kabigting E.B., Kuijper J.L., Clifton D.K. and Steiner R.A., “Leptin is a metabolic signal to the reproductive system”, *Endocrinology*, V. 137, n° 7, (1996), 3144 - 3147.
- 440.** Smith J.T., Acohido B.V., Clifton D.K. and Steiner R.A., “KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the *ob/ob* mouse”, *J Neuroendocrinol*, V. 18, n° 4, (2006), 298 - 303
- 441.** Nizard J., Dommergues M., Dommergue M. and Clément K., “Pregnancy in a woman with a leptin-receptor mutation”, *N Engl J Med*, V. 366, n° 11, (2012), 1064 - 1065.

442. Ojeda S.R., Wheaton J.E., Jameson H.E. and McCann S.M., "The onset of puberty in the female rat. I. Changes in plasma prolactin, gonadotropins, LHRH levels and hypothalamic LHRH content", *Endocrinology*, V. 98, n° 3, (1976), 630 - 638.
443. Advis J.P., Andrews W.W. and Ojeda S.R., "Changes in ovarian steroidal and prostaglandin E responsiveness to gonadotropins during the onset of puberty in the female rat", *Endocrinology*, V. 104, n° 3, (1979), 653 - 658.
444. vom Saal F.S., Finch C.E. and Nelson J.F., "Natural history and mechanism of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates", *In: "The Physiology of Reproduction"*, 2nd ed., Knobil E. and Neil J.D. eds., Raven Press, New York, (1994), 1213 - 1314.
445. Maeda K., Ohkura S., Tsukamura H., "Physiology of Reproduction", *In: "The Laboratory Rat"*, Krinke G.J. editor, 1st ed., London, Academic Press, (2000), 145 - 174.
446. Hubscher C.H., Brooks D.L. and Johnson J.R., "A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle", *Biotech Histochem*, V. 80, n° 2, (2005), 79 - 87.
447. Ojeda S.R. and Andrews W.W., "A detailed analysis of the serum LH secretory profiles of conscious free-moving female rats during the time of puberty", *Endocrinology*, V. 109, n° 6, (1981), 2032 - 2039.
448. Ojeda S.R. and Urbanski H.F., "Puberty in the rat", *In: "The Physiology of Reproduction"*, 2nd ed. (Knobil E. and Neill J.D. eds.), Raven Press, New York. (1994), 363 - 409,
449. Slot K.A., Voorendt M., de Boer-Brouwer M., van Vugt H.H. and Teerds K.J., "Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary", *J Endocrinol*, V. 188, n° 2, (2006), 179 - 192.
450. Mermillod P., Dalbiès-Tran R., Uzbekova S., Thélie A., Traverso J.M., Perreau C., Papillier P. and Monget P., "Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle?", *Reprod Domest Anim*, V. 43, Suppl 2, (2008), 393 - 400.
451. Brown J.E. and Dunmore S.J., "Leptin decreases apoptosis and alters BCL-2 : Bax ratio in clonal rodent pancreatic beta-cells", *Diabetes Metab Res Rev*, V. 23, n° 6, (2007), 497-502.
452. Sirotkin A.V. and Grossmann R., "Leptin directly controls proliferation, apoptosis and secretory activity of cultured chicken ovarian cells", *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, V. 148, n° 2, (2007), 422 - 429

- 453.** Lam Q.L., Wang S., Ko O.K., Kincade P.W. and Lu L., "Leptin signaling maintains B-cell homeostasis via induction of Bcl-2 and Cyclin D1", Proc Natl Acad Sci U S A, V. 107, n° 31, (2010), 13812 - 13817.
- 454.** Almog B., Gold R., Tajima K., Dantes A., Salim K., Rubinstein M., Barkan D., Homburg R., Lessing J.B., Nevo N., Gertler A. and Amsterdam A., "Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats", Mol Cell Endocrinol, V. 183, n° 1-2, (2001), 179 - 191.
- 455.** Dineva J., Wojtowicz A.K., Augustowska K., Vangelov .I., Gregoraszczuk E.L. and Ivanova M.D., "Expression of atrial natriuretic peptide, progesterone, apoptosis-related proteins and caspase-3 in *in vitro* luteinized and leptin-treated porcine granulosa cells", Endocr Regul, V. 41, n° 1, (2007), 11 - 18.
- 456.** Seifer D.B. and Merhi Z. "Is AMH a regulator of follicular atresia?", J Assist Reprod Genet, V. 31, n° 11, (2014), 1403 - 1407.
- 457.** Sirotkin A.V., Benčo A., Tandlmajerová A. and Vašíček D., "Involvement of transcription factor p53 and leptin in control of porcine ovarian granulosa cell functions", Cell Prolif, V. 45, n° 1, (2012), 9 - 14.
- 458.** Sirotkin A.V., Mlyncek M., Makarevich A.V., Florkovicová I. and Hetényi L., "Leptin affects proliferation-, apoptosis- and protein kinase A-related peptides in human ovarian granulosa cells", Physiol Res, V. 57, n° 3, (2008), 437 - 442.
- 459.** Bilbao M.G., Di Yorio M.P., Galarza R.A., Varone C.L. and Faletti A.G., "Regulation of the ovarian oxidative status by leptin during the ovulatory process in rats", Reproduction, V. 149, n° 4, (2015), 357 - 366.
- 460.** Matzuk M.M., Burns K.H., Viveiros M.M. and Eppig J.J., "Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation", Science, V. 296, n° 5576, (2002), 2178 - 2180.
- 461.** Glister C., Groome N.P. and Knight P.G., "Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid", Journal of Endocrinology, V. 188, n° 2,(2006), 215 -.225.
- 462.** Eppig J.J., "Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells", Bio essays, V. 13, n° 11, (1991), 569 - 574.
- 463.** Mehlmann L.M., Jones T.L. and Jaffe L.A., "Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte", Science, V. 297, n° 5585, (2002), 1343 - 1345.

- 464.** Mehlmann L.M., "Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation", *Reproduction*, V. 130, n° 6, (2005), 791 - 799.
- 465.** Wolf G., Hamann A., Han D.C., Helmchen U., Thaiss F., Ziyadeh F.N. and Stahl R.A., "Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis", *Kidney Int*, V. 56, n° 3, (1999), 860 - 872.
- 466.** Leung J.C., Chan L.Y., Tang S.C., Chu K.M. and Lai K.N., "Leptin induces TGF-beta synthesis through functional leptin receptor expressed by human peritoneal mesothelial cell", *Kidney Int*, V. 69, n° 11, (2006), 2078 - 2086.
- 467.** Zachow R.J., Weitsman S.R. and Magoffin D.A., "Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-beta of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells", *Biol Reprod*, V. 61, n° 4, (1999), 1104 - 1109.
- 468.** Ding X., Kou X., Zhang Y., Zhang X., Cheng G. and Jia T. "Leptin siRNA promotes ovarian granulosa cell apoptosis and affects steroidogenesis by increasing NPY2 receptor expression", *Gene*, V. 633, (2017), 28 - 34.
- 469.** Norris R.P., Freudzon M., Mehlmann L.M., Cowan A.E., Simon A.M., Paul D.L., Lampe P.D. and Jaffe L.A., "Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation, and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption", *Development*, V. 135, n° 19, (2008), 3229 - 3238.
- 470.** Granot I. and Dekel N., "Phosphorylation and expression of connexin-43 ovarian gap junction protein are regulated by luteinizing hormone", *J Biol Chem*, V. 269, n° 48, (1994), 30502 - 30509.
- 471.** Kalma Y., Granot I., Galiani D., Barash A. and Dekel N., "Luteinizing Hormone-Induced Connexin 43 Down-Regulation: Inhibition of Translation", *Endocrinology*, V.145, n° 4, (2004), 1617 - 1624.
- 472.** Deng Z.H., Liao J., Zhang J.Y., Liang C., Song C.H., Han M., Wang L.H., Xue H., Zhang K., Zabeau L., Tavernier J. and Yan G.T., "Inhibition of the connexin 43 elevation may be involved in the neuroprotective activity of leptin against brain ischemic injury", *Cell Mol Neurobiol*, V. 34, n° 6, (2014), 871 - 879.
- 473.** Miyoshi Y., Funahashi T., Tanaka S., Taguchi T., Tamaki Y., Shimomura I. and Noguchi S., "High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels", *Int J Cancer*, V. 118, n° 6, (2006), 1414 - 1419.

- 474.** Chen D.C., Chung Y.F., Yeh Y.T., Chaung H.C., Kuo F.C., Fu O.Y., Chen H.Y., Hou M.F. and Yuan S.S., "Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients", *Cancer Lett*, V. 237, n° 1, (2006) , 109 - 114.
- 475.** Grossmann M.E., Ray A., Dogan S., Mizuno N.K. and Cleary M.P., "Balance of adiponectin and leptin modulates breast cancer cell growth", *Cell Res*, V. 18, n° 11, (2008), 1154 - 1156.
- 476.** Dekel N., "Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation", *Mol Cell Endocrinol*, V. 234, n° 1-2, (2005), 19 - 25.
- 477.** Kakisina P. and Indra R., "The role of leptin toward the activity of maturation-promoting factor (MPF) at oocyte maturation", *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, V. 24, n° 1, (2008), 36 - 43.
- 478.** Araki K., Naito K., Haraguchi S., Suzuki R., Yokoyama M., Inoue M., Aizawa S., Toyoda Y. and Sato E., "Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase", *Biol Reprod*, V. 55, n° 6, (1996), 1315 - 1324.
- 479.** van Tol H.T. , van Eerdenburg F.J., Colenbrander B. and Roelen B.A., "Enhancement of Bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells", *Mol Reprod Dev*, V. 75, n° 4, (2008), 578 - 587.
- 480.** Peng X.R., Hsueh A.J., LaPolt P.S., Bjersing L. and Ny T., "Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation", *Endocrinology*, V. 129, n° 6, (1991), 3200 - 3207.
- 481.** Nair A.K., Kash J.C., Peegel H. and Menon K.M., "Post-transcriptional regulation of luteinizing hormone receptor mRNA in the ovary by a novel mRNA-binding protein", *J Biol Chem*, V. 277, n° 24, (2002), 21468 - 21473.
- 482.** Ryan N.K., Woodhouse C.M., Van der Hoek K.H., Gilchrist R.B., Armstrong D.T. and Norman R.J., "Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation", *Biology of Reproduction*, V. 66, n° 5, (2002), 1548 - 1554.
- 483.** Ruiz-Cortes Z.T., Martel-Kennes Y., Gevry N.Y., Downey B.R., Palin M.F. and Murphy B.D., "Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells", *Biology of Reproduction*, V. 68, n° 3, (2003), 789 - 796.
- 484.** Dupuis L., Schuermann Y., Cohen T., Siddappa D., Kalaiselvanraja A., Pansera M., Bordignon V. and Duggavathi R., "Role of leptin receptors in granulosa cells during ovulation", *Reproduction*, V. 147, n° 2, (2013), 221 - 229.

- 485.** Duggavathi R., Volle D.H., Mataki C., Antal M.C., Messaddeq N., Auwerx J., Murphy B.D. and Schoonjans K., "Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation", *Genes and Development*, V. 22, n° 14, (2008), 1871 - 1876.
- 486.** Lydon J.P., DeMayo F.J., Funk C.R., Mani S.K., Hughes A.R., Montgomery C.A. Jr., Shyamala G., Conneely O.M. and O'Malley B.W., "Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities", *Genes and Development*, V. 9, n° 18, (1995), 2266 - 2278.
- 487.** Sterneck E., Tessarollo L. and Johnson P.F., "An essential role for C/EBP β in female reproduction", *Genes and Development*, V. 11, n° 17, (1997), 2153 - 2162.
- 488.** Fan H.Y., Liu Z., Johnson P.F. and Richards J.S., "CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)- α and - β are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes", *Molecular Endocrinology*, V. 25, n° 2, (2011), 253 - 268.
- 489.** Gao J., Tian J., Lv Y., Shi F., Kong F., Shi H. and Zhao L., "Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells", *Cancer Science*, V. 100, n° 3, (2009), 389 - 395.
- 490.** Hsu Y.H., Cheng C.Y., Chen Y.C., Chen T.H., Sue Y.M., Tsai W.L. and Chen C.H., "Long-term leptin treatment exerts a pro-apoptotic effect on renal tubular cells via prostaglandin E2 augmentation", *European Journal of Pharmacology*, V. 689, n° 1-3, (2012), 65 - 71.
- 491.** Manuel-Apolinar L., Lopez-Romero R., Zarate A., Damasio L., Ruiz M., Castillo-Hernandez C., Guevara G. and Mera-Jimenez E., "Leptin mediated ObRb receptor increases expression of adhesion intercellular molecules and cyclooxygenase 2 on murine aorta tissue inducing endothelial dysfunction", *Int J Clin Exp Med.*, V. 6, n° 3, (2013), 192 - 196.
- 492.** Di Yorio M.P., Bilbao M.G., Biagini-Majorel A.M. and Faletti A.G., "Ovarian signalling pathways regulated by leptin during the ovulatory process", *Reproduction*, V. 146, n° 6, (2013), 647 - 658.
- 493.** Zhang Y., Olbort M., Schwarzer K., Nuesslein-Hildesheim B., Nicolson M., Murphy E., Kowalski T.J., Schmidt I. and Leibel R.L., "The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 240, n° 2, (1997b), 492 - 495.
- 494.** Amico J.A., Thomas A., Crowley R.S. and Burmeister L.A., "Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue", *Life Sci*, V. 63, n° 16, (1998), 1387 - 1395.

495. Luukkaa V., Savontaus E., Rouru J., Virtanen K.A., Boss O., Huhtaniemi I., Koulu M, Pesonen U. and Huupponen R., "Effects of estrous cycle and steroid replacement on the expression of leptin and uncoupling proteins in adipose tissue in the rat", *Gynecol Endocrinol*, V. 15, n° 2, (2001), 103 - 112.
496. Kawamura K., Sato N., Fukuda J., Kodama H., Kumagai J., Tanikawa H., Nakamura A. and Tanaka T., "Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*", *Endocrinology*, V. 143, n° 5, (2002), 1922 - 1931.
497. Hileman S.M., Pierroz D.D., Masuzaki H., Bjørbæk C., El-Haschimi K., Banks W.A. and Flier J.S., "Characterization of Short Isoforms of the Leptin Receptor in Rat Cerebral Microvessels and of Brain Uptake of Leptin in Mouse Models of Obesity", *Endocrinology*, V.143, n° 3, (2002), 775 - 783.
498. Craig J., Zhu H., Dyce P.W., Petrik J. and Li J., Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*, V. 145, n° 11, (2004), 5355 - 5363.
499. Khaki A., Batavani R1., Najafi G., Tahmasbian H., Belbasi A. and Mokarizadeh A., "Effect of leptin on *in vitro* nuclear maturation and apoptosis of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte", *Int J Fertil Steril*, V. 8, n° 1, (2014), 43 - 50.
500. Spicer L.J. and Francisco C.C., "Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis", *Biol Reprod*, V. 58, n° 1, (1998), 207 - 212.
501. Agarwal S.K., Vogel K., Weitsman S.R. and Magoffin D.A., "Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 84, n° 3, (1999), 1072 - 1076.
502. Barkan D., Jia H., Dantes A., Vardimon L., Amsterdam A. and Rubinstein M., "Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis", *Endocrinology*, V. 140, n° 4, (1999), 1731 - 1738.
503. Matsuoka T., Tahara M., Yokoi T., Masumoto N., Takeda T., Yamaguchi M., Tasaka K., Kurachi H. and Murata Y., "Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 256, n° 3, (1999), 480 - 384.
504. Swain J.E., Dunn R.L., McConnell D., Gonzalez-Martinez J. and Smith G.D., "Direct effects of leptin on mouse reproductive function: regulation of follicular, oocyte, and embryo development", *Biology of Reproduction*, V. 71, n° 5, (2004), 1446 - 1452.
505. Barroso G., Barrionuevo M., Rao P., Graham L., Danforth D., Huey S., Abuhamad A. and Oehninger S., "Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients", *Fertility and Sterility*, V. 72, n° 6, (1999), 1024 - 1026.

- 506.** Brannian J.D. and Hansen K.A., "Leptin and ovarian folliculogenesis: implications for ovulation induction and ART outcomes", *Semin Reprod Med*, V. 20, n° 2, (2002), 103 - 112.
- 507.** Van Blerkom J., Antczak M. and Schrader R., "The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perfollicular blood flow characteristics", *Human Reproduction*, V. 12, n° 5, (1997), 1047 -1055.
- 508.** Alfer J., Müller-Schöttle F., Classen-Linke I., von Rango U., Happel L., Beier-Hellwig K., Rath W. and Beier H.M., "The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility", *Mol Hum Reprod*, V. 6, n° 7, (2000), 595 - 601.
- 509.** Castellucci M., De Matteis R., Meisser A., Canello R., Monsurrò V., Islami D., Sarzani R., Marzioni D., Cinti S. and Bischof P., "Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion", *Mol Hum Reprod*, V. 6, n° 10, (2000), 951 - 958.
- 510.** González R.R., Caballero-Campo P., Jasper M., Mercader A., Devoto L., Pellicer A. and Simon C., "Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 85, n° 12, (2000), 4883 - 4888.
- 511.** Kawamura K., Sato N., Fukuda J., Kodama H., Kumagai J., Tanikawa H., Murata M. and Tanaka T., "The role of leptin during the development of mouse preimplantation embryos", *Mol Cell Endocrinol*, V. 202, n° 1-2, (2003), 185 - 189.
- 512.** Brannstrom M. and Norman R.J., "Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function", *Hum Reprod*, V. 8, n° 10, (1993), 1762 - 1775.
- 513.** Gainsford T., Willson T.A., Metcalf D., Handman E., McFarlane C., Ng A, Nicola N.A., Alexander W.S. and Hilton D.J., "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells", *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 93, n° 25, (1996), 14564 - 14568.
- 514.** Santos-Alvarez J., Goberna R. and Sanchez Margalet V., "Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes" *Cell Immunol*, V. 194, n° 1, (1999), 6 - 11.
- 515.** Gabay C., Dreyer M., Pellegrinelli N., Chicheportiche R. and Meier C.A., "Leptin directly induces the secretion of interleukin 1 receptor antagonist in human monocytes", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 86, n° 2, (2001), 783 - 791.

- 516.** Loffreda S., Yang S.Q., Lin H.Z., Karp C.L., Brengman M.L., Wang D.J., Klein A.S., Bulkley G.B., Bao C., Noble P.W., Lane M.D. and Diehl A.M., "Leptin regulates proinflammatory immune responses", *FASEB J*, V. 12, n° 1, (1998), 57 - 65.
- 517.** Van der Hoek K.H., Maddocks S., Woodhouse C.M., van Rooijen N., Robertson S.A. and Norman R.J., "Intrabursal injection of clodronate liposomes causes macrophage depletion and inhibits ovulation in the mouse ovary", *Biol Reprod*, V. 62, n° 4, (2000), 1059 - 1066.
- 518.** Archanco M., Muruzábal F.J., Llopiz D., Garayoa M., Gómez-Ambrosi J., Frühbeck G. and Burrell M.A., "Leptin expression in the rat ovary depends on estrous cycle", *J Histochem Cytochem*, V. 51, n° 10, (2003), 1269 - 1277.
- 519.** Olatinwo M.O., Bhat G.K., Stah C.D. and Mann D.R., "Impact of gonadotropin administration on folliculogenesis in prepubertal *ob/ob* mice", *Mol Cell Endocrinol*, V. 245, n° 1-2, (2005), 121 - 127.
- 520.** Ma X., Hayes E., Prizant H., Srivastava R.K., Hammes S.R. and Sen A., "Leptin-Induced CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) Is a Novel Intraovarian Mediator of Obesity-Related Infertility in Females", *Endocrinology*, V. 157, n° 3, (2016), 1248 - 1257.
- 521.** Tamer Erel C. and Senturk L.M., "The impact of body mass index on assisted reproduction", *Curr Opin Obstet Gynecol*, V. 21, n° 3, (2009), 228 - 235.
- 522.** Serke H., Nowicki M., Kosacka J., Schröder T., Klötting N., Blüher M., Kallendrusch S. and Spaniel-Borowski K., "Leptin-deficient (*ob/ob*) mouse ovaries show fatty degeneration, enhanced apoptosis and decreased expression of steroidogenic acute regulatory enzyme", *Int J Obes (Lond)*, V. 36, n° 8, (2012), 1047 - 1053.
- 523.** Poretsky L., Cataldo N.A., Rosenwaks Z. and Giudice L.C., "The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease", *Endocr Rev*, V. 20, n° 4, (1999), 535 - 582
- 524.** Duggal P.S., Ryan N.K., Van der Hoek K.H., Ritter L.J., Armstrong D.T., Magoffin D.A. and Norman R.J., "Effects of leptin administration and feed restriction on thecal leucocytes in the preovulatory rat ovary and the effects of leptin on meiotic maturation, granulosa cell proliferation, steroid hormone and PGE2 release in cultured rat ovarian follicles", *Reproduction*, V. 123, n° 6, (2002), 891 - 898.
- 525.** Garcia M.R., "Leptin Contributes to the Development of the Corpus Luteum", *Cell Dev Biol*, V. 6, n° 3, (2017), 190.
- 526.** Ramirez M.A., Arellano A.A., Xie F., Benavides E.A., Katchko R.A., Ayala L., Calderon A., Flores R.A., Escudero J.M., Keisler D.H., Stanko R.L. and Garcia M.R.,

"The role of leptin in the development of the corpus luteum", In "Leptin", Chapter 2, Nova Science Publisher, Inc, (2017), 73-101.

- 527.** Takasaki A., Tamura H., Taniguchi K., Asada H., Taketani T., Matsuoka A., Yoshiaki Yamagata Y., Shimamura K., H., and Sugino N., "Luteal blood flow and luteal function", *J Ovarian Res*, (2009); 2: 1.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2633338/>, Page consultée le : 09/03/2019
- 528.** Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L. and Schuh A.C., "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice", *Nature*, V. 376, (1995), 62 - 66.
- 529.** Susuki T., Sasano H., Takaya R., Fukaya T., Yajima A. and Nagura H., "Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries", *Hum Reprod*, V.13, n° 4, (1998), 953 - 959.
- 530.** Reynolds L.P. and Redmer D.A., "Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary", *Am Soc Anim Sci*, V. 76, n° 6, (1998), 1671 - 1681.
- 531.** Cao R., Brakenhielm E., Wahlestedt C., Thyberg J. and Cao Y., "Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF", *Proc Natl Acad Sci U S A*, V. 98, n° 11, (2001), 6390 - 6395.
- 532.** Wiles J.R., Katchko R.A., Aguirre E.A., Mahan M.D., O'Gorman C.W., Escudero J.M., Keisler D.H., Stanko R.L. and Garcia M.R., "The effect of leptin on luteal angiogenic factors during the luteal phase of the estrous cycle in goats", *Anim Reprod Sci*, V. 148, n° 3-4, (2014), 121 - 129.
- 533.** Kimura K., Tsuda K., Baba A., Kawabe T., Boh-oka S., Ibata M., Moriwaki C., Hano T. and Nishio I, "Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin", *Biochem Biophys Res Commun*, V. 273, n° 2, (2000), 745-749.
- 534.** Lembo G., Vecchione C., Fratta L., Marino G., Trimarco V., D'Amati G. and Trimarco B, "Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms", *Diabetes*, V. 49, n° 2, (2000), 293-297.
- 535.** Nakagawa K., Higashi Y., Sasaki S., Oshima T., Matsuura H. and Chayama K., "Leptin causes vasodilation in humans", *Hypertens Res*. V. 25, n° 2, (2002), 161-165.
- 536.** Matsuda K., Teragawa H., Fukuda Y., Nakagawa K., Higashi Y. and Chayama K., "Leptin causes nitric-oxide independent coronary artery vasodilation in humans", *Hypertens Res*, V. 26, n° 2, (2003), 147-152.

- 537.** Moschos S., Chan J.L. and Mantzoros C.S., "Leptin and reproduction: a review", *Fertility and Sterility*, V. 77, n° 3, (2002), 433 - 444.
- 538.** Zuure W.A., Roberts A.L., Quennell J.H. and Anderson G.M., "Leptin signaling in GABA neurons, but not glutamate neurons, is required for reproductive function", *J. Neurosci*, V. 33, n° 45, (2013), 17874 - 17883.
- 539.** Martin C., Navarro V.M., Simavli S., Vong L., Carroll R.S., Lowell B.B. and Kaiser UB., "Leptin-responsive GABAergic neurons regulate fertility through pathways that result in reduced kisspeptinergic tone", *J. Neurosci.*, V. 34, n° 14, (2014), 6047 - 6056.
- 540.** Ramos-Lobo A.M., Teixeira P.D., Furigo I.C., Melo H.M., de M Lyra E Silva N., De Felice F.G. and Donato J Jr., "Long-term consequences of the absence of leptin signaling in early life", *Elife*, V. 8, (2019), pii: e40970.
- 541.** Houseknecht K.L., Baile C.A., Matteri R.L. and Spurlock M.E., "The biology of leptin: a review", *J Anim Sci*, V. 76, n° 5, (1998), 1405 - 1420.
- 542.** Strobel A., Issad T., Camoin L., Ozata M. and Strosberg A.D., "A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity", *Nat Genet*, V. 18, n° 3, (1998), 213 - 215.
- 543.** Clément K., Vaisse C., Lahlou N., Cabrol S., Pelloux V., Cassuto D., Gormelen M., Dina C., Chambaz J., Lacorte J.M., Basdevant A., Bougnères P., Lebouc Y., Froguel P. and Guy-Grand B., "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction", *Nature*, V. 392, n° 6674, (1998), 398 - 401.
- 544.** Brothers K.J., Wu S., DiVall S.A., Messmer M.R., Kahn C.R., Miller R.S., Radovick S., Wondisford F.E. and Wolfe A., "Rescue of obesity-induced infertility in female mice due to a pituitary-specific knockout of the insulin receptor", *Cell Metab*, V. 12, n° 3, (2010), 295 - 305.
- 545.** Yen S.S., Vela P. and Rankin J., "Inappropriate secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, V. 30, n° 4, (1970), 435 - 442.
- 546.** Balen A.H., "Hypersecretion of luteinizing hormone and the polycystic ovary syndrome", *Human Reproduction*, V. 8, Suppl 2, (1993), 123 - 128.
- 547.** Butzow T.L., Lehtovirta M., Siegborg R., Hovatta O., Koistinen R., Seppala M. and Apter D., "The decrease in luteinizing hormone secretion in response to weight reduction is inversely related to the severity of insulin resistance in overweight women", *J Clinical Endocrinol Metab*, V. 85, n° 9, (2000), 3271 - 3275.

- 548.** Sharpe R.M. and Franks S., "Environment, lifestyle and infertility - an inter-generational issue", *Nat Cell Biol, Suppl*, (2002), s 33 - 40.
- 549.** Grodstein F., Goldman M.B. and Cramer D.W., "Body mass index and ovulatory infertility," *Epidemiology*, V. 5, n° 2, (1994), 247 - 250.
- 550.** Salazar-Ortiz J., Audouin E., Delpuech T., Monget P. et Guillaume D., « Effet du niveau alimentaire sur la croissance folliculaire et certains taux hormonaux plasmatiques de la jument ». *Les Haras Nationaux*, 31^{ème} journée d'étude, (2004), 15 - 27.
- 551.** Haspolat K., Ece A., Gürkan F., Atamer Y., Tutanç M. and Yolbaş I., "Relationships between leptin, insulin, IGF-1 and IGFBP-3 in children with energy malnutrition", *Clinical Biochemistry*, V. 40, n° 3-4, (2007), 201 - 205.
- 552.** Kitawaki J., Kusuki I., Koshiba H., Tsukamoto K. and Honjo H., "Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells", *Mol Hum Reprod*, V. 5, n° 8, (1999), 708 - 713.
- 553.** Ghizzoni L., Barreca A., Mastorakos G, Furlini M, Vottero A, Ferrari B, Chrousos G.P. and Bernasconi S., "Leptin inhibits steroid biosynthesis by human granulosa-lutein cells", *Horm Metab Res*, V. 33, n° 6, (2001), 323 - 328.
- 554.** Catalano S., Marsico S., Giordano C., Mauro L., Rizza P., Panno M.L. and Andò S., "Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line", *J Biol Chem*, V. 278, n° 31, (2003), 28668 - 28676.
- 555.** Zachow R.J. and Magoffin D.A., "Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent oestradiol-17 β production by rat ovarian granulosa cells", *Endocrinology*, V. 138, n° 2, (1997), 847 - 850.
- 556.** Ajuwon K.M., Kuske J.L., Ragland D., Adeola O., Hancock D.L., Anderson D.B. and Spurlock M.E., "The regulation of IGF-1 by leptin in the pig is tissue specific and independent of changes in growth hormone", *J Nutr Biochem*, V. 14, n° 9, (2003), 522 - 530.
- 557.** Greisen S., Ledet T., Møller N., Jørgensen J.O.L., Sandahl J., Christiansen J.S., Petersen K. and Ovesen P., "Effects of leptin on basal and FSH stimulated steroidogenesis in human granulosa luteal cells", *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, V. 79, n° 11, (2000), 931 - 935
- 558.** Spicer L.J., "Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction", *Domestic Animal Endocrinology*, V. 21, n° 4, (2001), 251 - 270.

- 559.** Sirotkin A.V., Rafay J. and Kotwica J., "Leptin controls rabbit ovarian function *in vivo* and *in vitro*: possible interrelationships with ghrelin", *Theriogenology*, V. 72, n° 6, (2009), 765 - 772.
- 560.** Kendall N.R., Gutierrez C.G., Scaramuzzi R.J., Baird D.T., Webb R. and Campbell B.K., "Direct *in vivo* effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep", *Reproduction*, V. 128, n° 6, (2004), 757 - 765.
- 561.** Brannian J.D., Zhao Y. and McElroy M., "Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action", *Hum Reprod*, V. 14, n° 6, (1999), 1445 - 1448.
- 562.** Pérez-Pérez A., Sánchez-Jiménez F., Maymó J., Dueñas J.L., Varone C. and Sánchez-Margalet V., "Role of leptin in female reproduction", *Clin Chem Lab Med*, V. 53, n° 1, (2015), 15 - 28.
- 563.** Roncari D.A. and Van R.L., "Promotion of human adipocyte precursor replication by 17beta- α estradiol in culture", *J Clin Invest*, V. 62, n° 3, (1978), 503 - 508.
- 564.** Deslypere J.P., Verdonck L. and Vermeulen A., "Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 61, n° 3, (1985), 564 - 570.
- 565.** Lin K.C., "Changes of circulating leptin levels during normal menstrual cycle: relationship to α estradiol and progesterone", *Kaohsiung J Med Sci*, V. 15, n° 10, (1999), 597 - 602.
- 566.** Ajala O.M., Ogunro P.S., Elusanmi G.F., Ogunyemi O.E. and Bolarinde A.A., "Changes in Serum Leptin During Phases of Menstrual Cycle of Fertile Women: Relationship to Age Groups and Fertility", *Int J Endocrinol Metab*, V. 11, n° 1, (2013), 27 - 33.
- 567.** Hardie L., Trayhurn P., Abramovich D. and Fowler P., "Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy", *Clin Endocrinol (Oxf)*, V. 47, n° 1, (1997), 101 - 106.
- 568.** Ludwig M., Klein H.H., Diedrich K. and Ortmann O., "Serum leptin concentrations throughout the menstrual cycle", *Arch Gynecol Obstet*, V. 263, n° 3, (2000), 99 - 101.
- 569.** Elbers J.M.H., Asscheman H., Seidell J.C., Frölich M., Meinders A.E. and Gooren L.T.G., "Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 82, n° 10, (1997), 3267 - 3270.
- 570.** Havel P.J., Kasim-Karakas S., Dubuc G.R., Mueller W. and Phinney S.D., "Gender differences in plasma leptin concentrations", *Nat Med*, V. 2, n° 9, (1996), 949 - 950.

- 571.** Haffner S.M., Mykkanen L. and Stern M.P., "Leptin concentrations in women in the San Antonio Heart Study. Effect of menopausal status and postmenopausal hormone replacement therapy", *Am J Epidemiol*, V. 146, n° 7, (1997), 581-585.
- 572.** Castracane V.D., Kraemer R.R., Franken M.A., Kraemer G.R. and Gimpel T., "Serum leptin concentration in women. Effect of age, obesity, and estrogen administration", *Fert Steril*, V. 70, n° 3, (1998), 472 - 477.
- 573.** Machinal-Quélin F., Dieudonné M.N., Pecquery R., Leneveu M.C. and Giudicelli Y., "Direct *in vitro* effects of androgens and estrogens on ob gene expression and leptin secretion in human adipose tissue", *Endocrine*, V. 18, n° 2, (2002), 179 - 184.
- 574.** Lindell K., Bennett P.A., Itoh Y., Robinson I.C., Carlsson L.M. and Carlsson B., "Leptin receptor 5'untranslated regions in the rat: relative abundance, genomic organization and relation to putative response elements", *Mol Cell Endocrinol*, V. 172, n° 1-2, (2001), 37 - 45.
- 575.** Zhang P., Han X.G., Mellon S.H. and Hall P.F., "Expression of the gene for cytochrome P-450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase (CYP17) in porcine Leydig cells: identification of a DNA sequence that mediates cAMP response", *Biochim Biophys Acta*, V. 1307, n° 1, (1996b), 73 - 82.
- 576.** Zhang G. and Veldhuis J.D., "Insulin drives transcriptional activity of the CYP17 gene in primary cultures of swine theca cells", *Biol Reprod*, V. 70, n° 6, (2004), 1600 - 1605.
- 577.** Ravindranath N. , Petit-Ihrig L. , Benyo D.F. et Zeleznik A.J., « Role of luteinizing hormone in the expression of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, delta 5-4 isomerase messenger ribonucleic acids in the primate corpus luteum», *Endocrinology*, V. 131, n° 5, (1992), 2065 - 2070.
- 578.** Bilbao M.G., Di Yorio M.P. and Faletti A.G., "Different levels of leptin regulate different target enzymes involved in progesterone synthesis", *Fertil Steril*, V. 99, n° 5, (2013), 1460 - 1466.
- 579.** Leborgne M.C., Tanguy J.M., Foisseau J.M., Selin I., Vergonzane G. et Wimmer E., « Reproduction des animaux d'élevage », Educagri Editions, 3^{ème} édition, (2013), 469p.
- 580.** Stouffer R.L. "Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis", *Hum Reprod Update*, V. 9, n° 2, (2003), 99 - 117.
- 581.** Mahan M.D., Gonzales E., O'Gorman C.W., Aguirre E.A., Katchko R.A., Wiles J.R., Keisler D.H., Stanko R.L. and Garcia M.R., "PGF2 Alpha Decreases Leptin Gene

Expression in Bovine Adipocytes Relative to Stage of the Estrous Cycle and Presence of Progesterone”, *Biology of Reproduction*, V. 81, Suppl 1, (2009), 360.

- 582.** Zerani M., Boiti C., Zampini D., Brecchia G., Dall'Aglio C., Ceccarelli P. and Gobetti A., “Ob receptor in rabbit ovary and leptin *in vitro* regulation of corpora lutea”, *J Endocrinol*, V. 183, n° 2, (2004), 279 - 288.
- 583.** Zerani M., Boiti C., Dall'Aglio C., Pascucci L., Maranesi M., Brecchia G., Mariottini C., Guelfi G., Zampini D. and Gobetti A., “Leptin receptor expression and *in vitro* leptin actions on prostaglandin release and nitric oxide synthase activity in the rabbit oviduct”, *J Endocrinol*, V. 185, n° 2, (2005), 319 - 325.
- 584.** Woodruff T., Lyon R.J. and Hansen S.E., “Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis”, *Endocrinology*, V. 127, n° 6, (1990), 3196 - 3205.
- 585.** Echtenkamp S.E., Spicer L.J., Gregory K.E., Canning S.F. and Hammond J.M., “Concentration of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins”, *Biol Reprod*, V. 43, n° 1, (1990), 8 - 14.
- 586.** Adashi E.Y., Resnick C.E., Brodie A.M., Svoboda M.E. and Van Wyk J.J., “Somatomedin C mediated potentiation of follicle stimulating hormone induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells”, *Endocrinology*, V. 117, n° 6, (1985), 2313 - 2320.
- 587.** Findlay J.K. and Sai X., Shukovski L., “Role of inhibin-related peptides as intragonadal regulators”, *Reprod Fertil Dev*, V. 2, n° 3, (1990), 205 - 218.
- 588.** Hoggard N., Cruickshank M., Moar K.M, Barrett P., Bashir S. and Miller J.D.B., “Inhibin β B expression in murine adipose tissue and its regulation by leptin, insulin and dexamethasone”, *J Mol Endocrinol*, V. 43, (2009), 171 - 177.
- 589.** Urbancsek J., Fedorcsák P., Klinga K., Dévényi N., Papp Z., Rabe T. and Strowitzki T., “Impact of obesity and leptin levels on the secretion of oestradiol, inhibin A and inhibin B during ovarian stimulation with gonadotropins.”, *Gynecol Endocrinol*, V. 16, n°4, (2002), 285 - 292.
- 590.** Tipsmark C.K., Strom C.N., Bailey S.T. and Borski R.J., “Leptin stimulates pituitary prolactin release through an extracellular signal-regulatedkinase-dependent pathway”, *J Endocrinol*, V. 196, n° 2, (2008), 275 - 281.
- 591.** Viengchareun S., Bouzinba-Segard H., Bado A., Zennaro Z., Lombes M. et Binart N., « Identification des récepteurs de la prolactine dans le tissu adipeux brun : un nouveau rôle de la prolactine sur la sécrétion de leptine », Congrès de la SFE, Tours, *Annales d'Endocrinologie*, V. 63, n° 4, (2002), 267.

- 592.** Lv D., Tan T., Zhu T., Wang J., Zhang S., Zhang L., Hu X., Liu G., and Xing Y., "Leptin mediates the effects of melatonin on female reproduction in mammals", *Journal of Pineal Research*, V. 66, n° 3, (2019), e12559.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12559>, Page consultée le : 12/03/2019
- 593.** Linnemann K., Malek A., Schneider H. and Fusch C., "Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression", *Biochem Soc Trans*, (2001), V. 29, Pt 2, 86 - 90.
- 594.** Gonzalez R.R., Caballero-Campo P., Jasper M., Mercader A., Devoto L., Pellicer A. and Simon C., "Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst", *J Clin Endocrinol Metab*, V. 85, n° 12, (2000), 4883 - 4888.
- 595.** Bischof P., Meisser A. and Campana A., "Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion", *J Reprod Fertil Suppl*, V. 55, (2000), 65 - 71.
- 596.** Castellucci M., De Matteis R., Meisser A., Canello R., Monsurro V., Islami D., Sarzani R., Marzioni D., Cinti S. and Bischof P., "Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion", *Mol Hum Reprod*, V. 6, n° 10, (2000), 951 - 958.
- 597.** Fontana V.A., Sanchez M., Cebal E. and Calvo J.C., "Interleukin-1 beta regulates metalloproteinase activity and leptin secretion in a cytotrophoblast model", *Biocell*, V. 34, n° 1, (2010), 37 - 43.
- 598.** Hauguel-De Mouzon S. and Lepercq J., "Placental leptin and pregnancy pathologies", *Gynecol Obstet Fertil*, V. 29, n° 7-8, (2001), 534 - 537.
- 599.** Bajoria R., Sooranna S.R., Ward B.S. and Chatterjee R., "Prospective function of placental leptin at maternal-fetal interface", *Placenta*, V. 23, n° 2-3, (2002), 103 - 115.
- 600.** Challier J., Galtier M., Bintein T., Cortez A., Lepercq J. and Hauguel-De Mouzon S., "Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies", *Placenta*, V. 24, n° 1, (2003), 92 - 99.
- 601.** Pollheimer J. and Knofler M., "Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review", *Placenta*, V. 26, Suppl A, (2005), S21 - 30.
- 602.** Coya R., Martul P., Algorta J., Aniel-Quiroga M.A., Busturia M.A. and Senaris R., "Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells", *Gynecol Endocrinol*, V. 22, n° 11, (2006), 620 - 626.

- 603.** Pérez-Pérez A., Maymó J., Dueñas J.L., Goberna R., Calvo J.C., Varone C. and Sánchez-Margalet V., “Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway”, *Arch Biochem Biophys*, V. 477, (2008), 390 - 395.
- 604.** Ashworth C.J., Hoggard N., Thomas L., Mercer J.G., Wallace J.M. and Lea R.G., “Placental leptin”, *Rev Reprod*, V. 5, n° 1, (2000), 18 - 24.
- 605.** Reitman M.L., Bi S., Marcus-Samuels B. and Gavrilova O., “Leptin and its role in pregnancy and fetal development – an overview”, *Biochem Soc Trans*, V. 29, Pt 2, (2001), 68 - 72.
- 606.** Henson M.C. and Castracane V.D., “Leptin in pregnancy: an update”, *Biol Reprod*, (2006), V. 74, n° 2, 218 - 229.
- 607.** Bertoni L., Ferretti M., Cavani F., Zavatti M., Resca E., Benelli A. and Palumbo C., “Leptin increases growth of primary ossification centers in fetal mice”, *J Anat*, V. 215, n° 5, (2009), 577 - 583.
- 608.** Henson M.C., Swan K.F. and O’Neil J.S., “Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term”, *Obstet Gynecol*, V. 92, n° 6, (1998), 1020 - 1028.
- 609.** Aoki N., Kawamura M. and Matsuda T., “Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland”, *Biochim Biophys Acta*, V. 1427, n° 2, (1999), 298 - 306.
- 610.** Sayed-Ahmed A., Kulcsár M., Rudas P. and Bartha T., “Expression and localisation of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the dry and lactating non-pregnant cow”, *Acta Vet Hung*, V. 52, n° 1, (2004), 97 - 111.
- 611.** Ilcol Y.O., Hizli Z.B. and Ozkan T., “Leptin concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status”, *International Breastfeeding Journal*, V. 1, (2006), 21.
- 612.** Lin Y. and Li Q., “Expression and function of leptin and its receptor in mouse mammary gland”, *Sci China C Life Sci*, V. 50, n° 5, (2007), 669 - 675.
- 613.** Kamikawa A., Ichii O., Yamaji D., Imao T., Kuwata C., Okamatsu-Ogura Y., Terao A., Kon Y. and Kimura K., “Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant Mice”, *Developmental Dynamics* V. 238, n° 5, (2009), 1092 - 1099.