

THESIS / THÈSE

MASTER IN BIOLOGY

Influence directe de la leptine sur l'activité ovarienne chez le bovin

Rigaut, Orane

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**INFLUENCE DIRECTE DE LA LEPTINE SUR L'ACTIVITE OVARIENNE CHEZ LE
BOVIN**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Orane Rigaut

Août 2003

Influence directe de la leptine sur l'activité ovarienne chez le bovin

RIGAUT Orane

Résumé

La leptine est une hormone protéique synthétisée par le tissu adipeux qui s'est avérée remplir un rôle physiologique non négligeable au niveau de la nutrition, de l'état corporel et de la reproduction. Ce travail a pour but de déceler un éventuel effet direct de la leptine sur l'activité ovarienne notamment la stéroïdogénèse chez le bovin.

Pour cela, nous avons recherché dans un premier temps une relation entre la synthèse de leptine par le tissu adipeux de la vache et la synthèse des stéroïdes par ses follicules in vitro, et un effet d'un conditionnement in vitro des follicules par des doses variables de leptine sur la stéroïdogénèse ultérieure.

Dans un second temps, nous avons cherché à mettre en évidence la présence de récepteurs cellulaires spécifiques de la leptine au niveau des différentes structures ovariennes, par immunohistochimie puis par RT-PCR.

La stéroïdogénèse in vitro n'a pas donné de résultat significatif et l'immunohistochimie a donné des marquages qui semblent non spécifiques. Seule la RT-PCR a montré une synthèse significative de récepteurs à la leptine, principalement au niveau des gros follicules.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Août 2003

Promoteur: J.-L. Bister

Co-promoteur: R. Paquay

Ce mémoire représente le fruit d'un travail au terme duquel je souhaite remercier les différentes personnes ayant contribué de près ou de loin à sa réalisation. Je tiens donc à remercier les personnes suivantes

le Professeur Raymond Paquay, mon co-promoteur, pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé au sein de son département ainsi que pour l'intérêt qu'il a porté à ce mémoire,

le Docteur Jean-Loup Bister, mon promoteur, pour son appui scientifique, ses connaissances et l'accompagnement tout au long du travail et de la rédaction,

Cécile, pour ses réponses à mes nombreuses questions, ses conseils très pratiques et son soutien moral particulier,

Marie-Antoinette, pour son aide précieuse, son savoir-faire et sa bonne humeur,

Sarah, avec qui j'ai partagé ce sujet de mémoire et le grand stress de la fin, ainsi que tous les membres du département de physiologie animale.

Merci aussi aux membres du département d'histologie pour m'avoir permis de travailler dans leur laboratoire et pour l'aide qu'ils m'ont apporté.

Un petit clin d'œil à Yéliz, Pierre-François et Pascal, merci à vous !

Last but not least, ma famille, mes plus fidèles supporters, que je remercie de tout cœur ! Parmi eux

Perrine, ma sœur, pour ses encouragements.

Jiannos, pour m'avoir supporté et soutenu inconditionnellement tout au long de ce travail ainsi que pour son aide salutaire en informatique.

Et les plus importants : Joëlle et Walter alias maman et papa pour avoir toujours cru en moi, pour leur confiance et leur soutien durant ces années d'études. Ma façon de les remercier est de leur dédier ce mémoire.

A vous tous encore une fois merci !

INTRODUCTION.....	7
CHAPITRE I :REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
1. APPAREIL GÉNITAL DE LA FEMELLE.....	10
1.1 Les ovaires.....	10
1.2 Les oviductes	12
1.3 L'utérus	12
1.4 Le vagin.....	13
2. LES HORMONES IMPLIQUÉES DANS LA REPRODUCTION.....	13
2.1 Les hormones hypothalamo-hypophysaires	14
A. La GnRH (Gonadotropine Releasing Hormone) ou gonadoréline.....	14
B. La FSH (Follicle Stimulating Hormone).....	14
C. La LH (Lutenising Hormone)	14
2.2 Les hormones stéroïdiennes	15
A. Les oestrogènes	15
B. Les progestagènes	15
2.3 Les prostaglandines.....	16
2.4 Les autres hormones.....	16
A. L'inhibine	16
B. L'ocytocine.....	16
C. La relaxine.....	16
3. LA LEPTINE	17
3.1 Gène et structure	17
3.2 Récepteur et signaling intracellulaire.....	17
3.3 Modèles in vivo de déficience et de résistance à la leptine.....	19
3.4 Fonctions et physiologie de la leptine dans le métabolisme des graisses et la régulation de l'appétit.....	20
3.5 Rôle de la leptine dans la fonction reproductive.....	22
A. Fonction hypothalamo-hypophysaire.....	22
B. Pulsatilité de la leptine	23
C. Dimorphisme sexuel.....	24
D. Fonction ovarienne et reproduction.....	24
CHAPITRE II :OBJECTIFS	30
CHAPITRE III :MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	32
1. CULTURE IN VITRO DES FOLLICULES OVARIENS.....	33
1.1 But	33
1.2 Matériel biologique	33
1.3 Système de périphérie.....	33
1.4 Stimulation des follicules in vitro.....	34
2. DOSAGES HORMONAUX PAR R.I.A.	35
2.1 Principe	35
2.2 Appareillage.....	35
2.3 Calcul des résultats	36
2.4 Dosage de l'œstradiol (E ₂)	36
A. Technique	36
B. Solution de travail	37
C. Courbe standard.....	37
2.5 Dosage de la progestérone (P ₄).....	38

A.	Principe.....	38
B.	Technique.....	38
C.	Calcul des résultats.....	38
3.	RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE.....	39
3.1	<i>Principe</i>	39
3.2	<i>Extraction d'ARN</i>	39
A.	Principe.....	39
B.	Matériel.....	39
C.	Protocole.....	39
D.	Dosage de l'ARN.....	40
3.3	<i>RT-PCR semi-quantitative</i>	40
A.	Principe.....	40
B.	Matériel.....	41
C.	Réactifs et solutions.....	41
D.	Protocole.....	42
3.4	<i>Electrophorèse sur gel d'agarose</i>	43
A.	Principe.....	43
B.	Protocole.....	43
4.	MISE EN ÉVIDENCE DES RÉCEPTEURS À LA LEPTINE PAR.....	45
4.1	<i>But</i>	45
4.2	<i>Principe</i>	45
4.3	<i>Protocole</i>	45
A.	Prélèvement tissulaire et préparation histologique.....	45
B.	Déparaffinage-Réhydratation.....	45
C.	Élimination de l'activité peroxydase endogène.....	46
D.	Anticorps primaire.....	46
E.	Anticorps secondaire.....	46
F.	Révélation.....	46
G.	Montage.....	47
H.	Contrôle.....	47
I.	Coloration H.E.S.....	47
A.	Prélèvement tissulaire et préparation histologique.....	47
B.	Traitement des coupes avant le marquage.....	47
C.	Fixation de l'anticorps primaire et secondaire.....	47
D.	Révélation.....	48
CHAPITRE IV :RESULTATS		49
1.	SÉCRÉTIONS STÉROÏDIENNES DES FOLLICULES ET DES CORPS JAUNES PÉRIFUSÉS IN VITRO.....	50
1.1	<i>Première expérience</i>	50
A.	Sécrétion de P ₄ en fonction de la taille des follicules.....	50
B.	Sécrétion d'E ₂ en fonction de la taille des follicules.....	52
C.	Sécrétion de P ₄ en fonction du type de traitement à la leptine.....	54
D.	Sécrétion de E ₂ en fonction du type de traitement à la leptine.....	55
E.	Analyse statistique.....	55
1.2	<i>Deuxième expérience</i>	56
1.3	<i>Troisième expérience</i>	57
A.	Sécrétion de P ₄ en fonction de la taille des follicules.....	58
B.	Sécrétion d'E ₂ en fonction de la taille des follicules.....	59

2.	EXPRESSION DE LA LEPTINE DANS LE TISSU ADIPEUX SOUS-CUTANÉ DE LA VACHE ET RELATION AVEC LA STÉROÏDOGENÈSE	61
2.1	<i>Quantité d'ARN totale dans le tissu</i>	61
2.2	<i>Expression de la leptine</i>	61
2.3	<i>Relation entre la leptine et la stéroïdogénèse</i>	63
3.	RECHERCHE DES RÉCEPTEURS PAR IMMUNOHISTOCHIMIE	64
4.	EXPRESSION DU RÉCEPTEUR DE LA LEPTINE DANS LES TISSUS OVARIENS	67
4.1	<i>Quantité d'ARN totale dans le tissu</i>	67
4.2	<i>Expression du récepteur</i>	67
CHAPITRE V :DISCUSSIONS		69
1.	STÉROÏDOGENÈSE IN VITRO	70
1.1	<i>Stéroïdogénèse en fonction de la taille des follicules</i>	70
1.2	<i>Stéroïdogénèse en fonction des traitements de leptine</i>	71
1.3	<i>Stéroïdogénèse en fonction de la synthèse de leptine de la vache</i>	71
2.	RECHERCHE DES RÉCEPTEURS SPÉCIFIQUES DE LA LEPTINE.....	72
2.1	<i>Recherche par immunohistochimie</i>	72
2.2	<i>Recherche par RT-PCR</i>	72
CHAPITRE VI :CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		75
ANNEXES.....		79

Introduction

Découverte en 1994, la leptine est une hormone protéique qui s'est avérée remplir un rôle important dans la physiologie de la nutrition, du métabolisme et de la reproduction. De nombreuses études furent réalisées surtout au niveau humain et murin mais peu au niveau bovin.

La production de la leptine se fait principalement dans le tissu adipeux, le récepteur quant à lui se trouve en majorité dans l'hypothalamus mais est également localisé entre autre au niveau des ovaires, de l'utérus, du placenta et des cellules épithéliales mammaires. La leptine remplirait donc un rôle dans la gestation, la parturition, la croissance fœtale et la lactation.

Cette hormone récemment découverte n'a donc pas fini de nous livrer les secrets de son fonctionnement parfois assez paradoxal. La leptine est pleïotrope ; elle affecte donc de nombreuses fonctions au sein d'un organisme. A titre d'exemple, en plus des fonctions citées ci-dessus dans lesquelles elle intervient, la leptine semble jouer un rôle dans le processus de cicatrisation d'une blessure.

Ce travail traite principalement du rôle tenu par la leptine dans la fonction reproductrice et le lien qu'elle crée entre cette fonction et l'état corporel. L'influence indirecte de la leptine via l'hypothalamus semble déjà en bonne partie découverte et comprise même si subsistent encore par endroit certains points plus complexes non-élucidés. L'influence directe de l'hormone sur l'ovaire par contre n'a pas encore été totalement mise en évidence malgré les nombreux indices qui portent à croire que cette influence existe.

Chapitre I :
Revue bibliographique

1. Appareil génital de la femelle

(D'après Drion, Beckers, 1993 ; Bister J-L, 2002)

Par rapport au mâle chez qui l'appareil génital se limite à la production des gamètes et hormones, celui de la femelle assure en plus les rôles de siège de la fécondation, de la gestation, de la parturition et de la lactation.

Cet appareil se compose de :

- Deux gonades ou **ovaires**
- Les **oviductes** ou trompes utérines
- L'**utérus**
- Le **col**
- Le **vagin**
- La **vulve**
- Les **mamelles**

1.1 Les ovaires

Les ovaires sont des organes pairs situés dans la cavité abdominale et remplissent une fonction double qui détermine la vie génitale : la gamétogenèse qui est une fonction exocrine, et la synthèse d'hormones qui est une fonction endocrine.

Chez la vache, les ovaires sont du volume d'une noix (4cmx2.5cm) aplatis et bosselés à cause des follicules à divers degrés de développement et des corps jaunes. A l'âge adulte, il peut peser jusqu'à 20 grammes.

La structure de l'ovaire est en trois tissus :

- L'**albuginée** : une membrane fibreuse recouvrant l'ovaire
- La **zone médullaire** : tissu nourricier au centre de l'ovaire garni de vaisseaux sanguins et de nerfs.
- La **zone corticale ou périphérique** : tissu où se forment et se développent les follicules et les corps jaunes qui y succèdent.

Les ovaires comportent des follicules dont les stades d'évolution sont différents, ce sont des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, antraux et de De Graaf (Figure 1).

Les **follicules primordiaux** sont présents dans la zone corticale de l'ovaire dès la naissance. Ils sont au nombre de 200.000 mais seulement un petit nombre se développera jusqu'à l'ovulation, les autres verront leur développement se stopper et subiront l'atrésie. Les follicules primordiaux se composent d'un ovocyte entouré de quelques cellules folliculaires.

Les **follicules primaires** comportent un ovocyte en croissance un peu plus volumineux entouré d'une couche régulière de quelques dizaines de cellules folliculaires.

Les **follicules secondaires** sont au stade où l'ovocyte a atteint sa taille maximum. Il est maintenant entouré d'une membrane pellucide le séparant des cellules folliculaires qui sont maintenant plusieurs milliers et forment une granulosa.

Les **follicules tertiaires** sont reconnaissables grâce aux nouveaux tissus qui s'organisent autour de la granulosa : La thèque interne formée de cellules glandulaires où sont synthétisés les oestrogènes, et la thèque externe formée de cellules aplaties, de fibres conjonctives et de vaisseaux sanguins afin de nourrir le follicule et de transporter les hormones.

Les **follicules antraux** vont se creuser d'une cavité remplie de liquide folliculaire au niveau de la granulosa : l'antrum. Ce liquide abondant va rejeter les cellules de la granulosa en périphérie, tandis que l'ovocyte porté par des cellules folliculaires, le cumulus oophorus, fait saillie dans l'antrum.

Les **follicules de De Graaf ou pré-ovulatoires** sont les plus volumineux. L'antrum a tellement augmenté qu'il a atteint une taille de 15 à 20 mm chez la vache. L'ovocyte et la granulosa paraissent alors minuscules.

L'aboutissement de la croissance terminale du follicule de De Graaf est l'**ovulation**, c'est à dire sa rupture et la libération de l'ovule vers le pavillon de l'oviducte.

Après l'ovulation, un caillot sanguin se forme pour remplir la cavité folliculaire, il est entouré des cellules de la thèque interne et de la granulosa. Ces cellules vont se multiplier et se charger de lutéine, un pigment caroténoïde jaune. Des vaisseaux sanguins vont alors se former à partir de la thèque pour irriguer cette nouvelle structure : le **corps jaune**.

Le corps jaune devient donc une glande endocrine à double rôle :

- Sa couche externe qui vient de la thèque interne sécrète de l'oestradiol en petite quantité
- Sa couche interne qui vient de la granulosa sécrète de la progestérone

Si la fécondation se produit, le corps jaune sera maintenu tout au long de la gestation. Du stade **progestatif**, il passe au stade **gestatif**. Mais si la fécondation n'a pas lieu, le corps jaune progestatif régresse puis disparaît.

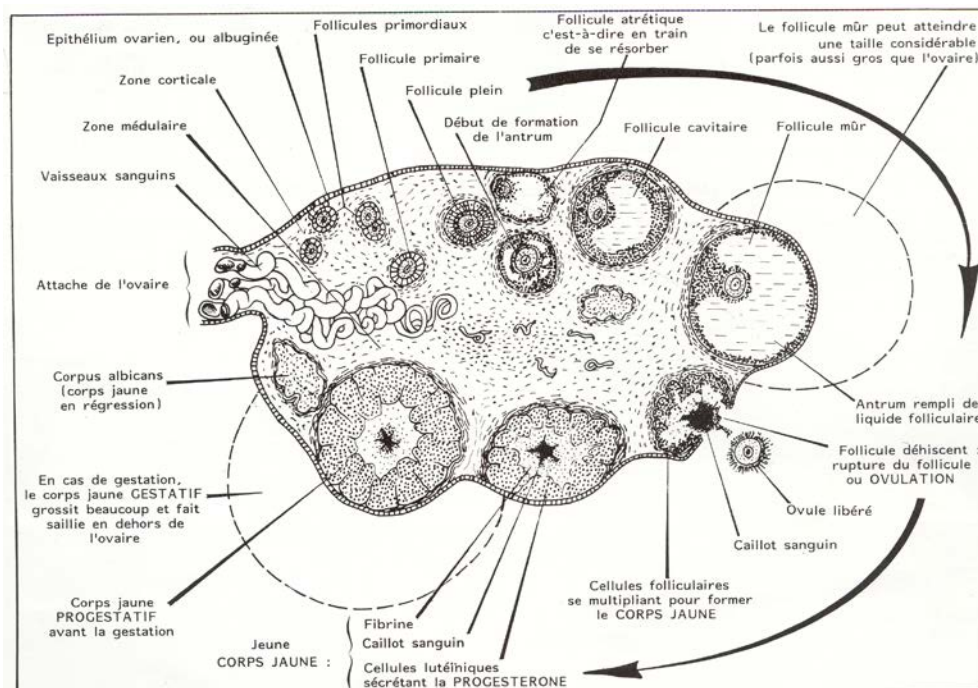


Figure 1 : Représentation d'un ovaire bovin et des différents stades folliculaires.

1.2 Les oviductes

Les oviductes, ou trompes de Fallope, sont deux canaux flexueux de calibre restreint et d'une longueur de 20 à 25 centimètres chez la vache reliant les ovaires à l'utérus. Chaque canal comprend une portion interstitielle et une portion intra-abdominale. Cette dernière se divise en trois parties :

- Le **pavillon** membrane aux bords frangés recouverte de cellules ciliées destinées à la capture de l'ovule. Le pavillon a une forme d'entonnoir qui recouvre l'ovaire lors de l'ovulation afin de recueillir l'ovule. Hormis ce contact, il n'existe pas de liaison entre l'ovaire et l'oviducte.
- L'**ampoule** qui représente environ la moitié de la longueur de l'oviducte constitue à la fois le lieu de maturation finale des gamètes mâles et femelles, le lieu de la fécondation et le lieu des premières segmentations de l'œuf.
- L'**isthme** est un segment étroit à la base de l'oviducte. Durant la période périovulatoire, l'isthme possède une activité contractile qui facilite la remontée des spermatozoïdes vers l'ampoule. Par contre, durant la phase lutéale, il possède une activité contractile inverse qui va conduire l'œuf vers l'utérus après fécondation.

1.3 L'utérus

L'utérus est l'organe de gestation creux où vient s'implanter l'œuf pour poursuivre son développement embryonnaire jusqu'à la mise bas. Il est composé de deux cornes utérines dont les prolongements ne sont autres que les oviductes, un corps utérin et un col, barrière entre l'utérus et le vagin.

Les cornes utérines d'une longueur de 25 centimètres de long, fusionnent sur une longueur de 5 centimètres chez la vache pour former le corps. La paroi des cornes et du corps est composée de trois tissus :

- L'endomètre ou muqueuse va subir les principales modifications au cours du cycle afin de présenter un milieu favorable à la survie de l'œuf et à sa nidation ainsi qu'à la capacitation des gamètes mâles. L'endomètre est riche en vaisseaux sanguins reliés à l'artère et la veine utérines. Après l'ovulation, l'endomètre va proliférer et former des invaginations où débouchent des glandes utérines sécrétrices d'hormones indispensables à la survie de l'œuf et au développement fœtal.
- Le myomètre ou musculature est composée de fibres musculaires lisses qui vont se contracter lors de la parturition et vont permettre ainsi l'expulsion du fœtus.
- Le corps et le fond ou séreuse ainsi que l'isthme et le col ou adventice.

Chez les ruminants la surface interne de l'utérus porte une centaine de tubercules arrondis, ce sont les **cotylédons**. C'est sur ces derniers que la paroi externe de l'œuf viendra se fixer pour former le placenta.

L'utérus est relié au vagin par le **col utérin** ou **cervix**. Ce col est un canal à la paroi musculature épaisse long de 7 à 8 centimètres et garni de chicanes et replis. Durant l'oestrus, ce col subit des modifications afin de faciliter le traitement et le parcours des spermatozoïdes grâce d'une part aux sécrétions de mucus et d'autre part aux contractions péristaltiques myogéniques ascendantes.

1.4 Le vagin

Le vagin est un conduit musculo-membraneux de 30 centimètres de long et qui forme, avec la vulve, l'organe d'accouplement de la femelle et livre passage au fœtus lors de la mise-bas. Les parois du vagin sont plissées et en contact l'une avec l'autre. Toutefois, elles peuvent se dilater lors de la mise-bas et sont lubrifiées par un abondant mucus.

La vulve est l'endroit où débouche l'urètre et les glandes de Bartholin sécrétant un liquide lubrifiant plus abondant au moment de l'œstrus. Lors de l'accouplement, le vagin recueille l'éjaculat dont les spermatozoïdes doivent trouver l'entrée du col.

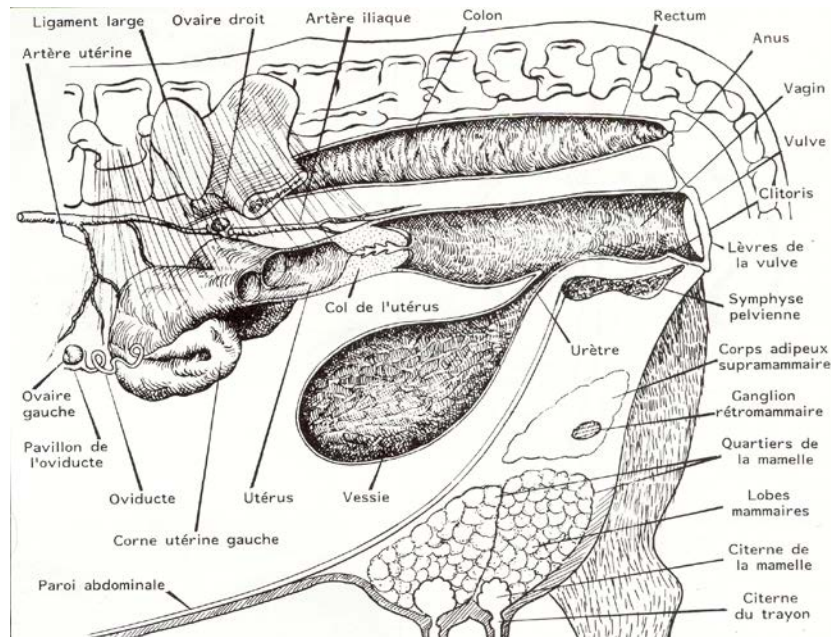


Figure 2 : Représentation anatomique de l'appareil reproducteur de la vache.

2. Les hormones impliquées dans la reproduction

(Drion, Beckers, Ectors, 1993 ; Bister J-L, 2002 ; Stevens, Lowe 1997)

Les hormones sont des messagers chimiques (molécules) agissant à distance sur des cellules dites « cellules cibles » par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques et produisant ainsi différents effets propres à chacune d'entre-elles. Ces messagers de diverses natures chimiques (protéines, stéroïdes, petits peptides, dérivés d'acides aminés) sont synthétisés par des cellules endocrines qui sont soit dispersées parmi d'autres cellules d'un tissu épithélial, soit regroupées en amas au sien d'un organe ou bien encore regroupées pour constituer un organe. Les hormones ont aussi comme caractéristiques d'agir à des concentrations très faibles et d'avoir une durée de vie assez courte dans l'organisme qui varie entre quelques minutes et quelques jours.

Le système reproducteur est régulé principalement par l'axe hypothalamo-hypophysogonadique qui regroupe, comme son nom l'indique, l'hypothalamus, l'hypophyse et les gonades ; mais aussi, et ce à des degrés divers, par les tissus du tractus génital (endomètre notamment) et enfin d'autres éléments du système endocrinien (placenta, épiphyse...).

2.1 Les hormones hypothalamo-hypophysaires

Le complexe hypothalamo-hypophysaire est constitué de deux sous-unités plus ou moins distinctes : l'hypothalamus et l'hypophyse.

L'hypophyse est une glande endocrine aux fonctions multiples située sous le cerveau auquel elle est reliée par la tige hypophysaire (au niveau de l'hypothalamus). Elle est anatomiquement divisée en deux parties : l'adénohypophyse, partie glandulaire qui sécrète les hormones, et la neurohypophyse qui est le prolongement de la région hypothalamique du cerveau.

L'hypothalamus, qui est composé du tissu nerveux du plancher et des parois latérales du troisième ventricule cérébral, est un noyau de cellules nerveuses sécrétrices et reliées par leurs terminaisons à l'hypophyse. Il coordonne les fonctions du système endocrinien et nerveux. Ce dernier stimule sans cesse l'hypothalamus.

A. La GnRH (Gonadotropine Releasing Hormone) ou gonadoréline

La GnRH est une hormone peptidique de dix acides aminés produite par un réseau spécialisé de l'hypothalamus. Cette hormone est stockée dans l'éminence médiane sous forme de granules qui sont libérés dans la veine porte hypothalamo-hypophysaire. La sécrétion de GnRH suit un mode pulsatile qui est intrinsèque aux neurones à GnRH et est modulé par de nombreux facteurs responsables des variations au cours du cycle ainsi qu'en fonction de l'environnement externe.

Le rôle principal de la GnRH est la stimulation de l'hypophyse en vue de libérer les gonadotropines (FSH et LH). La régulation de la GnRH se fait selon un Feed Back négatif et ce grâce à elle-même. En effet, une concentration élevée en GnRH inhibe sa propre sécrétion. Elle est aussi inhibée par les gonadotropines libérées par l'hypophyse et par les stéroïdes libérés par les ovaires. En saison de reproduction, un Feed Back positif s'installe entre l'oestradiol et le GnRH, responsable des décharges ovulatoires.

B. La FSH (Follicle Stimulating Hormone)

La FSH, une gonadotropine glycoprotéique, est sécrétée tout le long du cycle sous forme de vagues et d'une décharge préovulatoire. Les vagues sécrétées correspondent aux croissances folliculaires et chaque maximum correspond à un recrutement de follicule.

Le rôle principal de la FSH est de contrôler le développement de l'ovaire ainsi que la croissance des follicules et le métabolisme cellulaire de ceux-ci. De cette façon, elle augmente la synthèse des stéroïdes, plus particulièrement de l'oestradiol, de même que le nombre de récepteur à la LH.

C. La LH (Lutenising Hormone)

L'autre gonadotropine, la LH, est aussi une hormone glycoprotéique de haut poids moléculaire sécrétée par l'hypophyse sous forme de pulses correspondant à ceux de la GnRH. La sécrétion est constante tout au long du cycle, excepté lors de la phase préovulatoire où une décharge de LH (ou pic) se produit provoquant ainsi l'ovulation.

L'action de la LH se situe au niveau des ovaires : elle stimule principalement les cellules de la thèque des follicules afin qu'elles sécrètent des androgènes servant de précurseur à

l'oestradiol mais elle stimule aussi le développement du corps jaune qui va sécréter de la progestérone.

2.2 Les hormones stéroïdiennes

Les stéroïdes sexuels sont des hormones de nature lipidique synthétisées à partir du cholestérol qui va former après plusieurs étapes de la progestérone. Cette dernière à son tour va subir des transformations pour donner de l'androstènedione qui constitue l'intermédiaire principal pour la formation des oestrogènes.

Ces hormones sont sécrétées principalement par les gonades suite à une stimulation par la LH et FSH, mais elles sont aussi produites par le placenta et les glandes surrénales.

A. Les oestrogènes

Les oestrogènes regroupent toutes les hormones stéroïdiennes qui ont pour effets biologiques d'assurer le développement de type femelle, la maturité de l'appareil génito-mammaire et le déroulement régulier du cycle oestral.

Le **17 β oestradiol (E₂)** est sécrété par les follicules ovariens et ce en quantité proportionnelle à la taille de ceux-ci. Son rôle principal est de produire l'oestrus grâce à un Feed Back positif de l'hypothalamus qui amplifie sa sécrétion jusqu'à une décharge importante aboutissant ainsi à une ovulation. Un Feed Back négatif est observé en présence de progestérone et à tout moment lors de l'anœstrus.

Au niveau de l'ovaire, l'oestradiol agit de deux façons différentes : elle stimule le métabolisme des follicules favorisant de cette manière sa propre sécrétion, et elle a une action lutéolytique en synergie avec les prostaglandines utérines.

L'oestradiol au niveau de l'utérus stimule la production de PGF₂ α et provoque des contractions utérines favorisant la rencontre des spermatozoïdes et de l'ovule.

L'oestradiol est responsable du comportement d'oestrus et de la production de phéromones actives sur le comportement du mâle.

B. Les progestagènes

La **progestérone (P₄)** est une hormone qui a pour rôle le maintien de la gestation et le bon fonctionnement du système reproducteur. Le corps jaune est la source physiologique la plus importante de la progestérone, elle est aussi sécrétée par le placenta et ce en différentes quantités selon les espèces. La P₄ reflète donc l'activité du corps jaune, c'est pourquoi elle augmente deux jours après l'ovulation pour plafonner pendant la phase lutéale, après quoi elle régresse si la fécondation n'a pas eu lieu. La P₄ a un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH bloquant ainsi la production de LH et FSH et surtout leur décharge lors de l'élévation des taux plasmatiques d'E₂.

La progestérone agit de plusieurs manières sur l'utérus : elle inhibe les contractions utérines, provoque une augmentation des parois et augmente le métabolisme utérin.

La P₄ possède également une action sur le comportement : en effet, elle est nécessaire au bon fonctionnement de l'E₂ sur le comportement oestral par imprégnation préalable du système nerveux.

2.3 Les prostaglandines

Les prostaglandines (PG) sont des molécules dérivées de l'acide arachidonique présentes dans l'ensemble des tissus de l'organisme des mammifères où elles remplissent différentes fonctions. Les composantes principales en ce qui concerne le système reproducteur sont la **PGE₂** et la **PGF_{2α}**. Elles agissent à différents niveaux et de manières diverses.

- La PGE₂ favorise la sécrétion de GnRH au niveau de l'hypothalamus.
- La PGE et la PGF_{2α} interviennent dans le mécanisme d'ovulation grâce à leur rôle dans la rupture du follicule pré-ovulatoire.
- La PGF_{2α} intervient dans l'activité de lutéolyse.
- La PGF_{2α} est responsable des contractions du myomètre lors de la mise bas.
- La PGE a une action stimulante sur le corps jaune susceptible de contrecarrer l'effet lutéolytique de PGF_{2α} au début de la gestation.

2.4 Les autres hormones

A. L'inhibine

L'inhibine est une hormone de nature glycoprotéique synthétisée par la granulosa du follicule. Son rôle est d'inhiber la sécrétion de FSH hypophysaire, ce qui aura pour effet d'induire la régression des follicules antraux non-dominants tout en permettant au dominant de se développer normalement.

B. L'ocytocine

L'ocytocine est une hormone neurohypophysaire de nature peptidique produite par les neurones hypothalamiques. Elle stimule fortement le muscle utérin et joue un rôle crucial dans la progression du travail facilitant ainsi la mise bas. Elle favorise également l'éjection du lait au cours de l'allaitement, et en règle générale la contraction des muscles lisses.

C. La relaxine

La relaxine est une hormone polypeptidique présente dans les ovaires durant toute la gestation mais aussi dans le placenta. Bien qu'on la trouve aussi chez la femelle non gestante, cette hormone doit être considérée comme une hormone de l'état de gestation. L'action de la relaxine n'est possible que si les tissus sont préalablement sensibilisés par les hormones stéroïdes femelles.

Ses effets sont nombreux :

- Elle provoque la dilatation du cervix chez la vache
- Elle favorise la croissance de l'utérus
- Elle réduit l'activité myométriale
- Elle renforce l'action de l'oestradiol sur l'hypertrophie et la kératinisation de l'épithélium vaginale
- Elle favorise la croissance des mamelles avec la progestérone et les oestrogènes
- Elle permet la dilatation de la symphyse pubienne et le relâchement des ligaments sacro-sciatiques facilitant ainsi la mise bas

3. La Leptine

3.1 Gène et structure

La leptine, découverte en 1994 par Zhang (Zhang *et al.*, 1994), est une hormone protéique dont le nom dérive du mot « leptos » qui en grec signifie « mince » (Goumenou *et al.*, 2002). Elle est codée par le gène de l'obésité *ob* et est synthétisée principalement dans le tissu adipeux mais aussi dans l'hypothalamus, l'hypophyse, l'estomac, le muscle squelettique, le placenta et l'épithélium mammaire (Moschos *et al.*, 2002).

Chez le bovin, le gène *ob* est localisé sur le chromosome 4 et code pour un transcrit dont la taille est de 3.1 kb (Chilliard *et al.*, 1999). Chez l'humain, ce gène se situe sur le chromosome 7q31.3 (Prolo *et al.*, 1998), il consiste en trois exons et deux introns (Schubring *et al.*, 2000) et code pour un ARNm de 4.5 kb avec une ORF de 167 acides aminés sans homologie significative avec quelconque autre séquence de peptide. Après le clivage du peptide signal amino-terminal de 21 acides aminés, la protéine résultante mature, de 146 acides aminés d'un poids moléculaire de 16 kDa, se présente sous la forme d'une seule séquence comprenant un pont disulfure au niveau du carbone terminal, déterminant pour sa stabilité et sa bioactivité (Blum, 1997). L'ARNm du gène *ob* présente un turnover assez rapide dans le tissu adipeux, son temps de demi-vie y est d'environ 2 heures (Schubring *et al.*, 2000). La leptine quant à elle a un temps de demi-vie s'élevant à 25 minutes dans le sang (Brann *et al.*, 2002).

La séquence de la région codante possède entre 84 et 97% d'homologie à travers les espèces telles que les ovins, les bovins, les porcins, les murins et les humains. La séquence protéique de la leptine est donc assez bien conservée parmi ces espèces (Spicer, 2002).

Sur base de sa structure primaire et secondaire, la leptine peut être attribuée à la classe des cytokines hématopoïétiques, malgré l'absence d'une séquence majeure homologue.

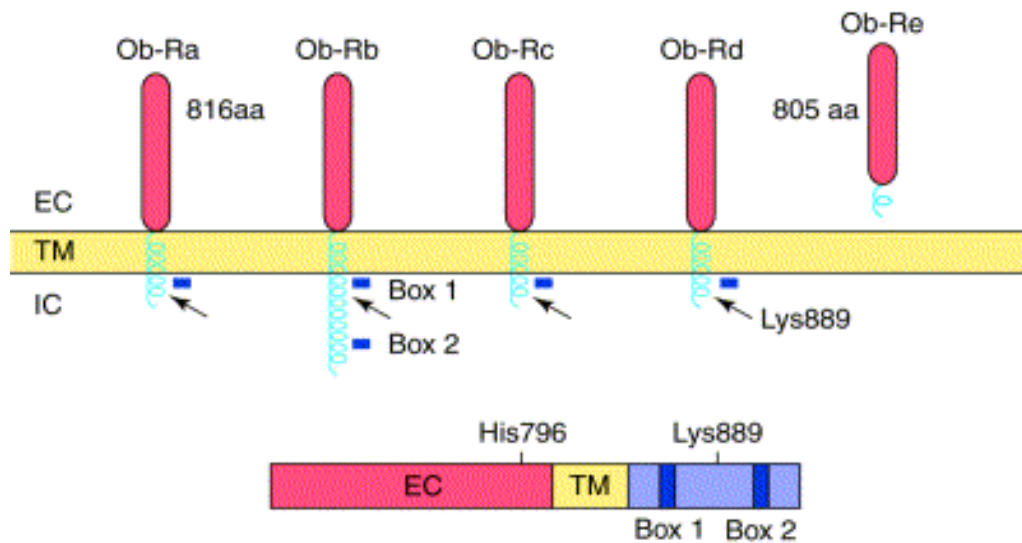
3.2 Récepteur et signaling intracellulaire

Ob-R, le récepteur de la leptine, est une protéine membranaire encodée par le gène *db* présentant des homologies avec des membres de la famille des récepteurs aux cytokines de classe I ; il fait d'ailleurs partie de la famille gp130 des récepteurs aux cytokines (Caprio *et al.*, 2001). Ce récepteur se retrouve notamment dans l'hypothalamus, le pancréas endocrine, les ovaires, les testicules, les cellules de la granulosa du cumulus oophorus, l'utérus, les reins, le cœur, les poumons, le foie et les muscles squelettiques (Goumenou *et al.*, 2003).

Il existe sous cinq différentes formes dues à cinq différents épissages de l'ARNm ayant pour résultat des récepteurs avec un domaine extracellulaire identique et un domaine intracellulaire de longueur variable (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Re) (Buchanan *et al.*, 1998). Toutes les isoformes, excepté Ob-Re, présentent un domaine extracellulaire de 816 acides aminés et une structure identique jusqu'à l'acide aminé Lys889 à partir duquel la structure de chaque type de récepteur diverge (Figure 3). L'isoforme Ob-Re est identique aux autres jusqu'à l'acide aminé His796 et se termine par un groupement additionnel de neuf acides aminés (Caprio *et al.*, 2001). Il représente l'isoforme la plus courte et ne possède pas de domaine intracellulaire, il pourrait représenter la forme soluble du récepteur (Brann *et al.*, 2002).

Avec son domaine intracellulaire de 302 acides aminés, le récepteur Ob-Rb représente l'isoforme la plus longue (entre 30 et 40 acides aminés en plus que les autres isoformes). Ob-

Rb est le seul à posséder les deux motifs protéiques Box 1 et Box 2 qui sont capables d'activer la voie JAK-STAT (Janus kinase-Signal transducers and activators of transcription) qui permet d'initier la cascade du signaling intracellulaire (Caprio *et al.*, 2001).



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Figure 3 : Représentation schématique des différentes isoformes du récepteur à la leptine (Caprio *et al.*, 2001).

Ob-Rb est aussi le seul à posséder des résidus de tyrosine intracellulaires qui, après phosphorylation, permettent une interaction avec des protéines de signaling spécifiques (Brann *et al.*, 2002).

Le signaling semble être initié par une homo-dimérisation du récepteur dimérique induite par la leptine qui se lie au domaine extracellulaire de celui-ci (Figure 4). Les voies de la transduction du signal médiées par le récepteur à la leptine et régulées par celle-ci comprennent des membres de la famille JAK, des transducteurs de signal et des activateurs de transcription (STAT), ainsi que des MAPK/ERK (Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase).

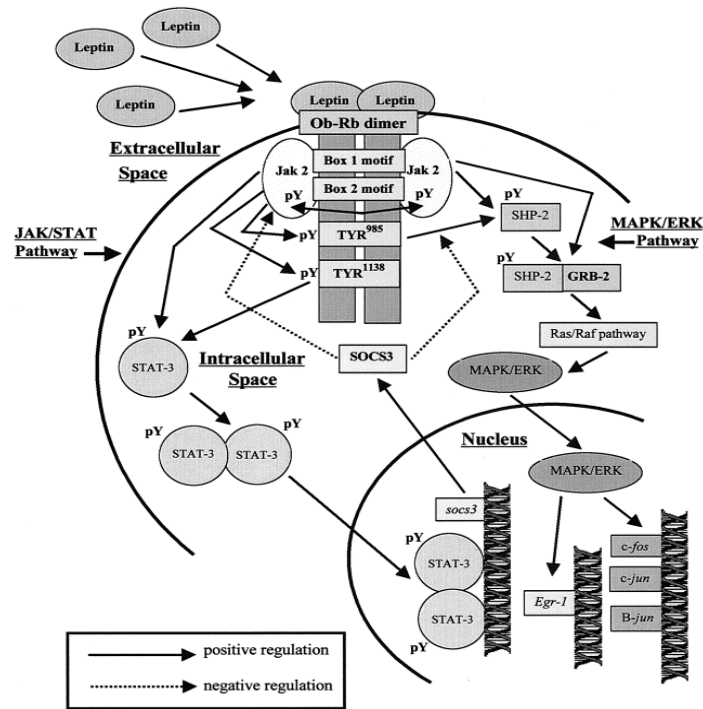


Figure 4 : Représentation schématique du signaling intracellulaire induit par la liaison de la leptine au récepteur Ob-Rb (Brann *et al.*, 2002).

Des études de transfection ont démontré que la liaison de la leptine au récepteur Ob-Rb résultait en une activation de la voie de signaling JAK/STAT ; quant aux cellules transfectées avec le récepteur Ob-Ra, elles ne présentaient pas d'activation de la voie JAK/STAT par la leptine (Brann *et al.*, 2002).

Le récepteur Ob-Rb est principalement exprimé dans l'hypothalamus et l'est beaucoup moins dans les tissus périphériques où la forme Ob-Ra est prévalante. Ob-Ra a un domaine intracellulaire plus court que celui de Ob-Rb (moins de 30 acides aminés), elle ne contient qu'un seul domaine de liaison à JAK et n'active pas la voie JAK/STAT. De récentes observations suggèrent que Ob-Ra transduite le signal via l'activation de MAPK (Caprio *et al.*, 2001).

3.3 Modèles *in vivo* de déficience et de résistance à la leptine

L'existence d'un modèle animal présentant une mutation homozygote du gène *ob* est un outil de grande valeur pour l'étude des messages biochimiques entre les réserves lipidiques et l'axe reproducteur (Caprio *et al.*, 2001)

Chez la souris *ob/ob*, une mutation d'une seule base sur le codon 105 du gène de la leptine a pour conséquence le remplacement d'une arginine par un codon « stop » et donc la production d'une forme inactive de la leptine. La souris *ob/ob* génétiquement obèse va être atteinte d'hyperinsulinémie, d'infertilité, d'hyperglycémie et de problèmes de fonctionnements thyroïdiens (Brann *et al.*, 2001). La souris *db/db*, quant à elle, présente une mutation dans le gène codant pour le récepteur de la leptine résultant en un splicing alternatif de la région codante et donc en la production d'une forme mutante du récepteur (Buchanan *et al.*, 1998). Les souris mutantes *ob/ob* sont donc déficientes en leptine en opposition aux souris mutantes *db/db* qui sont résistantes à la leptine.

Dans les années soixante, alors que la leptine n'avait pas encore été découverte, des expériences furent réalisées afin de découvrir d'où provenait l'infertilité des souris mutantes

ob/ob. D'abord, l'administration d'hormone de reproduction telles que la FSH, la LH et la relaxine à des souris *ob/ob* femelles fut une réussite pour l'induction de l'ovulation, de la gestation et de la mise bas, suggérant qu'une défaillance au niveau des hormones de reproduction était à la base de leur infertilité. Ensuite, la transplantation d'ovaires de souris *ob/ob* dans des souris saines et toujours fertiles après l'intervention démontra que le défaut de reproduction se situait au niveau du système nerveux central et non en périphérie (Chehab *et al.*, 2002).

Peu après la découverte de la leptine en 1994, il fut prouvé que cette dernière possédait la capacité de rendre la fertilité aux souris mutantes *ob/ob* mais une explication physiologique manquait. En 1996, Barash *et al.* émirent l'hypothèse que la leptine pourrait informer l'axe reproducteur de l'état nutritionnel corporel, permettant ainsi la reproduction si des réserves métaboliques suffisantes sont présentes ou la bloquant si ces réserves sont basses ou si le système métabolique est soumis à un stress. Un groupe de souris mutantes *ob/ob* mâles et femelles fut traité avec des injections de leptine recombinantes, un autre groupe de souris mutantes reçut quant à lui des injections de solution physiologique jouant ainsi le rôle de groupe témoin. Les résultats obtenus montrèrent que les souris qui avaient reçu de la leptine présentaient des taux d'hormones de reproduction plus élevés par rapport au groupe témoin ainsi qu'une augmentation du poids des organes reproducteurs stimulant de cette façon l'activité des gonades. Une perte de poids corporel fut également remarquée chez les souris traitées (Barash *et al.*, 1996).

Des mutations des gènes codant pour la leptine et son récepteur ont aussi été trouvées chez l'humain, celles-ci ont des caractéristiques phénotypiques similaires à celles montrées chez la souris (Caprio *et al.*, 2001).

3.4 Fonctions et physiologie de la leptine dans le métabolisme des graisses et la régulation de l'appétit

Au début, la leptine était perçue comme une molécule signal (Figure 6) dérivant des adipocytes (un adipostat) et ayant pour fonctions la limitation de l'ingestion alimentaire, l'augmentation des dépenses énergétiques, la répartition des nutriments entre les différents tissus ainsi que la modulation de la sécrétion de certaines hormones (Chilliard *et al.*, 2001 ; Auwerx et Staels 1998)

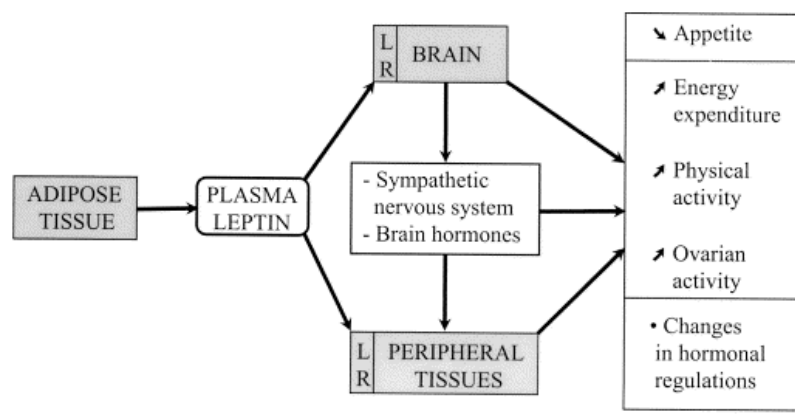


Figure 6 : Effets physiologiques de la leptine sécrétée par le tissu adipeux chez les rongeurs.

Les processus physiologiques qui sont dédiés à la reproduction tendent à être bas dans la liste des priorités relatives aux processus essentiels tels que la respiration cellulaire et la

thermorégulation car les processus de reproduction sont très coûteux d'un point de vue énergétique et peuvent être retardés quand la survie de l'individu est en danger. Donc, les différents aspects de la physiologie et des comportements de reproduction sont influencés par des facteurs comme la prise d'aliments, les réserves lipidiques, l'exercice et la température ambiante car ceux-ci influencent la disponibilité de l'énergie pour l'oxydation cellulaire. L'idée que la disponibilité du fuel métabolique est contrôlée et génère un signal qui influence la reproduction est connue sous le nom d'« hypothèse métabolique » (Schneider *et al.*, 2000).

Quand la nourriture est abondante et que les besoins énergétiques sont bas, la disponibilité des fuels oxydables est suffisante pour maintenir toutes les activités nécessaires à la survie de l'individu et pour des investissements énergétiques à long terme tels que la reproduction et les fonctions immunitaires. L'excès d'énergie quant à lui peut-être stocké sous forme de graisse corporelle (Figure 7A). Si la nourriture est insuffisante et que les fuels stockés ne sont pas hydrolysés en quantité suffisante pour combler ce manque, la disponibilité générale des fuels oxydables est basse. La reproduction est donc retardée ou inhibée. Les autres investissements énergétiques à long terme sont aussi inhibés (Figure 7B). Quand la dépense énergétique augmente et que cette dépense n'est pas compensée par une augmentation des fuels oxydables (ingestion de nourriture ou stocks énergétiques), alors la plupart des fuels sont utilisés pour la dépense énergétique. Moins d'énergie est donc disponible pour la reproduction qui est alors retardée ou inhibée (Figure 7C). Quand il y a une augmentation du stockage énergétique sans compensations alimentaires, la disponibilité générale des fuels oxydables est basse puisqu'ils sont utilisés pour le stockage. La reproduction est alors retardée (Figure 7D) ou inhibée (Schneider *et al.*, 2000).

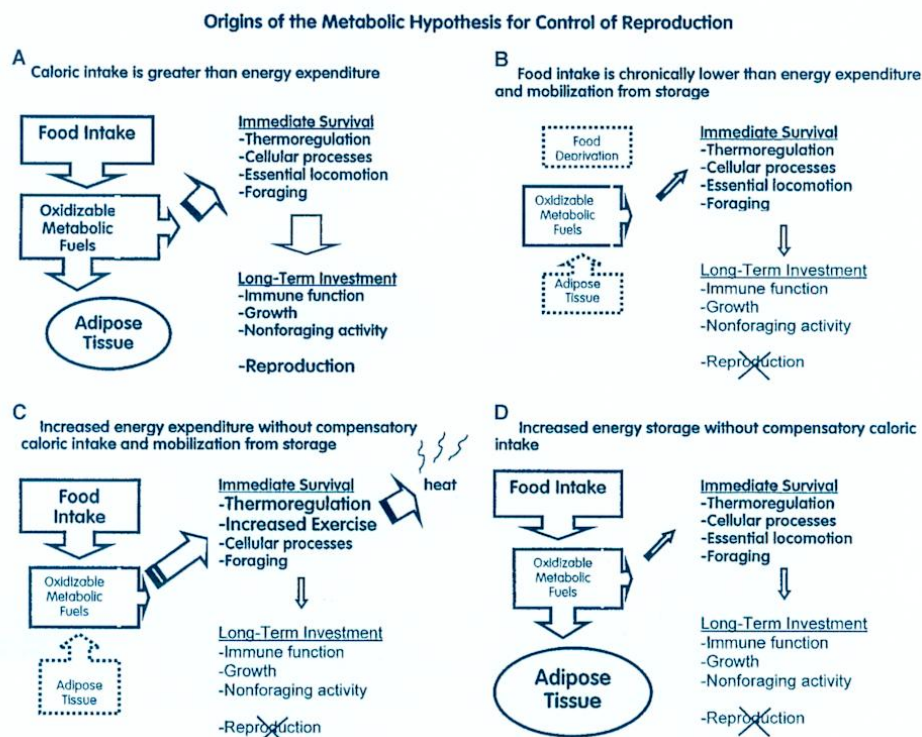


Figure 7 : Origines de l'hypothèse métabolique pour le contrôle de la reproduction (Schneider *et al.*, 2000).

La figure 7 illustre bien que les processus de reproduction sont donc plus liés à la disponibilité énergétique qu'aux réserves énergétiques. L'hypothèse métabolique soutient le fait qu'une teneur en graisses corporelles élevée n'est pas suffisante pour un cycle oestral normal quand l'énergie pour l'oxydation cellulaire est limitée (Schneider *et al.*, 2000)

3.5 Rôle de la leptine dans la fonction reproductive

Il existe assez de preuves pour affirmer que la leptine intervient bien dans la fonction reproductive chez les animaux. Malgré cela, les avis concernant l'effet de cette hormone dans la capacité reproductive des humains sont sujets à controverse (Goumenou *et al.*, 2003).

A. Fonction hypothalamo-hypophysaire

L'hypothalamus est un des premiers tissus où fut localisé l'ARNm des récepteurs à la leptine mais peu d'études ont pu évaluer l'effet direct de la leptine sur les fonctions hypothalamiques *in vitro* (Spicer 2001). Cependant, il a été prouvé que la leptine accélère la pulsativité de la GnRH proportionnellement à la dose administrée (Moschos *et al.*, 2002).

Des observations *in vitro* ont montré que des concentrations sub-nanomolaires de leptine, administrées à un hypothalamus de rat en incubation, stimulent la sécrétion de GnRH. Cependant, quand des concentrations micromolaires furent utilisées, l'effet stimulateur de la leptine fut perdu et la production de GnRH devint inférieure à celle des témoins. Les mêmes résultats furent obtenus lors d'expériences réalisées sur une lignée de cellules neuronales immortelles sécrétant du GnRH (Figure 8). Ces résultats suggèrent donc que la leptine agit de façon centrale pour influencer la reproduction, et que ses effets stimulateurs ne sont exercés que dans une gamme de concentrations assez réduite (Caprio *et al.*, 2001).

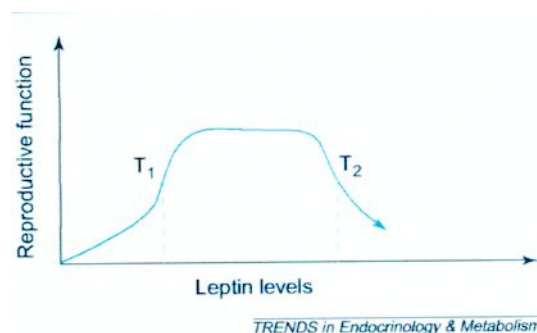


Figure 8 : La double action de la leptine au niveau de la fonction reproductive. T1 représente la concentration minimum de leptine requise pour le bon fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire et de la reproduction, et T2 représente la concentration au dessus de laquelle la leptine présente un effet inhibiteur dans la reproduction (ou encore concentration présente chez les personnes obèses) (Caprio *et al.*, 2001).

L'isoforme Ob-Rb du récepteur est surtout présent dans le noyau ventromédian et le noyau arqué de l'hypothalamus qui contrôlent à la fois les comportements sexuels et la prise de nourriture (Moschos *et al.*, 2002). Dans ces régions de l'hypothalamus, un grand nombre de neuropeptides hypothalamiques et de neurotransmetteurs sont impliqués dans la régulation de l'appétit. Les raisons pour lesquelles la leptine régule l'appétit aussi bien que les fonctions neuroendocrines sont grandes. Beaucoup de ces peptides et neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de l'appétit sont connus aussi pour avoir de l'influence sur la sécrétion de GnRH (Clarke et Henry 1999). On pense donc (Figure 9) que la leptine faciliterait la sécrétion de GnRH principalement via un mécanisme indirect, agissant au travers d'interneurones sécrétant des neuropeptides (Moschos *et al.*, 2002). Dans ces neuropeptides, on retrouve des peptides orexigéniques comme les opioïdes endogènes, le neuropeptide Y (NPY), la galanine, la MCH (Melanocortin-concentrating hormone), les protéines agouti-related, les orexines/hypocretines, etc., et des molécules anorexigéniques comme les peptides CRHR (corticotropin-releasing hormone-related), la neurotensine, la melanocortine, les CART

(cocaine-amphetamine related transcripts), les POMC (proopiomelanocortin), etc. (Magni *et al.*, 2000).

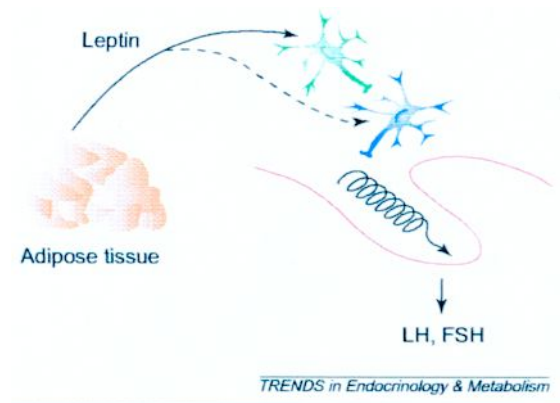


Figure 9 : La leptine stimule la sécrétion de GnRH à partir de l’hypothalamus soit via une action directe sur les neurones sécrétant de la GnRH (bleu), soit via des neurones sécrétant des peptides tels que POMC, NPY et CART (vert) (Caprio *et al.*, 2001).

Au niveau de l’hypophyse, l’injection de leptine chez des souris ob/ob femelles augmente les concentrations plasmatiques de LH et chez les mâles, les concentrations plasmatiques de FSH. De la même façon que chez les femelles rats adultes, un traitement de huit jours avec un anti-sérum de leptine cause une baisse de l’amplitude des pulses de LH et de la concentration plasmatique de LH (Spicer 2001) (Figure 10).

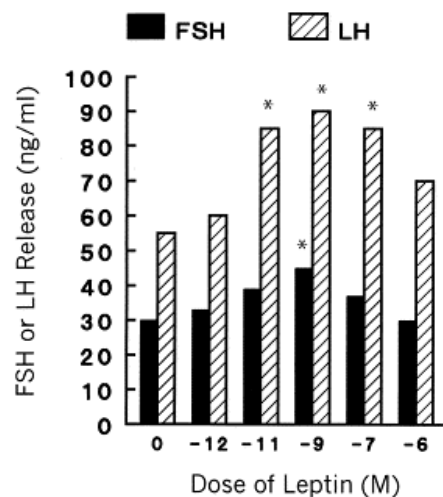


Figure 10 : Effet stimulateur de la leptine sur les quantités de FSH et de LH sécrétées par l’hypophyse chez le rat

Des expériences *in vitro* sur des cultures de cellules hypophysaires ont démontré que la leptine induit une augmentation de la sécrétion de LH, FSH et PRL (prolactine) proportionnellement à la dose administrée Brann *et al.*, 2001).

B. Pulsatilité de la leptine

La leptine est sécrétée selon un mode circadien soumis à des oscillations ultradiennes (Moschos *et al.*, 2002), les pulses sont en moyenne de 32 par jour et durent chacun en

moyenne 33 minutes (Prolo *et al.*, 1998). Sur une période de 24 heures, on remarque que sa sécrétion est plus élevée durant la nuit et plus basse durant la journée. De plus, la leptine présente, chez les femmes ayant un cycle ovulatoire normal, un cycle mensuel (Goumenou *et al.*, 2003).

Une synchronisation des pulses de LH, d'œstradiol et de leptine a été mise en évidence durant la seconde moitié de la phase folliculaire chez des femmes présentant un cycle ovulatoire normal. Des études plus détaillées indiquent que la leptine régule ou en tout cas contribue significativement à la régulation de la sécrétion de LH (Moschos *et al.*, 2002).

C. Dimorphisme sexuel

Il a été démontré que le niveau de leptine est plus élevé chez les hommes que chez les femmes dès le second stade de la puberté et ce durant toute la vie (Goumenou *et al.*, 2003).

Ce dimorphisme sexuel est dû à plusieurs facteurs différents. Tout d'abord, l'amplitude des pulses de leptine, et non leur fréquence, est deux à trois fois plus élevée chez les femmes. Deuxièmement, la masse graisseuse des femmes augmente de façon différente à la puberté ; Contrairement aux hommes, les femmes ont une proportion de graisse sous-cutanée par rapport à la graisse viscérale plus importante que les hommes. Or l'ARNm de la leptine est plus exprimé dans la graisse sous cutanée que dans les dépôts de graisse viscéraux. Troisièmement, les femmes ont une quantité totale de leptine plasmatique plus élevée mais moins de protéines de liaison à la leptine que les hommes, ce qui signifie plus de leptine sous forme libre. Enfin, les tissus adipeux féminins sont peut-être plus sensibles aux hormones ou à d'autres substances qui stimulent la production de leptine (Moschos *et al.*, 2002).

D. Fonction ovarienne et reproduction

Le rôle de la leptine dans la fertilité chez l'Homme reste assez obscur. L'effet du poids corporel sur la fonction gonadique, donc sur la fertilité, est connu depuis plus de 30 ans. Cependant, le lien entre l'état métabolique et la fonction de reproduction est encore un mystère pour la science au niveau de l'endocrinologie chez la femme. On pensait que le lien qui existait entre l'état métabolique et la fonction reproductive était attribué à un certain nombre de facteurs tels que l'insuline, des acides aminés et l'IGF-I (Insulin-like growth factor I). Aujourd'hui ce rôle est attribué à la leptine (Goumenou *et al.*, 2003).

I. Cycle menstruel

Les variations possibles de concentration de leptine plasmatique durant les différentes phases du cycle menstruel, caractérisé par d'énormes changements au niveau d'hormones interagissant avec la leptine, ont été étudiées (Moschos *et al.*, 2002).

Certaines études montrent qu'à partir de la moitié et jusqu'à la fin de la phase lutéale du cycle menstruel, alors que la concentration de leptine plasmatique augmente la nuit, la pulsativité de LH change en augmentant l'amplitude de ses pulses et en diminuant leur fréquence, devenant de cette façon synchrone aux pulses de leptine (Spicer 2001 ; Lindheim *et al.*, 2000). Le même phénomène se produit entre l'œstradiol et la leptine mais ce durant la nuit uniquement et pendant la phase folliculaire (Prolo *et al.*, 1998). Une corrélation significative entre les taux de leptine plasmatique et les taux de progestérone (P4) a aussi été mise en évidence (Holness *et al.*, 1999).

D'autres études ont montré à la fin du cycle des fluctuations de concentration plasmatique de leptine minimales mais insignifiantes, ou bien même nulle (Moschos *et al.*, 2002).

Quelques études, mais pas toutes, ont prouvé que la concentration de leptine plasmatique déclinait chez les femmes post-ménopausées et particulièrement chez les femmes obèses probablement à cause des concentrations de stéroïdes altérées (Moschos *et al.*, 2002).

II. Fonction utérine

Bien que l'ARNm de la leptine n'est pas détectable dans le tissu utérin de rat et de souris, l'ARNm du récepteur à la leptine lui augmente à raison de 270% durant la gestation mais sa fonction reste inconnue (Spicer 2001). De même, l'endomètre humain exprime l'ARNm du récepteur à la leptine et le taux de celui-ci présente une augmentation pendant la phase post-ovulatoire qui est en relation avec la possible implantation de l'embryon. Par conséquent, la leptine pourrait jouer un rôle dans le développement prématuré de l'embryon (Goumenou *et al.*, 2003).

III. Fonction ovarienne

Il existe une multitude d'informations prouvant qu'une corrélation positive est bien présente entre la leptine et la reproduction chez l'homme. Les récepteurs à la leptine (la forme Ob-Ra (Clarke et Henry, 1999)) ont été identifiés dans les ovaires et les testicules, ce qui encourage la conclusion que la leptine doit avoir une action directe sur la fonction reproductive des gonades. Le fait que la leptine et ses récepteurs isomorphiques soient mis en évidence dans les follicules ovariens pré-ovulatoires humains et la présence de cette hormone dans l'oocyte mature suggère que la leptine participe à la reproduction en exerçant son action également au niveau ovarien. Le rôle de la leptine dans le développement de l'ovule reste encore peu éclairci. Cependant, il est possible que la leptine régule la transcription de l'ovocyte et de l'embryon (Goumenou *et al.*, 2003).

La leptine relie donc le tissu adipeux avec les gonades. Cette affirmation dérive du fait qu'une valeur particulière de leptine est nécessaire pour actionner le système reproducteur (Figure Xk). De plus, le fonctionnement normal l'axe hypothalamo-hypophysaire présuppose l'existence d'une valeur critique de leptine et le maintien de son cycle circadien (Goumenou *et al.*, 2003).

L'action directe de la leptine au niveau ovarien est soutenue par plusieurs preuves. D'abord, les cellules de la granulosa et de la thèque ont des récepteurs à la leptine de haute affinité. Deuxièmement, les récepteurs à la leptine ont été identifiés chez l'humain au niveau des ovaires, sur les cellules de la granulosa et de la thèque, et dans des testicules. Troisièmement, la leptine a des effets directs sur des cultures cellulaires de granulosa *in vitro*. Quatrièmement, un traitement à la leptine (1 µg/ml) concomitant à la LH diminue le taux d'ovulation de 77% en comparaison avec un traitement à la LH seule sur des ovaires de rats ayant reçu un traitement à la FSH par périfusion *in vitro*. In vivo, la leptine exogène cause une diminution du taux d'ovulation de 67% chez des rats prétraités avec de la gonadotropine. Ensemble, ces études indiquent que l'ovaire serait un organe cible pour la leptine (Spicer 2001).

IV. Cellules de la granulosa

In vitro, dans l'ovaire bovin, la leptine est un antagoniste direct de l'effet stimulateur de l'insuline sur la stéroïdogenèse dans la granulosa et, quand l'insuline est absente, la leptine produit peu ou pas d'effets sur la stéroïdogenèse dans les cellules de la granulosa. De plus, la leptine est un puissant inhibiteur de l'activité aromatasase induite par l'insuline surtout dans les cellules non-différenciées de la granulosa ($IC_{50} = 30\text{ng/ml}$) et moins dans les cellules différenciées ($IC_{50} = 90\text{ng/ml}$). Cette information implique que le nombre de récepteurs dans les cellules de la granulosa diminue au fur et à mesure que le follicule grossit et se développe, rendant ainsi les follicules matures (follicules de De Graaf) moins sensibles aux effets négatifs de la leptine. Comme la concentration de leptine plasmatique chez les femmes maigres et obèses se situent dans une marge de, respectivement, 2 à 10 ng/ml et de 10 à 100 ng/ml, ces résultats *in vitro* indiquent que la leptine doit avoir un impact direct sur la fonction ovarienne des cellules de la granulosa. Bien que le point d'action de la leptine sur la stéroïdogenèse reste à élucider, les résultats d'études chez les bovins indiquent que l'effet inhibiteur de la leptine sur l'action de l'insuline n'est pas médié par inhibition directe. En effet, la leptine ne bloque pas directement les récepteurs à l'insuline, mais elle atténue plutôt la phosphorylation de la tyrosine des récepteurs rendant de cette façon l'insuline moins efficace sur ses propres récepteurs. Il est intéressant de constater que la leptine n'a pas d'effets sur l'augmentation basale ou due à l'insuline du nombre de cellules dans la granulosa. Ces observations indiquent que la leptine n'influence pas l'activité mitotique de l'insuline mais plutôt qu'elle réduit la stéroïdogenèse induite par l'insuline. Brannian et al. ont aussi découvert que l'effet inhibiteur de la leptine sur la production de progestérone des cellules lutéinisées de la granulosa humaine stimulées par hCG (human chorionic gonadotropin) ne se manifeste qu'en présence de l'insuline. En plus, le niveau de leptine dans le fluide folliculaire est en corrélation négative avec la qualité des embryons chez les patientes subissant une fécondation *in vitro* (FIV). Butzow et al. ont conclu que de fortes concentrations en leptine peuvent réduire la réponse ovarienne aux gonadotropines chez les patientes soumises à une FIV, et donc cela explique pourquoi les individus obèses présentant de fortes concentrations en leptine ont besoin de plus grandes quantités de gonadotropines pour réussir une hyperstimulation ovarienne que les sujets maigres (Spicer *et al.*, 2001 ; Cameo *et al.*, 2003) .

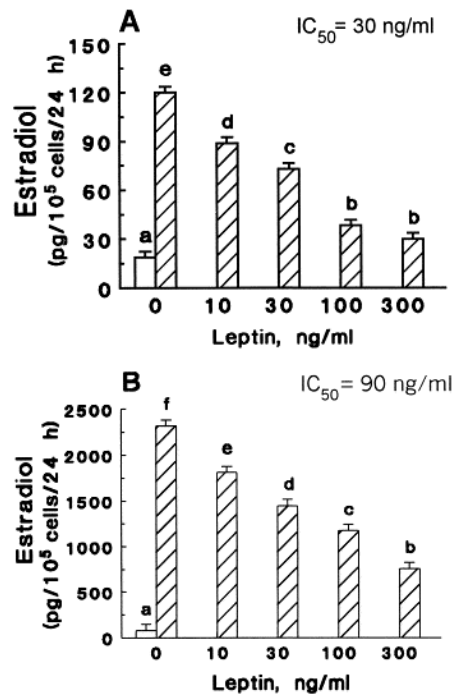


Figure 11 : Représentation de l'effet inhibiteur de la leptine sur l'activité aromatasé induite par l'insuline dans les cellules de la granulosa chez le bovin.

A. : Les cellules de la granulosa des petits follicules (1 à 5 mm) ont été mises en culture 24 heures avec de la FSH (barres blanches) ou de la FSH et de l'insuline (barres hachurées) et différentes doses de leptine.

B. : Les cellules de la granulosa des gros follicules (>8 mm) ont été mises en culture 24 heures avec de la FSH (barres blanches) ou de la FSH et de l'insuline (barres hachurées) et différentes doses de leptine.

IC_{50} étant la concentration de leptine requise pour inhiber de 50% la sécrétion d'œstradiol.

La leptine inhibe la production d'œstradiol induite par IGF-I et $TGF\alpha$ (transforming growth factor α) au niveau des cellules de la granulosa de rat mais elle n'a aucun effet sur cette même production d'œstradiol dans les cellules de la granulosa de bovin, sur la production de progestérone induite par la FSH au niveau de la granulosa de rat, ou encore sur la production de progestérone et d'œstradiol induite par la LH au niveau des ovaires de rat. Zachow et Magoffin ont découvert que la leptine inhibe la production d'œstradiol induite par la FSH et l'IGF-I, à moins de 30% quand la FSH est à dose optimale, et à plus de 80% quand la FSH est à dose sub-optimale. Donc, la dose de FSH influence beaucoup la magnitude de l'inhibition de la stéroïdogénèse induite par IGF-I provoquée par la leptine. Dans des cultures cellulaires de granulosa humaine, la leptine inhibe la production d'œstradiol induite par la FSH et l'IGF-I et la production d'œstradiol induite par la LH en présence de 1% de sérum fœtal bovin.

Ensemble, ces études indiquent que de fortes concentrations en leptine ($\geq 100 \text{ ng/ml}$), caractéristiques des femmes obèses, inhibent principalement la stéroïdogénèse stimulée par l'insuline, l'IGF-I, les glucocorticoïdes et/ou les gonadotropines. Des études plus poussées sont requises pour élucider la spécificité hormonale de l'action inhibitrice de la leptine dans les ovaires bovins, humains et murins.

V. Cellules de la thèque

La leptine est aussi un antagoniste direct des effets stimulateurs de l'insuline sur la stéroïdogenèse dans les cellules de la thèque chez les bovins. La leptine inhibe aussi la production d'androstènedione induite par l'IGF-I et la LH au niveau des cellules de la thèque, mais pas dans les cellules thécales bovine. Comme mentionné plus haut, la concentration de leptine plasmatique chez les femmes maigres et les femmes obèses sont dans une gamme de, respectivement, 2 à 10 ng/ml et 10 à 100 ng/ml. Donc, la concentration plasmatique de leptine pourrait avoir un impact plus important sur la fonction ovarienne des cellules thécales que sur la fonction ovarienne des cellules de la granulosa à la fois chez les individus maigres et obèses.

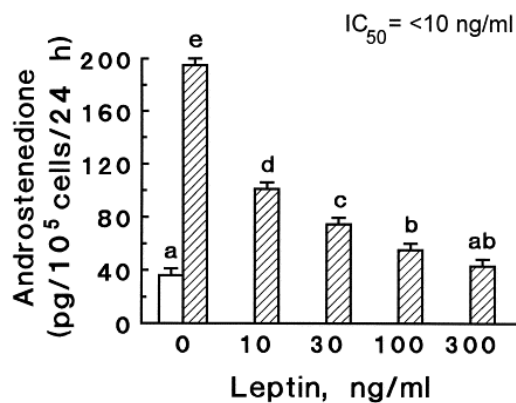


Figure 12 : Représentation de l'effet inhibiteur de la leptine sur la production d'androstènedione induite par l'insuline dans les cellules thécales bovines. Les cellules thécales de gros follicules ont été mises en culture 24 heures avec de la LH (barres blanches) ou avec de la LH et de l'insuline (barres hachurées) et différentes doses de leptine. IC₅₀ étant la concentration de leptine requise pour inhiber 50% de la sécrétion d'androstènediol.

Bien que le point d'action de la leptine sur la stéroïdogenèse des cellules de la thèque requière aussi des études approfondies, l'effet inhibiteur de la leptine sur l'action de l'insuline n'est pas médiée par une inhibition directe de son récepteur. De plus, les effets *in vitro* observés sur les cellules thécales bovines ne sont pas dus à un changement de viabilité cellulaire car ni l'insuline, ni la leptine n'ont d'effet sur la viabilité des cellules thécales ensemble ou séparément. La leptine (3 et 100 ng/ml) n'a pas non plus d'effet sur la prolifération basale ou induite par l'IGF-I. Bien que l'effet positif de la leptine sur la prolifération des cellules thécales induite par l'insuline soit en accord avec l'effet positif de la leptine sur la reproduction et la croissance cellulaire chez les souris *ob/ob*, l'effet inhibiteur de la leptine sur la stéroïdogenèse des cellules thécales quant à lui ne l'est pas. Donc, les informations *in vitro* récentes indiquent que la leptine pourrait exercer un effet inhibiteur direct sur la fonction ovarienne *in vivo* en inhibant la stéroïdogenèse à la fois au niveau des cellules de la thèque et des cellules de la granulosa, conduisant ainsi à une diminution de la sécrétion d'œstradiol.

On émet donc l'hypothèse qu'une concentration de leptine en augmentation mais modérée (<10 ng/ml) lors de l'apparition de la puberté ou d'ingestion de nourriture après un état de privation nutritionnelle, agit pour déclencher l'axe reproducteur au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Dans un environnement pauvre en leptine (par exemple la mal-nutrition), la fonction ovarienne est dirigée principalement par les gonadotropines et le complexe insuline/IGF-I. Dans un environnement avec un taux de leptine modéré à élevé (par exemple l'obésité), l'ovaire est empêché de « surproduire » de l'œstradiol grâce à l'effet inhibiteur de la leptine sur la production d'androstènedione induite par l'insuline au niveau des cellules de

la thèque et à son activité aromatasé au niveau des cellules de la granulosa (Figure Xj) (Spicer 2001).

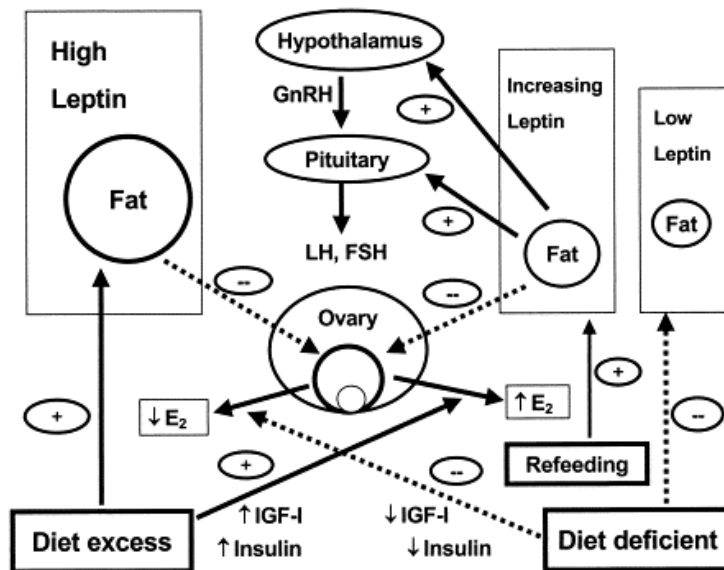


Figure 13 : Schéma sommaire du rôle de la leptine dans la régulation de la fonction reproductive. Les flèches pleines représentant les effets stimulateurs, et les flèches pointillées représentant les effets inhibiteurs.

La raison pour laquelle la leptine a un effet positif sur la reproduction et la fonction ovarienne chez les souris ob/ob mais négatif sur la stéroïdogénèse des cellules ovariennes in vitro n'est pas encore éclaircie. Cette absurdité peut-être expliquée par les multiples sites d'actions possibles de la leptine au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadal in vivo (Spicer 2001).

Chapitre II : **Objectifs**

L'étude réalisée a pour objectifs d'une part de mettre en évidence la présence de récepteurs à la leptine dans les différents tissus composant l'ovaire, d'autre part de déceler un effet direct éventuel de la leptine sur l'activité ovarienne chez le bovin, et enfin de contrôler l'état de leptinémie des vaches avant la mise en culture des follicules ovariens.

La mise en évidence des récepteurs à la leptine est réalisée grâce à deux techniques. La première est l'immunohistochimie grâce à laquelle on pourra observer les récepteurs de façon plus précise dans les tissus mais aussi les « quantifier » selon l'intensité du marquage réalisé. La seconde technique utilisée est une extraction d'ARN suivie d'une RT-PCR semi-quantitative des différents tissus composants les ovaires.

Afin de déceler une éventuelle influence directe de la leptine, les follicules sont mis en périfusion *in vitro* avec un pré-conditionnement à court terme avec des taux de leptine différents. Le liquide périfusé et récolté toutes les demi-heures sera soumis à un dosage afin de quantifier les hormones stéroïdiennes sécrétées durant le traitement.

Enfin le contrôle de l'état de leptinémie sera réalisé grâce à la technique de RT-PCR semi-quantitative sur de la graisse sous cutanée prélevée sur les carcasses des vaches dont les ovaires ont été prélevés. Cette synthèse de leptine sera corrélée avec la stéroïdogénèse des follicules mis en culture.

Chapitre III :
Matériel et méthodes

1. Culture in vitro des follicules ovariens

1.1 But

Le but de cette expérience est d'étudier les effets d'une pré-incubation en présence de concentrations variables de leptine sur la réponse stéroïdienne à une stimulation standardisée avec de la LH et de la FSH.

1.2 Matériel biologique

Les ovaires bovins sont prélevés à l'abattoir de Ciney au moment de l'abattage et sont transportés dans du liquide physiologique maintenu à une température de 4°C. Les follicules et corps jaune sont disséqués dès l'arrivée au laboratoire, à l'aide de ciseaux de microchirurgie.

1.3 Système de périphérie

La technique de culture in vitro utilisée est la pérefusion. Elle garantit la survie des follicules pendant au moins 10 heures et permet d'examiner la dynamique des sécrétions stéroïdiennes et l'influence d'un traitement hormonal administré in vitro sur ces sécrétions.

Le système de pérefusion utilisé (figure 15) a pour principe d'isoler les follicules dans des chambres maintenues à 37°C et de les pérefuser à l'aide d'un milieu spécifique (M199). Le fond du bassin, qui contient l'eau thermostatée, est percé de trous dans lesquels s'adaptent des bouchons en caoutchouc. Des seringues de 2 ml (5 ml en cas de gros follicule), servant de chambre de culture, sont plantées dans ces bouchons par des aiguilles qui les traversent de part en part. Dans le fond de ces seringues, on met un filtre qui sert de support aux follicules. Les seringues sont fermées hermétiquement par un bouchon de caoutchouc percé d'une aiguille par laquelle le milieu est injecté. La thermostatation et l'homogénéisation du bain-marie sont assurées par une pompe thermostatique (Thermomix 1441). La pérefusion est réalisée par une pompe péristaltique (Watson-Marlow 501) qui assure un débit constant (0,078 ml/minute) dans chaque chambre de culture par des microtubes en Tygon. Le milieu est pérefusé goutte à goutte. A la sortie de chaque chambre de culture, des tubes recueillent le milieu pérefusé. Ils sont changés toutes les 30 minutes (Bister *et al.*, 1999)

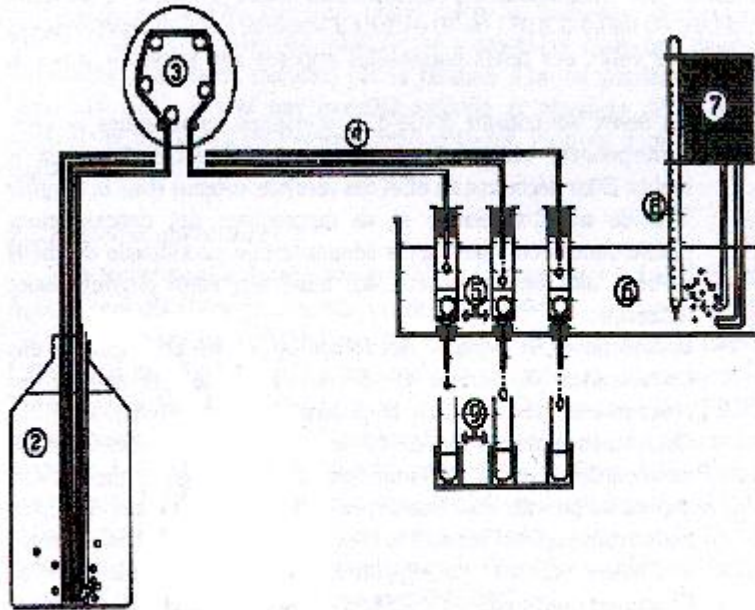


Figure 15 : *Système de périfusion*. 2 : milieu de culture ; 3 : pompe péristaltique ; 4 : tuyau en tygon ; 5 : chambre de culture ; 6 : bain thermostatisé ; 7 : pompe présitaltique ; 8 : thermomètre ; 9 : tubes collecteurs (Noël *et al.*, 1998)

Ce système permet de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques. Le milieu est continuellement renouvelé, évitant ainsi l'accumulation de métabolites. Les sécrétions peuvent être établies pour chaque follicule selon un mode cinétique. Les follicules peuvent être soumis *in vitro* à des stimulations hormonales réalisées de façon continue ou pulsatile.

1.4 Stimulation des follicules *in vitro*

Une stimulation standardisée des follicules ovariens *in vitro* a été mise au point au laboratoire : elle se déroule pendant 6 heures durant lesquelles on effectue des récoltes toutes les 30 minutes en vue d'étudier la quantité d'œstradiol et de progestérone secrétée par follicules.

La leptine utilisée pour la stimulation est soit murine soit bovine, sa concentration varie dans les différents groupes afin de voir si l'effet qu'elle produit éventuellement varie selon le type de leptine et sa concentration. Elle est répartie comme suit :

- Série 1 : Groupe 1 (témoin) → pas de leptine
 Groupe 2 → Leptine bovine à 5 ng/ml
 Groupe 3 → Leptine murine à 1 ng/ml
 Groupe 4 → Leptine murine à 5 ng/ml
 Groupe 5 → Leptine murine à 20 ng/ml
- Série 2 : Groupe 1 (témoin) → pas de leptine
 Groupe 2 → Leptine murine à 1 ng/ml
 Groupe 3 → Leptine murine à 5 ng/ml
 Groupe 4 → Leptine murine à 20 ng/ml

Le programme de la périfusion est établi comme suit :

0h00 : Mise en culture des follicules dans 500µl de TCM199 à 37°C.

0h00-1h00 : TCM199

1h00-1h30 : TCM199 + Leptine

1h30-1h50 : TCM199 + LH (10 ng/ml) (voir annexe).

1h50-2h00 : TCM199

2h00-3h00 : TCM199 + FSH (15 ng/ml) (voir annexe).

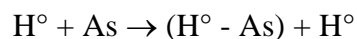
3h00-6h00 : TCM199

2. Dosages hormonaux par R.I.A.

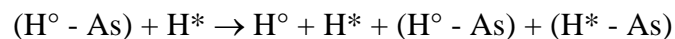
2.1 Principe

Le dosage radio-immunologique est basé sur la compétition entre une quantité déterminée d'hormone marquée par la fixation d'un ou plusieurs atomes radioactifs (I^{125} , H^3) et une quantité variable et inconnue de la même hormone se trouvant dans l'échantillon à analyser, vis-à-vis d'un anti-sérum (As) qui leur est spécifique.

L'hormone « froide » (H^o) peut se lier à l'anti-sérum spécifique et la réaction peut s'écrire de la manière suivante :



En ajoutant à ce système l'hormone marquée, on obtient une nouvelle équation :



La quantité d'hormone marquée (H^*) fixée aux anticorps est d'autant plus faible que celle de l'hormone « froide » (H^o) contenue dans l'échantillon sera élevée, et inversement.

On peut calculer la quantité de H^o , en séparant H^* liée à l'anti-sérum de H^* libre, par analyse de la radioactivité de l'une de ces deux fractions. On prend comme référence, une courbe standard effectuée dans les mêmes conditions avec des quantités connues et croissantes d' H^o .

2.2 Appareillage

La mesure de la radioactivité, fournie par l'émission de rayonnements β (H^3), est effectuée par un analyseur de scintillation à passeur d'échantillons Beckman LS6000SC. Le temps de comptage est fixé à 3 minutes/échantillon.

La mesure de la radioactivité γ (I^{125}) est réalisée sur le compteur GammaMaster LKB Wallac à passeur d'échantillons, avec un temps de comptage fixé à 60 secondes/échantillon.

2.3 Calcul des résultats

La radioactivité de la fraction liée peut être déterminée selon cette équation :

$$A = A_0 \frac{C_m}{C_m + C_f} + BG$$

A : radioactivité de la fraction liée (en cpm) pour une certaine concentration en hormone froide

A₀ : radioactivité maximale de la fraction liée (en cpm), c'est-à-dire pour C_f = 0

BG : radioactivité non spécifique (Background)

C_m : concentration en hormone marquée

C_f : concentration en hormone froide

Cette équation permet de transformer en concentrations hormonales (ng/ml) les données obtenues en cpm.

La mesure des paramètres de cette formule (A₀, C_m et BG) est réalisée par un fitting de la courbe grâce au logiciel MATLAB.

2.4 Dosage de l'œstradiol (E₂)

A. Technique

I. Extraction (dans des tubes de verre de 10 cm)

Pour l'extraction, on va prélever 200 µl de milieu (en double), auquel on va ajouter 2000 µl de diéthyléther PA. Le tout doit être vortexé 2 minutes et centrifugé 15 minutes à -20°C à 2000 rpm. Ensuite, on place les tubes au congélateur à -20°C, pendant plus ou moins 1 heure (la phase aqueuse doit être gelée). Après cette étape, on transvase la totalité du surnageant dans un autre tube de verre et on fait évaporer à sec dans l'étuve sous vide à 37°C.

II. Fixation

Pour la fixation, on reprend l'extrait sec par 300 µl de Wide, le tout doit être vortexé, puis on y ajoute 100 µl de ³HE_{17β} (plus ou moins 10 000 cpm) et 100 µl d'As E_{17β} (Marloie). Ensuite on vortexe une nouvelle fois et on place les échantillons 30 minutes à 37°C au bain-marie ou 1 heure à l'étuve, à la même température. On place l'ensemble une nuit au frigo à 4°C.

III. Séparation

La séparation consiste à ajouter, aux échantillons provenant du frigo, 500 µl de Dextran-Charcoal à 4°C. Ensuite on mélange bien le tout et on incube 10 minutes à 4°C. Puis on centrifuge pendant 10 minutes à 4°C et à 2000 rpm.

IV. Comptage

Pour le comptage, on ajoute à 250 µl de surnageant, 2,5 ml de liquide scintillant, on agite puis on laisse reposer avant de les passer au compteur β.

B. Solution de travail

- Tampon phosphate 0.6M : il est constitué de 7,5 g de KH_2PO_4 (PM= 136,09), 77,9 g de Na_2HPO_4 (PM= 141,96), le tout porté à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Tampon Wide 0,06M pH 7,55: on dilue 10 fois le tampon phosphate 0,6M, puis on ajuste le pH à 7,5.
- Tampon BSA 0,5% : on ajoute à 5 g de BSA 1 litre de Wide et une pointe d'azide.
- Diéthyl éther P.A.
- Liquide scintillant (écosint)
- As $\text{E}_{17\beta}$: c'est de l'As lyophilisé de Marloie reconstitué par 10 ml d'eau distillée.
- $\text{E}_{17\beta}$ tritié :
 - a) Solution stock : (à partir de produit Amersham TRK-322 ou TRK-587) elle est constituée de 50 µl de $\text{E}_{17\beta}$ tritié et de 5 ml d'éthanol P.A.
 - b) Solution à $\pm 10\ 000$ cpm/100 µl : Elle est constituée de 100 µl de solution stock et de 10 à 15 ml de Wide.
- Les standards :
 - a) Solution stock à 10 µg $\text{E}_{17\beta}$ /ml : elle est constituée de 0,1630 mg de $\text{E}_{17\beta}$ et de 16,3 ml d'éthanol P.A. (doit être conservée au congélateur)
 - b) Solution à 1 000 ng/ml : elle se compose de 500 µl de solution stock porté à 5 ml avec de l'éthanol P.A., stockée dans des tubes de 1 ml au congélateur.
 - c) Solution à 10 ng/ml : elle doit être préparée à chaque dosage et se compose de 100 µl de solution à 100 ng/ml portés à 10 ml avec de l'éthanol P.A.
 - d) Solution à 1 ng/ml : 1 ml de solution à 10 ng/ml portés à 10 ml de tampon.

C. Courbe standard

La courbe standard est établie à partir des solutions à 10 000 pg/ml et 1000 pg/ml.

	pg/ml	Vol. standards	Vol. diluant
1	2000	200 µl de sol.	800 µl
2	1000	1000 µl	-
3	500	500 µl	500 µl
4	200	200 µl	800 µl
5	100	100 µl	900 µl
6	50	50 µl	950 µl
7	20	20 µl	980 µl
8	0	0 µl	1000 µl

2.5 Dosage de la progestérone (P₄)

Pour le dosage de la progestérone, on utilise un kit : « BIOSOURCE PROG-RIA-CT kit ».

A. Principe

Une quantité fixe de progestérone marquée avec I¹²⁵ entre en compétition avec la progestérone qui doit être mesurée et qui est présente dans l'échantillon ou dans le standard. La progestérone marquée et celle à mesurer doivent se fixer aux sites d'anticorps présents en nombre fixe et fixé dans le fond des tubes de polystyrène (tubes coatés). Pour ce dosage, il n'y a pas besoin d'extraction ni de chromatographie.

Après 3 heures d'incubation à température ambiante, une étape d'aspiration stoppe la réaction de compétition et sépare la fraction liée de la fraction libre. Les tubes sont ensuite lavés avec 3 ml de solution de lavage et ensuite aspirés. Une courbe standard est déterminée et les concentrations en progestérone de l'échantillon sont déterminées par interpolation des doses de cette courbe standard.

B. Technique

Les analyses sont réalisées en deux exemplaires.

- Pipeter 50 µl de standards, échantillons ou contrôles et verser 50 µl dans les tubes coatés respectifs.
- Ajouter 500 µl de traceur dans chaque tube.
- Secouer les tubes doucement pour enlever les bulles.
- Incuber durant 4 heures à température ambiante et centrifuger les tubes à 700 rpm.
- Vider et aspirer le contenu de chaque tube.
- Laver les tubes avec 3 ml de solution de lavage et les vider après quelques minutes. Eviter de faire mousser pendant l'addition de la solution de lavage.
- Laisser les tubes sur la table pendant quelques minutes et aspirer le restant des gouttes de liquide avec soin.
- Compter les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes.

C. Calcul des résultats

On calcule la moyenne des résultats obtenus en double et on met de côté les valeurs erronées. Ensuite, on calcule la radioactivité comme un pourcentage, d'après la formule suivante :

$$B/B_0 \times 100 = (\text{valeur du standard ou de l'échantillon} / \text{la valeur du standard zéro}) \times 100$$

3. RT-PCR semi-quantitative

3.1 Principe

Une méthode semi-quantitative est utilisée pour l'étude de l'expression des gènes par RT-PCR. Celle-ci consiste à amplifier un gène de référence, appelé 'housekeeping gene', connu pour être exprimé à un niveau constant dans la plupart des tissus. Un des standards externes couramment employés et qui est utilisé dans cette expérience est l'ARNm de β -actine. L'intensité de l'ADN de leptine est comparée à celle de la β -actine sur gel et permet d'estimer les différences de taux d'expression de la leptine entre échantillons.

3.2 Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN est réalisée sur de la graisse sous-cutanée prélevée sur les carcasses des vaches dont nous avons récolté les ovaires. Notre but était de le retransformer grâce à la RT (reverse transcription) en ADN pour pouvoir isoler et amplifier le gène de la leptine PCR (polychain reaction), et ainsi d'évaluer l'état de leptinémie de la vache avant le prélèvement ovarien et la périfusion des follicules.

A. Principe

L'extraction d'ARN se fait avec du TriPur qui est une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate car il maintient l'intégrité de l'ARN lors de la destruction et de la dissolution des composants cellulaires. L'addition de chloroforme, suivie d'une centrifugation, sépare la solution en une phase aqueuse et une phase organique (micro-culot) contenant l'ARN. Après élimination de la phase aqueuse, l'ARN est récupéré par précipitation avec de l'alcool isopropylique.

B. Matériel

- Une tige ultraturax nettoyée avec une solution de lavage (NaOH 1M) rincée à l'eau distillée autoclavée et incubée une nuit dans l'étuve à 120°C emballée dans du papier aluminium
- Tubes à essai à fond rond de 13 cm
- Eau distillée autoclavée
- Eppendorf
- TriPur
- Chloroforme
- Isopropanol
- Ethanol 75%
- T₁₀E₁ autoclavé
- Glace pillée

C. Protocole

- Mettre 1 ml de TriPur dans un tube à fond rond auquel on ajoute 200mg de tissu adipeux le tout conservé dans la glace pillée entre les étapes.
- Homogénéiser à l'aide de l'ultraturax (environ 2 minutes avec des mouvements de rotations et verticaux).

- Transvaser l'homogénat dans un eppendorf de 1,5 ml et le laisser reposer à température ambiante pendant 5 minutes.
- Centrifuger à l'aide d'une microcentrifugeuse à 12 000 rpm pendant 15 minutes et ce à 4°C.
- L'excès de graisse obtenu en surface doit être éliminé à l'aide d'un tips. Transvaser le surnageant dans un autre eppendorf de 1,5 ml en veillant à ne pas prendre le culot de graisse et laisser reposer 5 minutes.
- Ajouter 200 µl de chloroforme et mélanger par inversion pendant 15 secondes. Laisser reposer ensuite 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 12 000 rpm (attention pas plus) pendant 15 minutes à 4°C.
- Prélever et transvaser la phase supérieure transparente contenant l'ARN à l'aide d'une pipette de 100 µl. (L'ADN étant dans la phase blanche et la fraction organique dans la phase rouge.). Ajouter 500 µl d'isopropanol par ml de TriPur, mélanger par inversion pendant 15 secondes et laisser reposer pendant 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour obtenir un micro-culot d'ARN.
- Éliminer le surnageant à l'aide d'un tips et ajouter 1 ml d'éthanol 75% pour laver le micro-culot.
- Centrifuger à 7500 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Retirer le surnageant à l'aide d'un tips et sécher le culot à l'air libre en prenant garde de ne pas le sécher complètement afin de pouvoir le dissoudre facilement.
- Suspendre le culot dans 20 µl de T₁₀E₁ autoclavé à l'aide d'un tips et bien mélanger le culot à la solution

D. Dosage de l'ARN

La méthode utilisée pour le dosage d'ARN part du principe que les acides nucléiques absorbent la lumière UV à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité de densité (DO) correspond à une concentration connue en ADN double brin, ARN ou ADN simple brin.

1 DO= 50 µg/µl d'ADN double brin

40 µg/µl d'ARN

33 µg/µl d'ADN simple brin

La pureté de l'ARN peut-être estimée en calculant le rapport de l'absorbance à 260 nm et de l'absorbance à 280 nm. Théoriquement, de l'ARN pur a un rapport entre 1.8 et 2 sauf si la dissolution de l'ARN dans l'eau est partielle car le rapport sera alors inférieur à 1.6.

Une fois le dosage effectué, l'ARN sera aliquoté dans des éppendorfs stériles (0,5 ml). La quantité d'ARN présente dans un éppendorf doit se situer entre 2 et 2.5 µg.

Pour effectuer ce dosage et estimer la pureté, un spectromètre (Biotech Photometer, UV 1101 de chez Labo-Modern) a été utilisé.

3.3 RT-PCR semi-quantitative ***(Reverse transcription-Polychain reaction)***

A. Principe

Grâce à la RT-PCR, on va tenter de quantifier l'expression de la leptine ou de son récepteur par rapport à l'expression de la β-actine dans le tissu adipeux des vaches utilisées pour l'expérience. De cette façon l'état de leptinémie de chaque individu pourra être estimé.

Séquence du gène de la β -actine bovine (Bos taurus beta actin mRNA) elle fait 274 paires de bases. Après amplification avec les primers, elle ne fait plus que 243 paires de bases :

```
1 TCGTGGGCCG CCCTAGGCAC CAGGGCGTAA TGGTGGGCAT GGGCCAGAAG GACTCGTACG
61 GACTCGTACG TGGGGGATGA GGCTCAGAGC AAGAGAGGCA TCCTGACCCT CAAGTACCCC
121 CAAGTACCCC ATTGAGCACG GCATCGTCAC CAACTGGGAC GACATGGAGA AGATCTGGCA
181 AGATCTGGCA CCACACCTTC TACAACGAGC TCCGTGTGGC CCCTGAGGAG CACCCCGTGC
241 TGCTGACCGA GGCCCCCTG AACCCCTAAGG CCAA
```

Séquence du gène de la leptine ovine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) homologue à la bovine, elle fait 350 paires de bases. Après amplification avec les primers, elle ne fait plus que 183 paires de bases :

```
1 GACACCAAAA CCCTCATCAA GACGATTGTC ACCAGGATCA ATGACATCTC ACACACGCAG
61 TCCGTCTCCT CCAAACAGAG GGTCACTGGC TTGGACTTCA TCCCTGGGCT CCACCCTCTC
121 CTGAGTTTGT CCAAGATGGA CCAGACATTG GCAATCTACC AACAGATCCA CGCCAGTCTG
181 CTTCCAGAA ATGTGATCCA AATATCTAAT GACCTGGAGA ACCTCCGGGA CTTTCTCCAC
241 CTGCTGGCGG GCTCCAAGAG CTGCCCTTG CCGCAGGTCA GGGCCCTGGA GAGCTTGGAG
301 AGCCTGGGCG TCGTCCTGGA AGCCTCCCTC TACTCCACAG AGGTTTTAGC
```

Séquence du gène du récepteur de la leptine bovine elle fait 610 paires de bases. Après amplification avec les primers, elle ne fait plus que 396 paires de bases :

```
1 CCAGAAACTG TTCAGCATCT TTTTATCAAG CACACAGAAT CAGCGACCTT TGGCCCTCTT
61 CTTTTGGAGC CTGAAACCAT TTCAGAAGAT ATCAGTGTCTG ATACATCATG GAAAAATAAA
121 GATGAGATGG TGCCAACAAC TACAGATGCC CTGCTTTTGA CTCCAGATCT TGGAAAGGGT
181 TCTATTTGTA TTAGTGACCA GTGCAGCAGT GCTGAGTTCT CTGAGGCTGA GAGCACAGAC
241 ATAACCTGTG AGGATGGAAG CAGGAGACAG CCCTCTGTTA AATATGCCAC CCTCGTCGGC
301 AGCTCTAAAT CAGGTGAAGC CGAGGAGGAG CAAGGGCTTA TAAACAGCTC AGCCAGCAAG
361 TGCTTCTTGA GCAACCATT CACACCAAAG GAGTCTTCTT CTAAGAGATC ATGGGAAATA
421 GAAACCCAGG CTTTTTTTAT ATTGTCAGAT CAGCATCCCA ATATAATTTT ACCACACCTT
481 CCATTCTCAG AAGGCCTGGA TGAACCTTTG AACTTTGAGG GAAATTTCCC TAAGGAAAAAT
541 AATAATGAAA GGCCTGTCTA TTATTTAGGA GTCACTTCAA TCAAAAAGAG AGAGAGTGGT
601 GTGCTTTTGA
```

B. Matériel

- Thermocycler avec bonnet chauffant (PTC-0150 MiniCycler Version 4.0 de chez BIOzym)
- Mini centrifugeuse pour microtubes (Micro Centrifuge Fisherbrand, Model 220 VAC, vit. = 6.000RPM)
- Tips stériles avec filtres
- Eppendorff pour PCR (500 μ l) à couvercle bombé

C. Réactifs et solutions

I. Pour la RT

- Mélanges RT1 et RT2 préparés à l'avance et congelés (voir préparation en annexe). Ces mélanges contiennent les dNTP et les random primers nécessaires pour former de l'ADNc à partir d'ARN, ainsi que les tampons de reverse transcription et le DTT.
- kit *Super-Script RnaseH-* (de Invitrogen life technologies cat 18003-017) selon le protocole du fabricant (10000 U, 200 U/ μ l)

II. Pour la PCR

- Mélange PCR leptine préparé à l'avance, aliquotés pour 3 tubes (55 µl) et congelés (voir préparation en annexe). Ce mélange contient les amorces nécessaires à l'amplification du gène de la leptine.

Amorce 1 :

5'-GACATCTCACACACGCAG-3'

Amorce 2:

5'-GAGGTTCTCCAGGTCATT-3'

- Mélange PCR β -actine préparé à l'avance, aliquotés pour 3 tubes (55 µl) et congelé (voir préparation en annexe). Ce mélange contient les amorces nécessaires à l'amplification de la β -actine.

Amorce 1 :

5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3'

Amorce 2 :

5'-CCCCCTGAACCCTAAGGCCAA-3'

- Mélange PCR récepteur à la leptine préparé à l'avance, aliquotés pour 3 tubes (55 µl) et congelé (voir préparation en annexe). Ce mélange contient les amorces nécessaires à l'amplification de la β -actine.

Amorce 1 :

5'-GTGCCAACAACTACAGATG-3'

Amorce 2 :

5'-AACTTTGAACTCCCTTTAA-3'

- Taq DNA polymérase (5 U/µl) (réf. T0303z de amersham pharmacia biotech)

D. Protocole

I. Réaction de reverse transcription (RT)

Au préalable, il est indiqué de passer quelques secondes les tubes contenant les mélanges RT1 et RT2 dans la mini centrifugeuse afin de collecter tout le liquide au fond du tube.

Ajouter dans un éppendorf de 500µl 12 µl de mélange RT1 et 2 µg d'ARNtot. Chauffer le mélange dans le thermocycler à 65°C pendant 5 minutes et refroidir ensuite rapidement sur de la glace.

Ajouter ensuite 6 µl de mélange RT2 et mélanger doucement. Incuber 10 minutes à 25°C puis 5 minutes à 42°C.

Ajouter 1 µl (200 U) de Superscript II RT et mélanger en pipetant doucement. Incuber 50 minutes à 42°C et inactiver la réaction en chauffant 15 minutes à 70°C.

Placer la solution finale (\pm 20 µl) dans la glace ou conditionner pour la congélation.

II. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Préparation des tubes :

- Mettre d'abord tout ce qui n'est pas échantillon d'ARN pour commencer afin de ne pas contaminer !

- Ajouter 1,4 µl de Taq polymérase par tube de 55µl de mélange PCR de leptine et de β-actine.
- Numéroter les tubes.
- Mettre 16 µl de mélange PCR dans 3 tubes et 16 µl de mélange PCR dans 3 autres tubes
- Ajouter 4 µl de produit de la même RT dans un tube contenant du mélange leptine et dans un tube contenant du mélange β-actine.
- Mélanger doucement le produit RT et le mélange PCR avec une pipette et fermer le couvercle.
- Conserver à 4°C jusqu'à la mise en machine.

Amplification :

Pour la leptine, la PCR est constituée de 35 cycles selon la séquence suivante :

- 2 minutes à 94°C
- 35x (30 sec. à 94°C / 30 sec. à 54°C / 30 sec. à 72°C)
- 5 minutes à 72°C

Pour la β-actine, la PCR est constituée de 40 cycles selon la séquence suivante :

- 1 minute à 94°C
- 40x (30 sec. à 94°C / 45 sec. à 60°C / 45 sec. à 72°C)
- 5 minutes à 72°C

Pour le récepteur à la leptine, la PCR est constituée de 34 cycles selon la séquence suivante

- 34x (40 sec. à 94°C / 40 sec. à 55°C / 45 sec. à 72°C)
- 5 minutes à 72°C

Conserver à 4°C jusqu'à l'électrophorèse

3.4 Electrophorèse sur gel d'agarose

A. Principe

On obtient des fragments d'ADN de leptine bovine de 183 pb, des fragments d'ADN de β-actine de 243 pb et des fragments d'ADN de récepteurs à la leptine bovine de 396 pb que l'on fait migrer sur un gel d'agarose à 1.4%. Un étalon de fragments d'ADN de taille connue est mis à co-migrer afin d'estimer la taille des brins d'ADN.

L'ADN est décelé dans le gel en présence de bromure d'éthidium. Celui-ci s'intercale entre les 2 brins de l'ADN et peut être visualisé en utilisant un transilluminateur UV réglé sur 302 nm. Une fois visualisées, les bandes d'ADN de leptine et de β-actine seront comparées grâce au logiciel 'NIH Image 1.62' pour pouvoir ainsi estimer la quantité de leptine présente dans le tissu adipeux des vaches utilisées.

B. Protocole

I. Matériel, réactifs et solutions

Matériel :

- Transilluminateur (UV transilluminator (UVP), Model M-15, 230 V~ 50 Hz ; 0.75 Amps ; Upland, CA 91786 USA)
- une cuve à électrophorèse (BIOplastics BV)
- une balance pour peser l'agarose (Sartorius GMBH Göttingen, type R300S, 220 V~50/60 Hz)

- Appareil photos numérique avec zoom (NIKON Coolpix 990 ; 3,34 Mega Pixels ; programmé en qualité FINE)

Réactifs et solutions :

- Tampon TAE 1 x (Tris-acétate 40mM, EDTA 1 mM pH 8.0)
- Agarose 1,4 % (en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer)
- Bromure d'éthidium (solution stock à 10 mg/ml)
- Etalon 100 (100 Base-Pair Ladder, 27-4001 Amersham) 2 μ l + T10E1 18 μ l
- Tampon de chargement colorant (Voir annexe)

II. Préparation du gel d'agarose

- Dans un erlenmeyer, mélanger 1,4 gr d'agarose dans 100 ml de tampon TAE et chauffer au micro-onde jusqu'à ébullition.
- Laisser refroidir sous agitation jusqu'à une température comprise entre 60 et 55°C. Ajouter alors 10 μ l de bromure d'éthidium (solution mère à 10 mg/ml) soit une concentration finale de 0,1 mg de bromure d'éthidium par ml de gel.
- Couler le gel dans la cuve à électrophorèse et laisser solidifier (environ 25 minutes).
- Une fois que le gel est solide, le recouvrir de TAE 1x

III. Traitement et chargement des échantillons

- Ajouter au tube contenant 2 μ l d'étalon de masse moléculaire connue, 18 μ l de T10E1 et 2 μ l de tampon de chargement colorant.
- Ajouter au tube contenant 20 μ l d'échantillon, 2 μ l de tampon de chargement colorant.
- Après refroidissement du gel à température ambiante, les échantillons peuvent être chargés.
- Déposer les différents échantillons dans les puits du gel d'agarose (17 μ l dans chaque puits).
- Ajouter dans un autre puits, les standards de masse moléculaire.
- Laisser migrer les échantillons dans le gel recouvert de tampon TAE 1x durant 45 minutes sous une différence de potentiel de 150 mA.

IV. Analyse de l'intensité des bandes

Visualiser les bandes au transilluminateur UV réglé à 302 nm et effectuer un enregistrement numérique de l'image. L'analyse des bandes est réalisée avec le logiciel 'NIH Image 1.62' (téléchargé du net à l'adresse '<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/manual/faq.html#mem>') après que l'image en couleurs ait été transformée en mode 'niveau de gris' grâce au logiciel 'Adobe Photoshop 5.5' et enregistrée en format TIFF.

4. Mise en évidence des récepteurs à la leptine par immunohistochimie

4.1 But

Le but de notre expérience est de mettre en évidence les récepteurs à la leptine sur les follicules et les corps jaunes ayant subi différents traitements décrits plus haut afin d'éventuellement définir les sites d'action de la leptine.

4.2 Principe

L'immunohistochimie est une méthode de détection d'une protéine sur une coupe tissulaire ou sur un étalement cytologique. Elle permet la visualisation des antigènes par application séquentielle d'un anticorps spécifique à l'antigène, un anticorps secondaire à l'anticorps primaire, un complexe enzymatique et un substrat chromogénique. L'activation enzymatique du chromogène résulte en un produit de réaction visible au site de l'antigène. L'immunohistochimie est en fait une réaction immunologique in situ et son interprétation est associée à une analyse morphologique. Elle est la seule méthode, parmi les autres méthodes immunologiques, permettant de préciser le type de la cellule contenant le signal et la topographie du signal dans la cellule.

4.3 Protocole

Deux types de techniques furent utilisées : la première technique demandait des coupes en paraffine et se réalisait grâce au système d'amplification Envision et du chromogène DAB⁺ de la firme Dako, la seconde technique quant à elle demandait des coupes en cryostat et se réalisait grâce au système d'amplification LSAB et au chromogène AEC de la firme Dako.

Première technique

A. Prélèvement tissulaire et préparation histologique

Après la périfusion, les follicules sont fixés dans du formol 4% le plus rapidement possible pour éviter l'autolyse tissulaire. On mettra également quelques follicules non périfusés dans le formol, pour pouvoir faire des comparaisons ultérieurement entre les follicules stimulés et ceux qui ne l'ont pas été.

Après déshydratation, les follicules sont inclus dans de la paraffine (cette technique garantit une meilleure préservation de la morphologie tissulaire) et sectionnés en coupes d'une épaisseur de 6 µm à l'aide d'un microtome.

B. Déparaffinage-Réhydratation

Les lames sont déparaffinées, réhydratées puis rincées au PBS et soumises à la préparation immunologique.

Le déparaffinage se déroule comme suit :

- 2x5 minutes dans le xylène

- 2x5 minutes dans l'alcool 100%
- 2x5 minutes dans l'alcool 95%
- 1x5 minutes dans l'alcool 70%
- 2x5 minutes dans du PBS 1x

C. Elimination de l'activité peroxydase endogène

Pour éviter une activation non spécifique du chromogène, les coupes sont incubées 5 minutes dans un mélange à 0,5% de H₂O₂ – méthanol (=> 3 ml de H₂O₂ 35% dans 200ml de méthanol) puis rincées 2x5 minutes dans du PBS 1x.

D. Anticorps primaire

L'anticorps primaire est un anticorps monoclonal produit sur souris (réf. Ob-R (B-3) sc-8391 de chez Santa Cruz Biotechnology), dirigé contre un peptide de la portion carboxylique terminale du récepteur de la leptine de souris. Il est dilué dans du PBS salin pour obtenir un antiserum à 1/100. On recouvre le tissu de l'antisérum et on incube les lames 24 heures en chambre humide à 4°C. Ensuite les lames sont rincées 3x5 minutes au PBS 1x.

E. Anticorps secondaire

L'anticorps secondaire (Solution Envision = système d'amplification Dako) est produit sur chèvre, dirigé contre les Ig de souris et de lapin et couplé à une peroxydase.

Les lames sont couvertes de la solution et incubées pendant 30 minutes dans une chambre humide. Ensuite elles sont rincées 3x5 minutes au PBS.

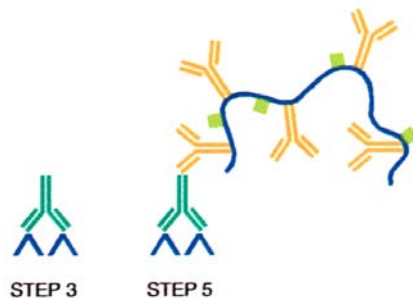


Figure 16 : Système d'amplification Envision (<http://www.Dakousa.com/ihcbook/hbcontent.htm>)

F. Révélation

Le principe de la révélation est l'oxydation d'un chromogène, le DAB⁺, qui produit un composé brun. Le DAB⁺ est préparé par ajout de 1 ml de tampon à une goutte de chromogène. La solution est déposée sur les coupes incubées pendant 5 à 30 minutes en fonction de l'intensité de la coloration. Les coupes sont ensuite rincées 3x5 minutes au PBS.

G. Montage

Les coupes sont ensuite montées en milieu aqueux sous lamelle scellée à la colle.

H. Contrôle

Un contrôle doit être effectué pour vérifier la spécificité des anticorps utilisés.

Un contrôle négatif consiste à traiter certains follicules remplaçant l'anticorps primaire par du PBS. Ce contrôle ne doit présenter aucun marquage.

On utilise également une autre coupe d'utérus de rate dont on sait que les récepteurs seront bien marqués. Elle sera donc considérée comme témoin ou contrôle positif.

I. Coloration H.E.S.

Une coloration H.E.S. (Hémalun-Erythrosine-Safran) est réalisée sur une coupe de chaque follicule et de chaque corps jaune afin d'observer les différentes structures.

Seconde technique

A. Prélèvement tissulaire et préparation histologique

Après périfusion, les follicules sont récoltés et placés dans des cupules remplies de Tissue-Tek® de la firme Sakura qui sont ensuite congelées grâce à de l'alcool glacial maintenu à -80°C par de la carboglace. La fixation est donc réalisée à l'aide du froid. Les coupes sont elles aussi réalisées à froid à l'aide d'un cryostat et conservées à une température de -80°C .

B. Traitement des coupes avant le marquage

Une fois sorties du congélateur, les coupes reposent durant 15 minutes à température ambiante. Elles subissent ensuite une fixation de 25 minutes à 4°C dans du paraformaldéhyde (à 4% dans du PBS 1x) suivie de 2 rinçages de 5 minutes dans du PBS 1x. Les coupes sont alors plongées dans 3 bains de glycine (à 0,1 M dans du PBS 1x) d'une durée de 2 minutes chacun et sont ensuite rincées 2 fois 5 minutes dans du PBS 1x. Afin d'éliminer l'activité peroxydase des cellules, les coupes sont traitées avec de l' H_2O_2 à 3% pendant 10 minutes et rincées une dernière fois avec du PBS 1X 2fois 5 minutes. Enfin, les coupes sont saturées en protéines grâce à un bain de 30 minutes dans du PBS/BSA/Triton (PBS 1x, BSA 0,1% et Triton 0,02%).

C. Fixation de l'anticorps primaire et secondaire

L'anticorps primaire utilisé est identique à celui mentionné dans la première technique c'est à dire un anticorps monoclonal produit sur souris (réf. Ob-R (B-3) sc-8391 de chez Santa Cruz Biotechnology), dirigé contre un peptide de la portion carboxylique terminale du récepteur de la leptine de souris. Il est dilué dans du PBS/BSA/Triton pour obtenir un anti-sérum à 1/100 qui posera 3 heures durant sur les coupes. Trois rinçages de 5 minutes sont ensuite effectués avec du PBS/BSA/Triton. Les coupes choisies pour être les témoins négatifs seront traitées de la même façon à l'exception près que l'anticorps primaire sera absent de la solution.

Pour le traitement avec l'anticorps secondaire, le kit LSAB⁺ de chez Dako (ready for use) est utilisé. Il s'agit de deux solutions : la première est composée d'Ig biotinylée dirigée contre

lapin, souris et chèvre, la seconde contient de la streptavidine conjuguée à de la peroxydase. La première solution est appliquée sur les coupes et pose pendant 30 minutes après quoi elles sont rincées deux fois pendant 5 minutes avec du PBS/BSA/Triton. La seconde solution est ensuite appliquée 30 minutes et rincée 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS/BSA/Triton.

D. Révélation

La coloration des coupes est obtenue par révélation à l'aide d'un chromogène qui est dans ce cas de l'AEC⁺. En s'oxydant, le chromogène donne une couleur rouge brique. Une à deux gouttes de cette solution prête à l'emploi sont déposées sur chaque coupe pendant quelques secondes et la réaction est stoppée en trempant les coupes dans l'eau distillée. Afin de mieux visualiser les structures et l'ensemble du tissu, les coupes passent 2 minutes dans un bain d'hémalum et 5 minutes dans de l'eau courante.

E. Montage

Les coupes sont alors montées à l'aide de glycérol.

Chapitre IV :
Résultats

1. Sécrétions stéroïdiennes des follicules et des corps jaunes périfusés in vitro

1.1 Première expérience

Lors de la première expérience de périfusion, seuls des follicules ont été disséqués et mis en culture. Aucun des ovaires ne portait de gros follicules. Ceux qui ont pu être isolés ont été mesurés et présentaient un diamètre allant de 4 à 8 mm, un seul atteignait 10 mm.

Pour rappel, les follicules étaient périfusés pendant une demi heure avec du M199 contenant soit 0ng de leptine, soit 5ng de leptine bovine, soit 1,5 ou 20ng de leptine de souris. La stimulation standardisée LH-FSH était appliquée ensuite.

Chaque traitement de leptine fut appliquée sur 5 follicules.

Nous avons analysé les sécrétions en fonction de la taille des follicules et en fonction du traitement leptine.

A. Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules

Les figures 17 à 21 reprennent le profil de sécrétion moyen des follicules en fonction de leur diamètre pour chaque traitement leptine. La figure 22 regroupe tous les traitements leptine.

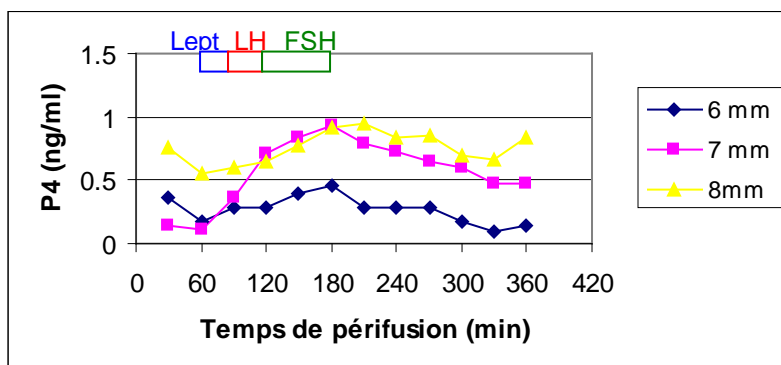


Figure 17: Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules pour le groupe témoin.

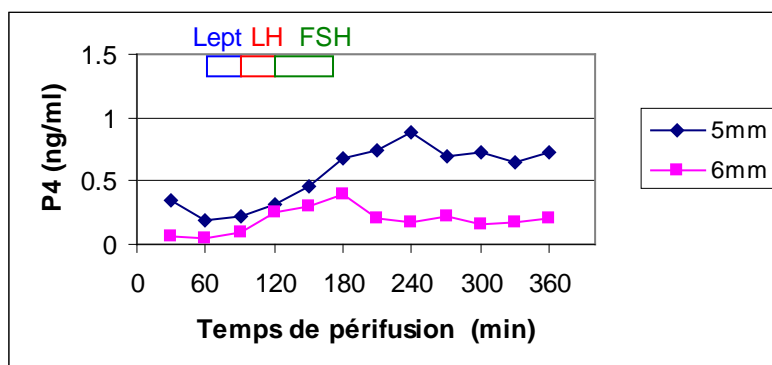


Figure 18: Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules pour le groupe ayant reçu de la leptine bovine 5 ng.

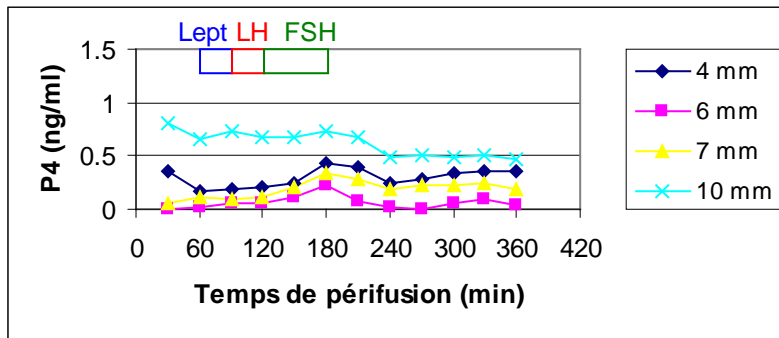


Figure 19: Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules pour le groupe ayant reçu de la leptine de souris 1 ng.

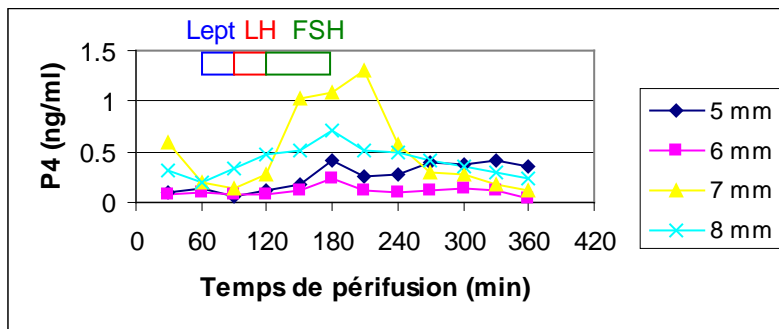


Figure 20: Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules pour le groupe ayant reçu de la leptine souris 5 ng.

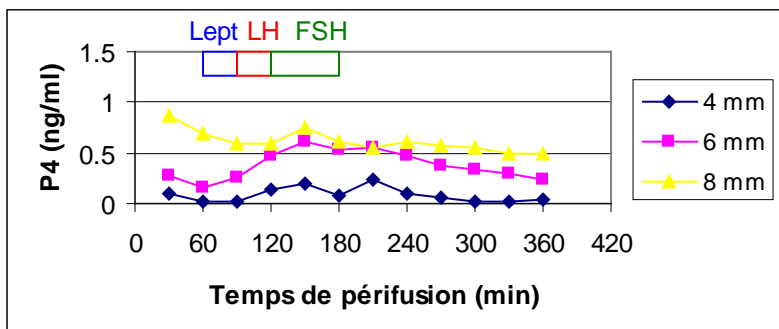


Figure 21: Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules pour le groupe ayant reçu de la leptine de souris 20 ng.

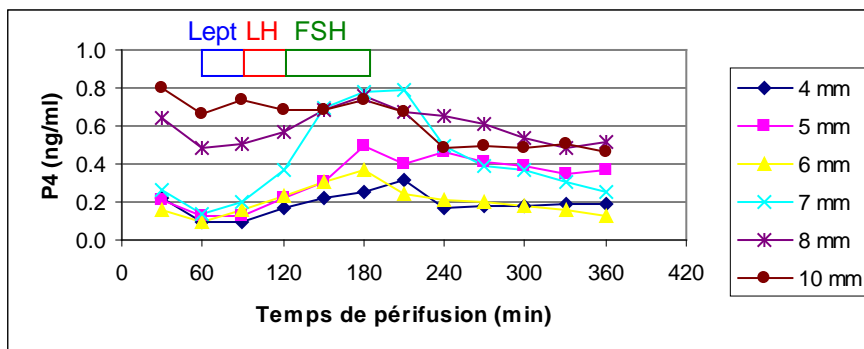


Figure 22 : Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules pour tous les groupes.

On peut remarquer sur la figure 22 que les plus gros follicules (diamètre ≥ 8 mm) présentent dès le départ une production de P₄ importante. La stimulation la maintient ou l'amplifie. Les follicules de 7 mm contiennent peu de P₄ au départ mais sont aptes à répondre de manière importante et à rejoindre les gros follicules. Les plus petits répondent moins à la stimulation. L'augmentation de P₄ commence après avoir mis la leptine, à 60 minutes, ensuite elle continue lorsque l'on ajoute la LH, à 90 minutes, puis cette augmentation atteint son maximum quand la stimulation par la FSH est terminée. Ensuite la sécrétion de P₄ diminue lorsque l'on périefuse avec le milieu 199, jusque la fin de la périefusion.

B. Sécrétion d'E₂ en fonction de la taille des follicules

Les figures 23 à 27 reprennent le profil de sécrétion moyen des follicules en fonction de leur diamètre pour chaque traitement leptine. La figure 28 regroupe tous les traitements leptine.

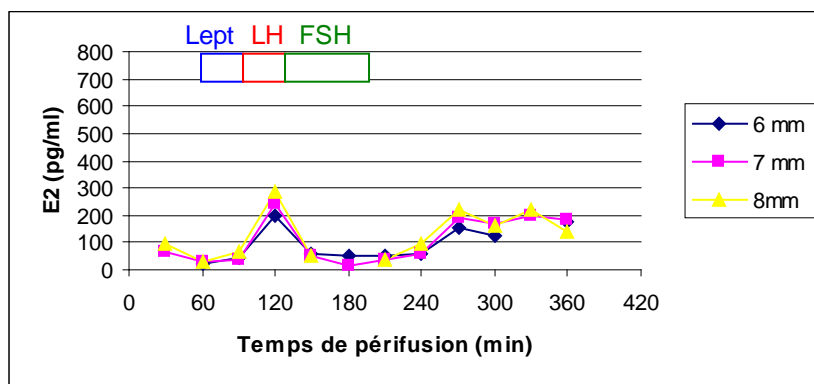


Figure 23: Sécrétion de E₂ en fonction de la taille des follicules pour le groupe témoin.

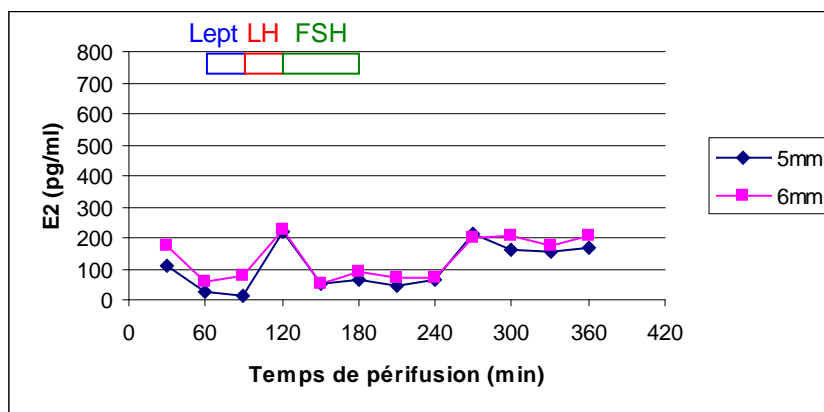


Figure 24 : Sécrétion de E₂ en fonction de la taille des follicules pour le groupe ayant reçu de la leptine bovine 5 ng.

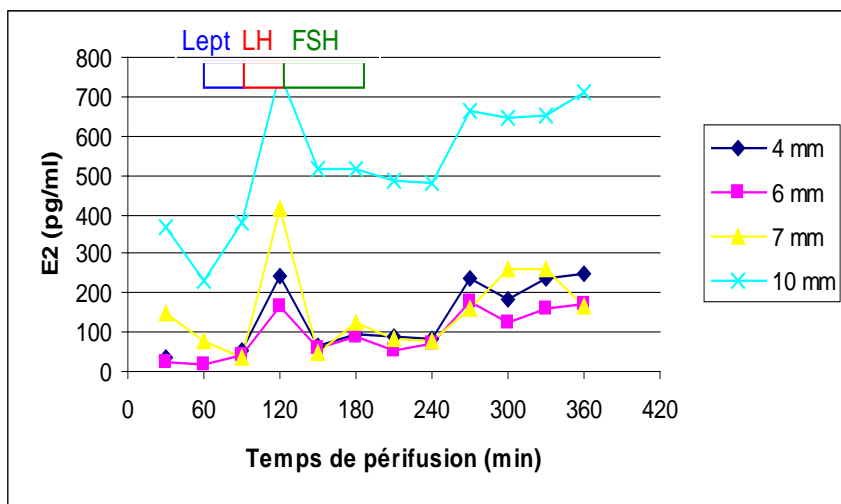


Figure 25: Sécrétion de E₂ en fonction de la taille des follicules pour le groupe ayant reçu de la leptine de souris 1 ng.

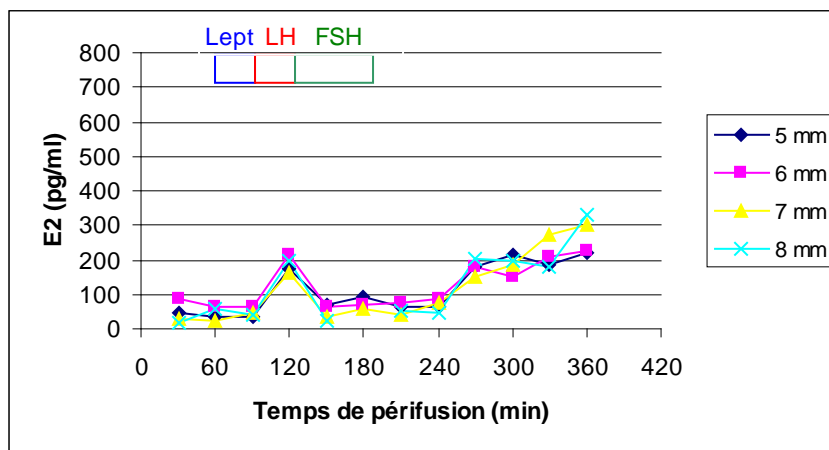


Figure 26 : Sécrétion de E₂ en fonction de la taille des follicules pour le groupe ayant reçu de la leptine de souris 5 ng.

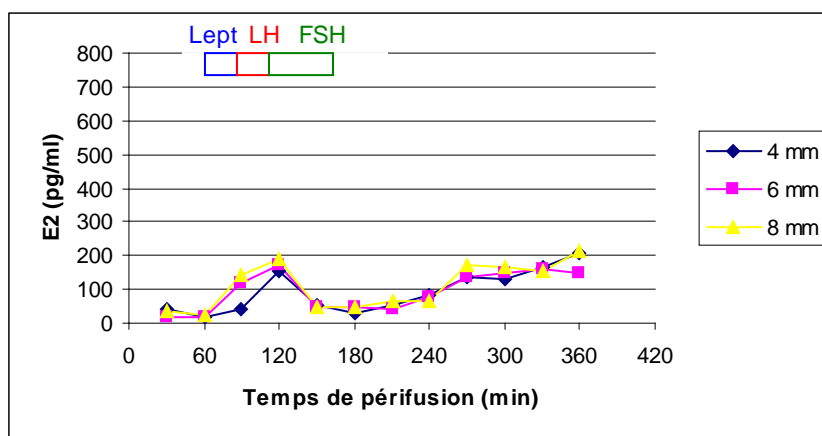


Figure 27 : Sécrétion de E₂ en fonction de la taille des follicules pour le groupe ayant reçu de la leptine de souris 20 ng.

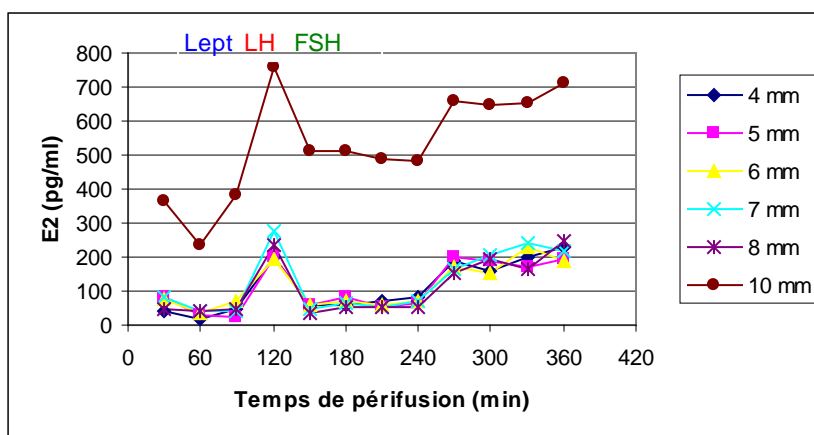


Figure 28 : Sécrétion de E₂ en fonction de la taille des follicules pour tous les groupes.

On peut observer une légère augmentation de la sécrétion d'œstradiol pour toutes les tailles de follicules lorsque l'on injecte la leptine à 60 minutes. Le plus gros follicule libère dès le départ de plus grandes quantités d'E₂ et paraît réagir plus fortement. La sécrétion atteint son maximum lorsque l'on injecte la LH à 90 minutes, puis il y a une chute de la sécrétion pendant la stimulation FSH (temps 120 à 180 minutes) suivie d'une progressive réaugmentation.

C. Sécrétion de P₄ en fonction du type de traitement à la leptine

Pour analyser l'influence du traitement à la leptine, nous avons rapporté les sécrétions à un même poids de follicules (100 mg) et tiré les profils de sécrétion moyen des 5 follicules de chaque groupe (figure 29)

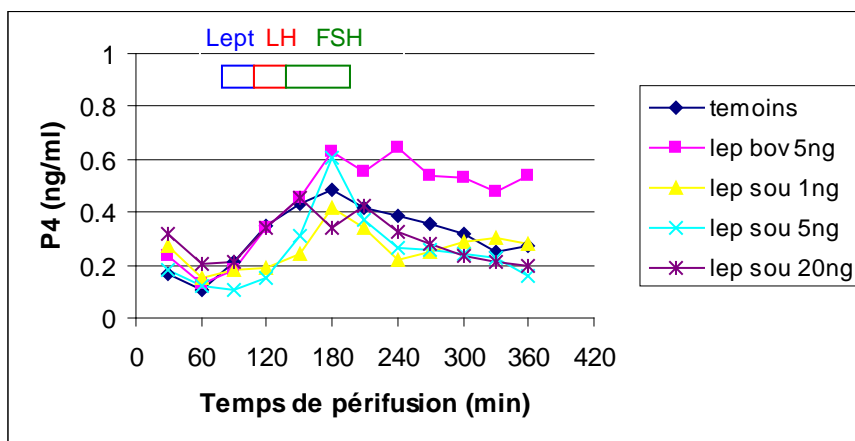


Figure 29 : Sécrétion de P₄ en fonction du temps pour tous les groupes.

On remarque au début une diminution de la sécrétion de P₄ dans le milieu de périfusion, attribuée à une libération passive du stéroïde à travers la paroi folliculaire.

Après l'ajout de LH (temps 90 à 110 minutes), la sécrétion de P₄ est augmentée dans tous les groupes, mais seuls les follicules stimulés avec la leptine bovine maintiennent une sécrétion importante jusqu'à la fin de l'essai.

Les traitements à la leptine bovine 5 ng et celui à la leptine souris 5 ng, semblent stimuler positivement la sécrétion de P₄. Le traitement à la leptine souris 20 ng, ne semble pas apporter

de stimulation. Par contre le traitement à la leptine 1 ng, paraît avoir une stimulation négative car ce groupe secrète moins que les follicules témoins.

D. Sécrétion de E₂ en fonction du type de traitement à la leptine

La même analyse réalisée sur la sécrétion d'E₂ (figure 30) ne peut mettre en évidence aucun effet de la leptine sur les niveaux de production. La diminution paradoxale des teneurs pendant la stimulation de FSH ne trouve aucune explication en relation avec un effet « leptine ».

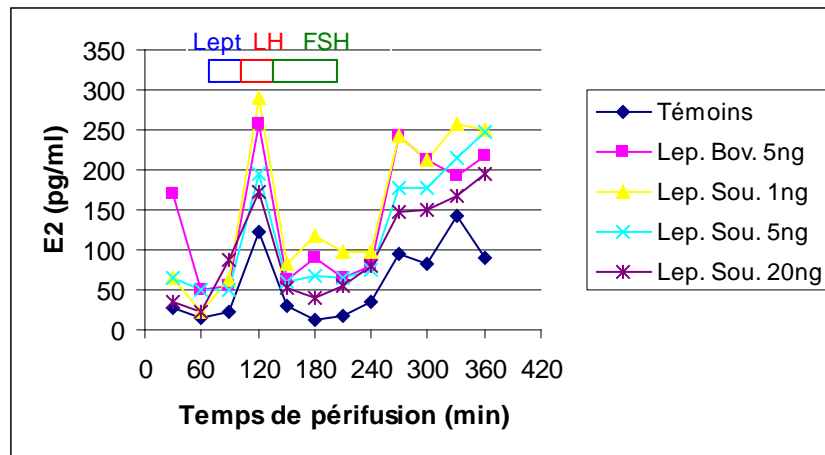


Figure 30: Sécrétion de E₂ en fonction du temps pour tous les groupes.

E. Analyse statistique

L'importance des écarts-types due à la variabilité de la réponse folliculaire ne permet pas de mettre en évidence une différence entre les traitements, que ce soit pour la P₄ (figure 31) ou l'E₂ (figure 32).

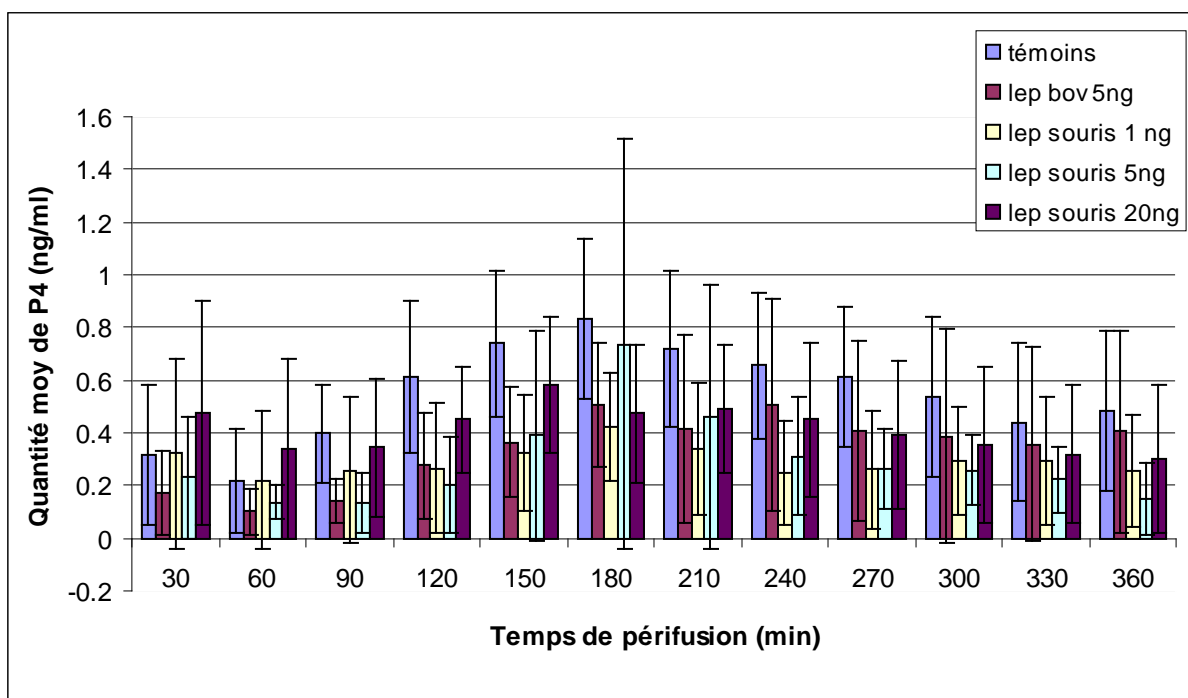


Figure 31 : Moyenne de la sécrétion de P₄ pour les différents traitements.

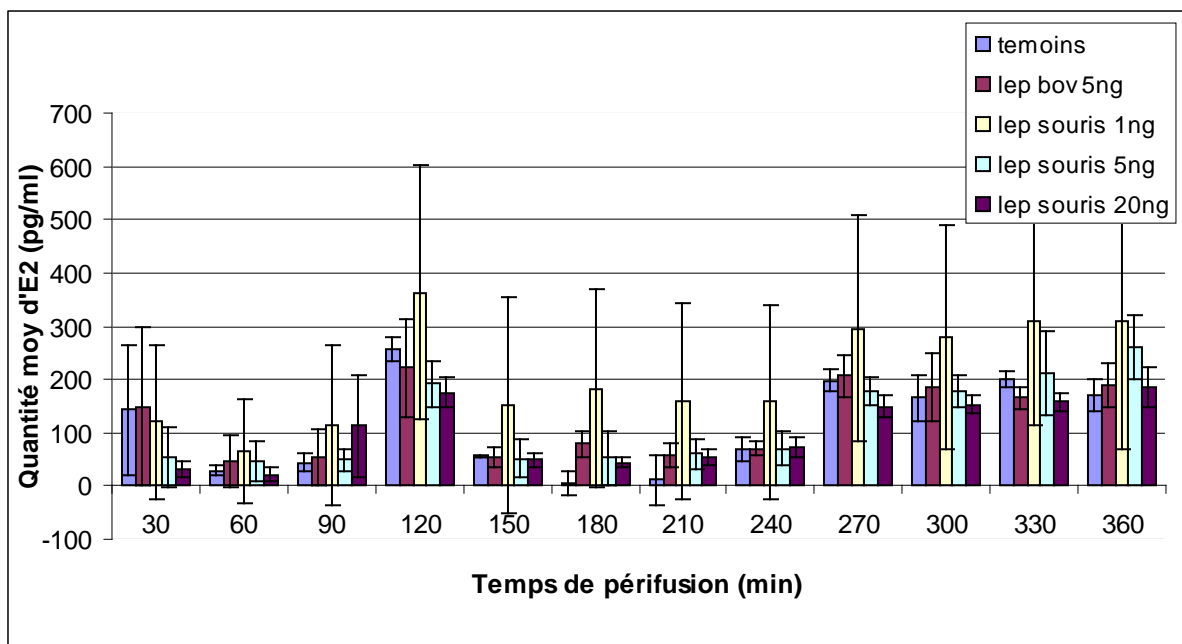


Figure 32 : Moyenne de la sécrétion de E₂ pour les différents traitements.

1.2 Deuxième expérience

Lors de la seconde expérience, des follicules de taille allant de 5 à 15 mm de diamètre et des corps jaunes ont été soumis à la stimulation LH-FSH classique après traitement pendant 30 minutes avec des concentrations de 0 ; 1 ; 5 et 20 ng/ml de leptine.

Dans aucune chambre de culture nous n'avons pu observer une quelconque réponse de follicules que ce soit à la leptine, la LH ou la FSH (figure 33 et 34). Il en est de même pour les corps jaunes (figure 35 et 36). Seule une diminution passive et décroissante de stéroïdes est observée.

Les causes de l'échec de cette expérience n'ont pas pu être élucidées.

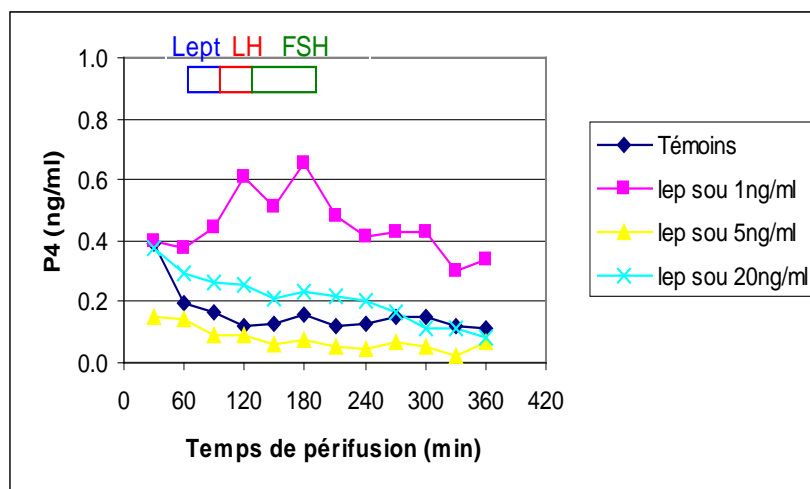


Figure 33 : Sécrétion de P₄ pour 100 mg de follicules

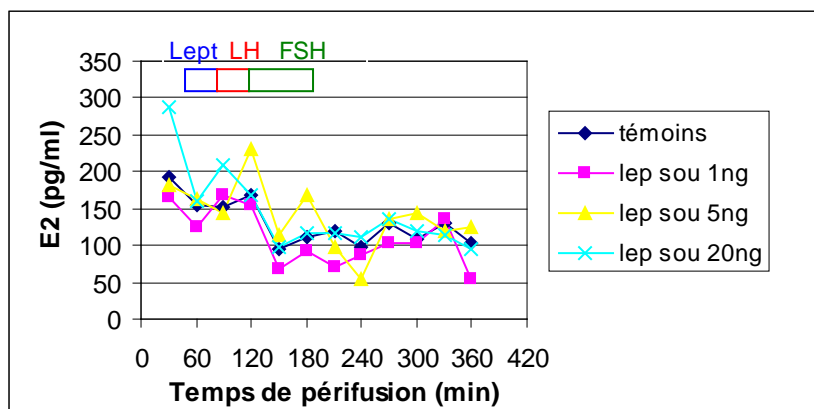


Figure 34 : Sécrétion d'E₂ pour 100 mg de follicules.

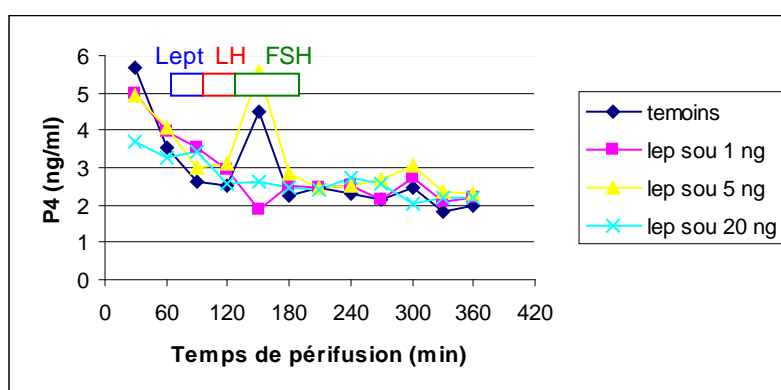


Figure 35 : Sécrétion de P₄ pour 100 mg de corps jaunes.

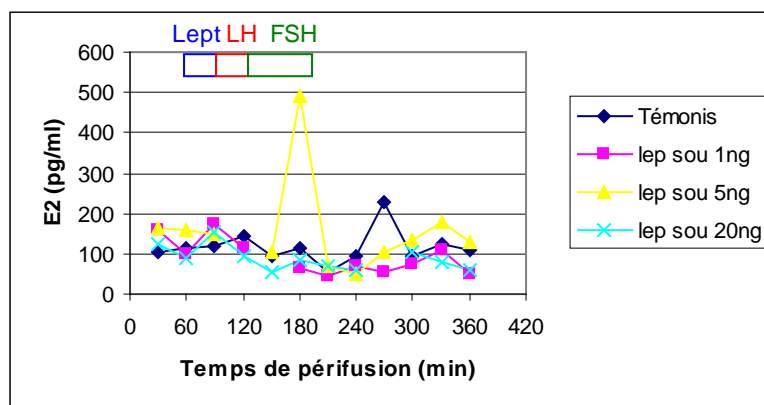


Figure 36 : Sécrétion de E₂ pour 100 mg de corps jaunes.

1.3 Troisième expérience

Lors de la troisième, expérience quelques modifications furent apportées afin d'améliorer les conditions et de pouvoir obtenir des résultats plus probants .

Tout d'abord, le prélèvement et la mise en culture se sont déroulés durant la saison de reproduction de la vache et les follicules récoltés étaient plus gros (7 à 23 mm). Ensuite, les

hormones hypophysaires FSH et LH n'étaient plus de nature bovine mais de nature porcine, elles ne se présentaient pas non plus sous forme liquide ultra-purifiées pour des dosages R.I.A. mais sous forme lyophilisées. Ces hormones sont commercialisées pour être utilisées dans l'hyperstimulation ovarienne en vue de transfert d'embryons chez la vache. Enfin, le planning de la périfusion fut modifié afin de pouvoir mieux distinguer l'éventuel effet de la leptine. Il se présentait donc comme suit :

00h00 : Mise en culture des follicules dans du TCM 199 à 37°C
 00h00-01h00 : TCM 199
 01h00-01h30 : TCM 199 + Leptine
 01h30-02h30 : TCM 199
 02h30-02h50 : TCM 199 + LH
 02h50-03h00 : TCM 199
 03h00-04h00 : TCM 199 + FSH
 04h00-06h00 : TCM 199

En dépit de toutes ces modifications en vue d'améliorer la manipulation et du respect constant de la méthode, les résultats obtenus restent peu convaincants.

A. Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules

Les figures 37 à 39 reprennent le profil de sécrétion moyen des follicules en fonction de leur diamètre pour chaque traitement leptine. La figure 40 regroupe tous les traitements leptine.

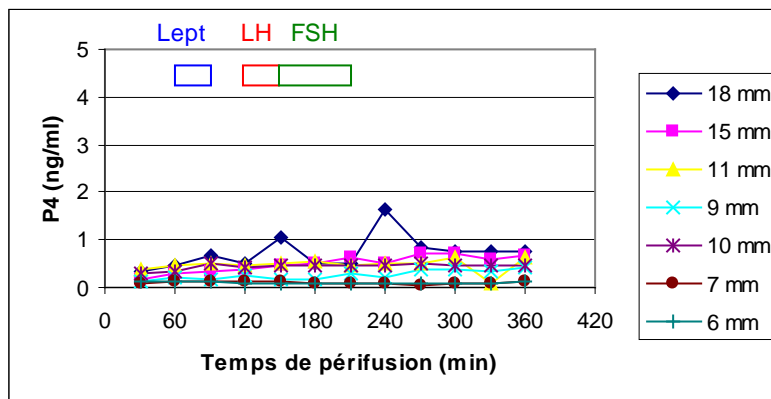


Figure 37 : Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules pour le groupe témoin non traité à la leptine

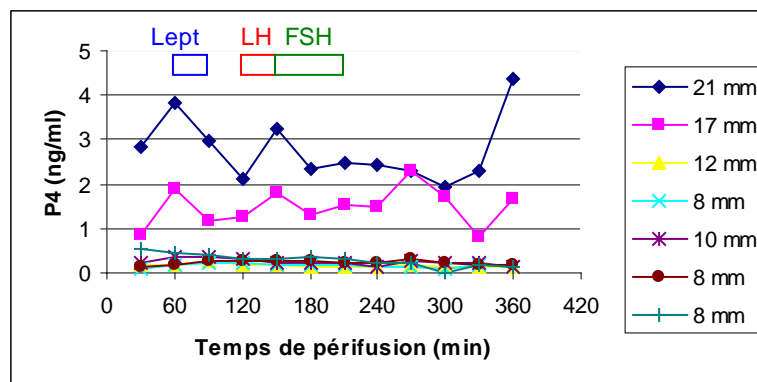


Figure 38 : Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules pour le groupe traité avec de la leptine à 5 ng/ml

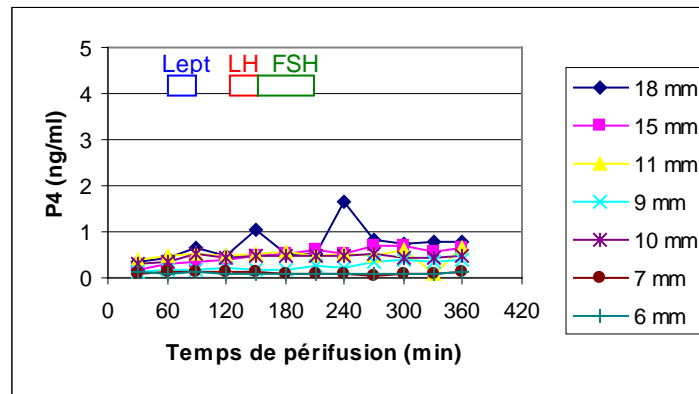


Figure 39 : Sécrétion de P₄ en fonction de la taille des follicules pour le groupe traité avec de la leptine à 20 ng/ml

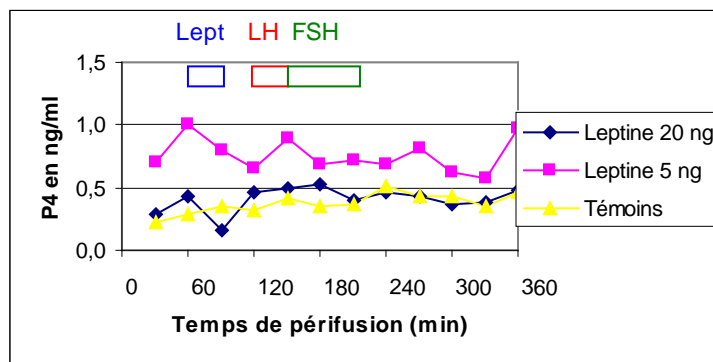


Figure 40 : Sécrétion de P₄ en fonction du temps pour tous les groupes

B. Sécrétion d'E₂ en fonction de la taille des follicules

Les figures 41 à 43 reprennent le profil de sécrétion moyen des follicules en fonction de leur diamètre pour chaque traitement leptine. La figure 44 regroupe tous les traitements leptine.

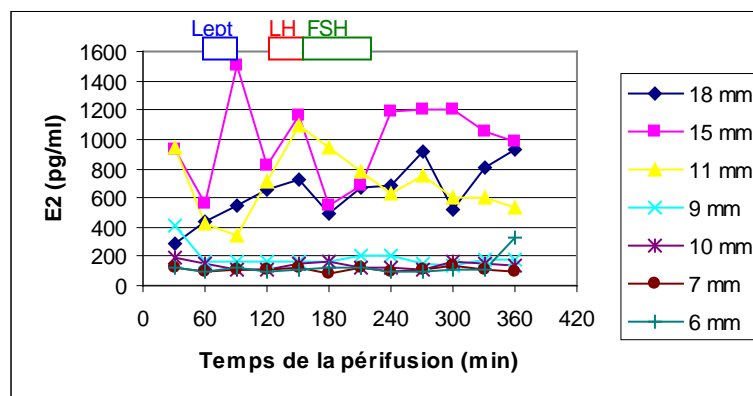


Figure 41 : Sécrétion d'E₂ en fonction de la taille des follicules pour le groupe témoin non traité avec de la leptine.

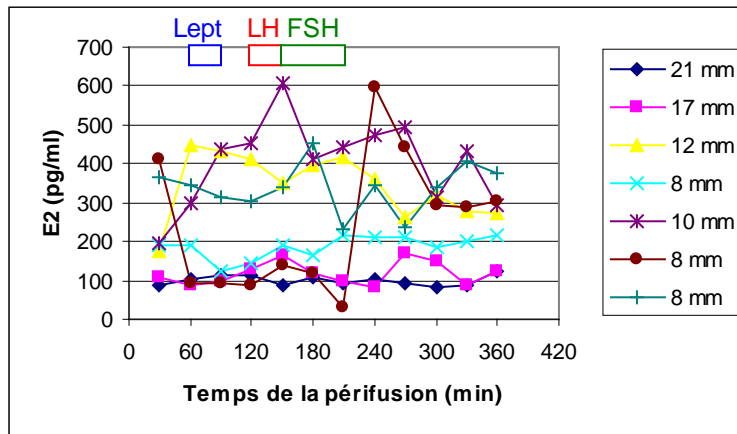


Figure 42 : Sécrétion d'E₂ en fonction de la taille des follicules pour le groupe traité avec de la leptine à 5 ng/ml.

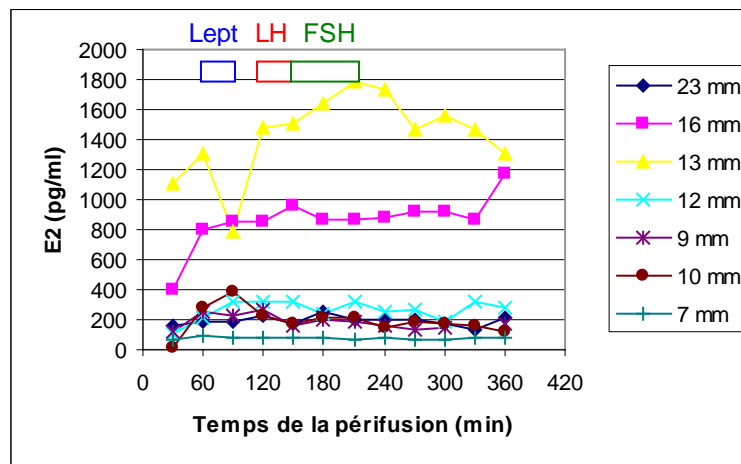


Figure 43 : Sécrétion d'E₂ en fonction de la taille des follicules pour le groupe traité avec de la leptine à 20 ng/ml.

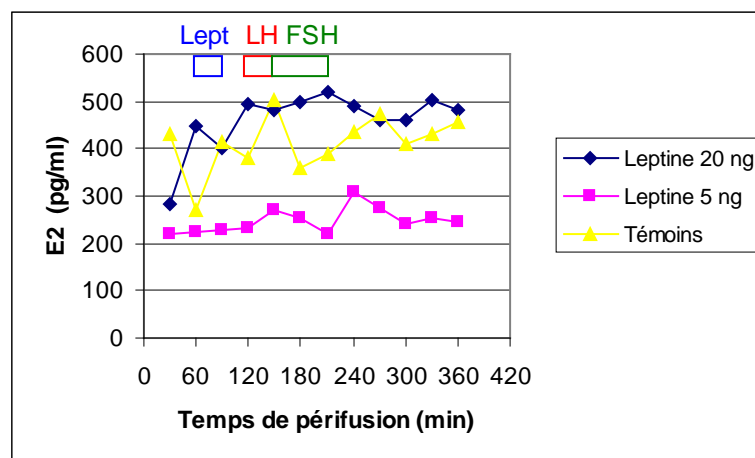


Figure 44 : Sécrétion d'E₂ en fonction du temps pour tous les groupes.

2. Expression de la leptine dans le tissu adipeux sous-cutané de la vache et relation avec la stéroïdogénèse

2.1 Quantité d'ARN totale dans le tissu

La première étape de la RT-PCR consiste l'extraction de l'ARN tissulaire. La quantité de celui-ci est ensuite estimée par colorimétrie car la RT-PCR est réalisée sur des quantités constantes d'ARN.

La mesure de cette quantité d'ARN extrait est reprise dans le tableau 1.

N° vache	Concentration en ARN($\mu\text{g}/\text{mg}$)	volumes aliquotés (μl)
3684	2,5	1,4
2203	2,7	1,4
3852	3,4	1,2
2191	1,9	1,3
9610	2,0	1,3
8777	1,3	2
6460	1,2	2
5615	2,6	1,4
2183	1,1	2
6512	1,0	2,5
9279	1,4	2
4164	1,1	2,2
2578	1,5	2
0795	1,5	1,4
8642	1,7	2
8800	1,5	2

Tableau 1 : Quantité d'ARN extrait par mg de tissu adipeux et volumes utilisés pour la PCR.

2.2 Expression de la leptine

L'analyse du gel par le programme NIH permet de déterminer l'intensité des bandes d'ADN. La leptine et son récepteur peuvent donc être comparés au standard que représente la β -actine.

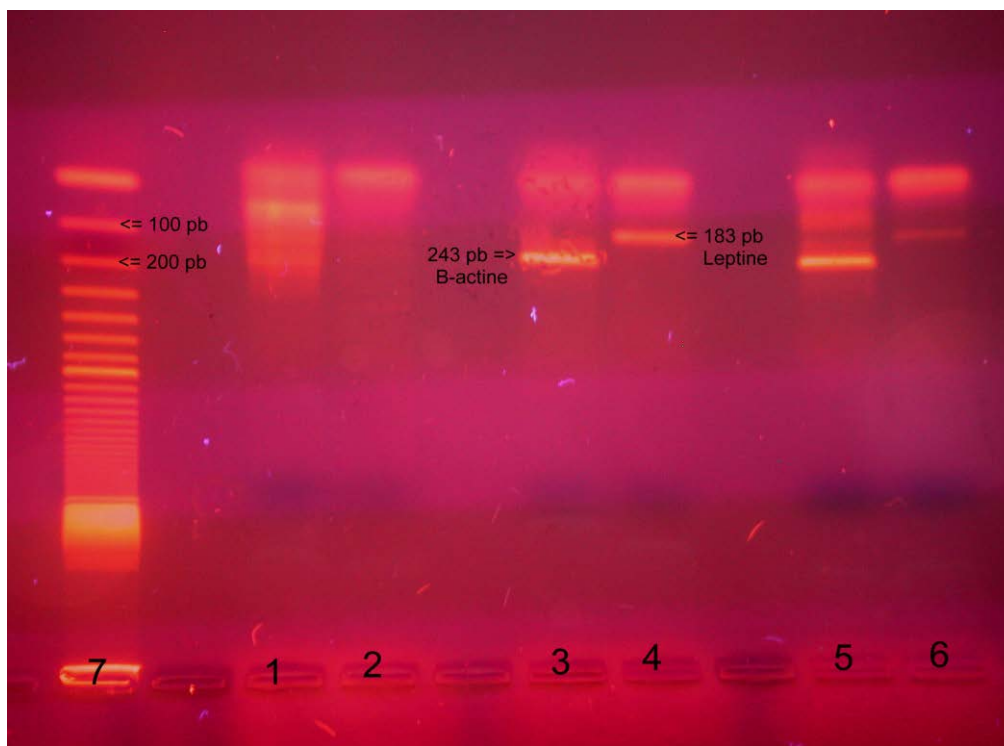


Figure 45 : Image obtenue après RT-PCR semi-quantitative sur un échantillon de tissu adipeux de vache.

La photo représentée en figure 45 est obtenue après RT-PCR semi-quantitative avec de l'ARN extrait à partir de tissus adipeux prélevés sur les vaches au moment de l'abattage. La β -actine se trouve dans les colonnes 1, 3 et 5, la leptine par contre se trouve dans les colonnes 2, 4 et 6. La colonne 7 contient un étalon permettant d'identifier les différentes bandes.

L'expression de la leptine par rapport à la β -actine est exprimée dans le tableau 2 pour les différentes vaches des deux premières expériences.

Vache N°	B-actine	Leptine	Leptine/B-actine
série 1	série 1	série 1	série 1
2203	2300	2104	0,915
3852	3359	2969	0,884
4164	1863	379	0,203
9279	304	740	2,434
6512	1036	1750	1,689
série 2	série 2	série 2	série 2
0795	1464	1056	0,721
8642	1704	162	0,095
2191	2526	462	0,183
9610	2657	385	0,145
5615	605	465	0,769
6460	4148	1045	0,252
8777	5257	3354	0,638

Tableau 2 : Quantité d'ADN de leptine exprimé par rapport à la quantité d'ADN de β -actine.

2.3 Relation entre la leptine et la stéroïdogénèse

Au cours de la première expérience, les follicules provenaient d'ovaires appartenant à 5 vaches. Aucune relation n'apparaît entre le niveau d'expression du gène de la leptine dans le tissu adipeux d'une vache (figure 46) et la libération de P₄ (figure 47) ou d'E₂ (figure 48) au cours des 30 premières minutes de la périfusion.

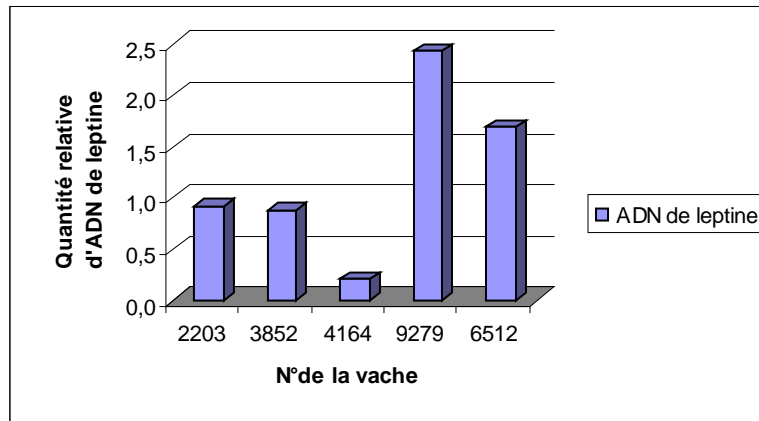


Figure 46 : Expression de la leptine par vache

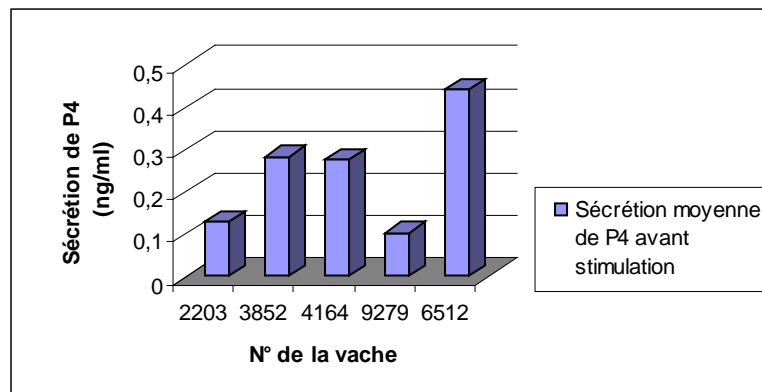


Figure 47: Sécrétion de P₄ au départ par vache.

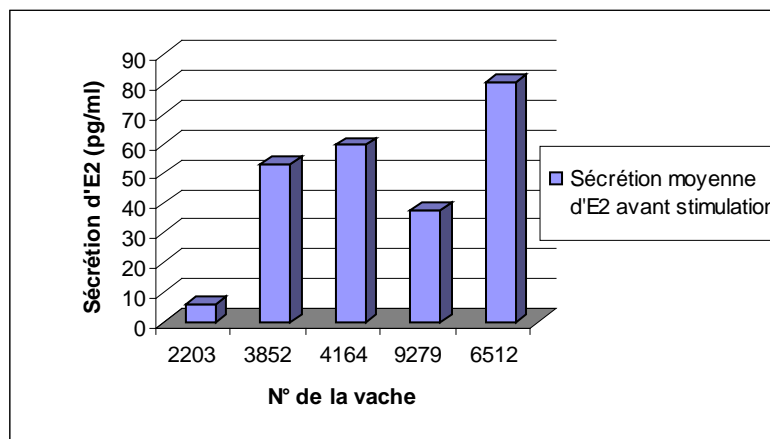


Figure 48: Sécrétion de E₂ au départ par vache.

3. Recherche des récepteurs par immunohistochimie

De l'utérus de rate (témoin positif) et trois types de tissus (ovaire, follicule et corps jaune) ont été prélevés chez la vache afin de mettre au point une technique d'immunohistochimie ciblant les récepteurs de la leptine chez les bovins.

Une première série de follicules fut fixée au formol et incluse en paraffine en vue de tester le kit d'amplification Envision (DAB⁺) de chez Dako. Cette méthode ne procurant pas de résultats satisfaisant, une autre fut alors essayée. Cette dernière consistait à fixer les coupes par le froid dans du Tissue-Tek afin d'obtenir des coupes en cryostat de meilleure qualité que les traditionnelles coupes en paraffine. Le kit LSAB⁺ de chez Dako était alors utilisé pour amplifier le signal. Malgré ces deux techniques différentes le marquage espéré est quasiment inexistant alors que certaines parties des tissus se colorent de façon inattendue

Les coupes soumises à la technique utilisant l'Envision (Figure 49 à 52) présentent parfois de très faibles colorations jaunes-orangées mais cela ne représente pas une réponse significative d'autant plus qu'elle ne se répète pas systématiquement dans toutes les coupes mais plutôt de manière sporadique. Par contre dans toutes les coupes où l'on peut trouver du collagène il y a un marquage non spécifique qui se fait à ce niveau. Cela représente sans doute un marquage non spécifique. En ce qui concerne les coupes traitées avec le kit LSAB⁺ (Figures 53 à 55), la coloration rouge apparaît aussi de façon irrégulière et de plus quand elle est présente c'est aussi sur le témoin négatif. Cela doit sûrement vouloir dire que ce marquage n'est dans ce cas pas spécifique.

Abréviations :

CJ = corps jaune

PF = petit follicule

GR= granulosa

TH = thèque

CL = cellule lutéale

AF = antrum folliculaire

TO = tissu ovarien

VX = vaisseau sanguin

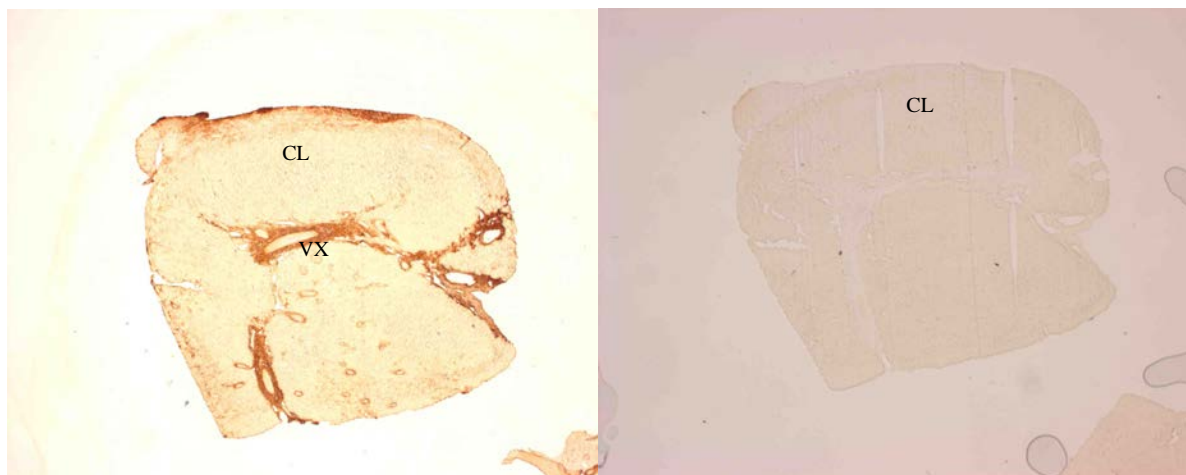


Figure 49 : Morceau de corps jaune grossissement 12.5x. A gauche la coupe positive et à droite la négative. Un marquage est visible sur la coupe positive au niveau du collagène du tissu conjonctif entourant les vaisseaux sanguins. C'est un marquage non spécifique.



Figure 50 : Follicule ovarien grossissement 12.5x. A gauche la coupe positive et à droite la coupe en coloration HES. Une coloration est visible sur la coupe positive au niveau du collagène du corpus albicans. C'est aussi un marquage non spécifique.



Figure 51 : Follicule ovarien grossissement 200x. Sur cette coupe on peut observer un léger marquage de la granulosa.

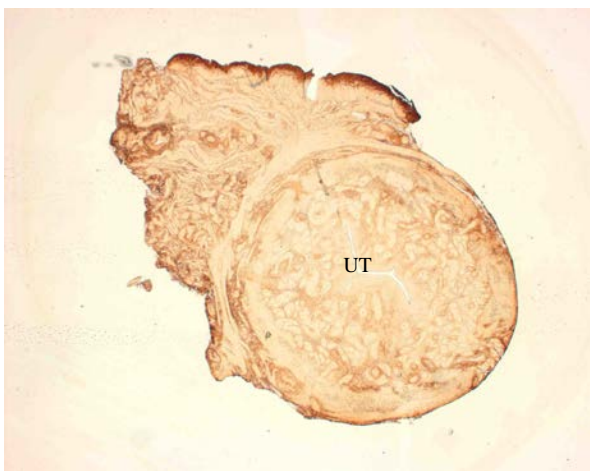


Figure 52 : Utérus de rate grossissement 12.5x. Contrôle positif.

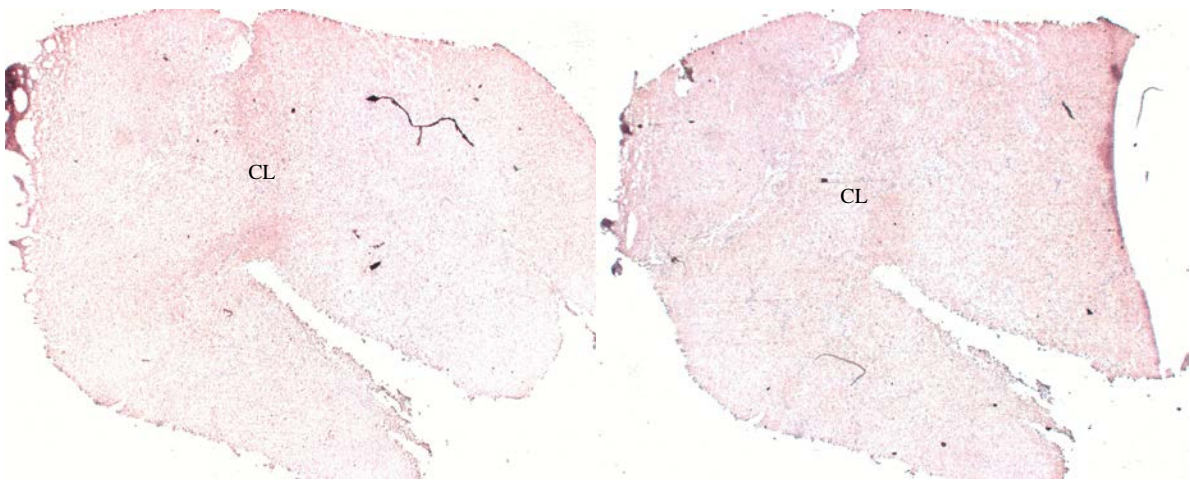


Figure 53 : Morceau de corps jaune grossissement 12.5x. A gauche la coupe positive et à droite la négative. La couleur légèrement rosée est sensiblement identique dans les 2 coupes. Le marquage est absent dans ces coupes.

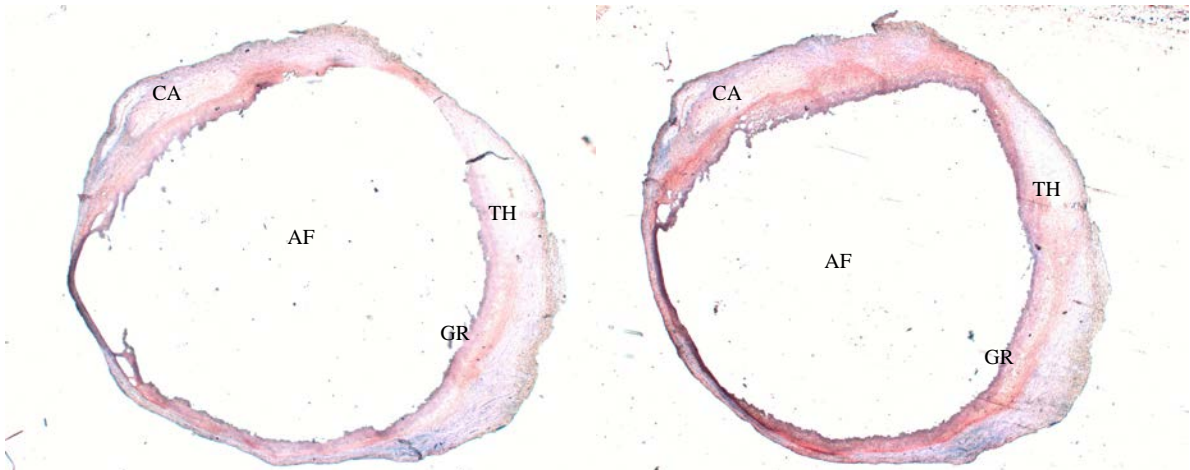


Figure 54 : Follicule ovarien grossissement 12.5x. A gauche la coupe positive et à droite la négative. La coloration rose-rouge est plus marquée dans la coupe négative ce qui veut donc dire que le marquage est non spécifique.

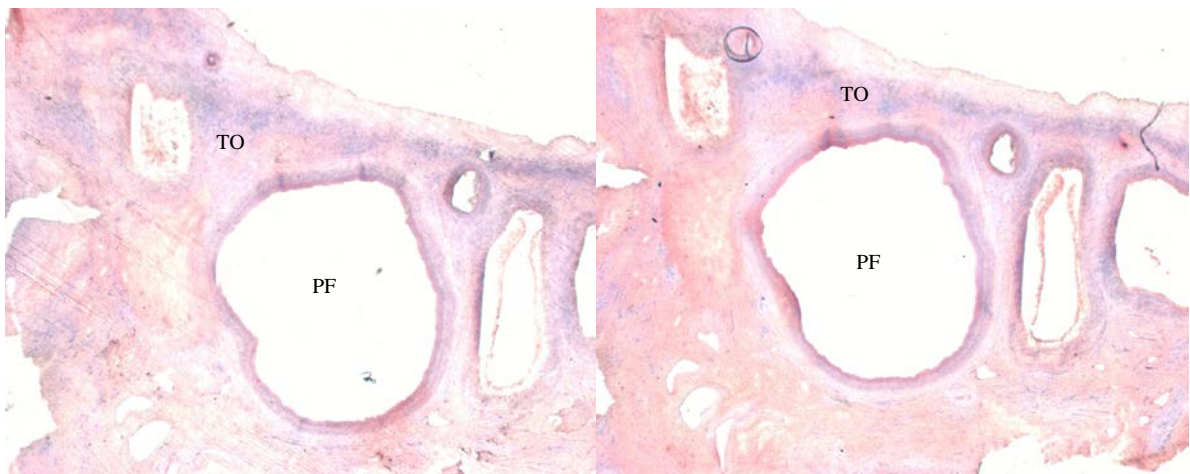


Figure 55 : Morceau d'ovaire grossissement 12.5x. A gauche la coupe positive et à droite la négative. La coloration rosée est un peu plus foncée dans la coupe négative ce qui veut dire que le marquage est non spécifique.

4. Expression du récepteur de la leptine dans les tissus ovariens

4.1 Quantité d'ARN totale dans le tissu

La mesure de cette quantité d'ARN extrait est reprise dans le tableau 4.

Tissu	Concentrations d'ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Volumes aliquotés (μl)
Follicule	4,72	1,5
Corps jaune	2,96	1,5
Ovaire 1	6,32	1,5
Ovaire 2	2,96	1,5

Tableau 4 : Quantité d'ARN extrait par mg de tissu ovarien et volumes utilisés pour la PCR.

4.2 Expression du récepteur

L'expression du récepteur à la leptine par rapport à la β -actine est exprimée dans le tableau 5 pour les différents tissus ovariens.

Tissu	B-actine	Récepteur	Leptine/B-actine
Follicule	1408	1981	1,407
Corps jaune	2366	2442	1,032
Ovaire 1	2052	1956	0,953

Tableau 5 : Quantité d'ADN du récepteur à la leptine exprimé par rapport à la quantité d'ADN de β -actine.

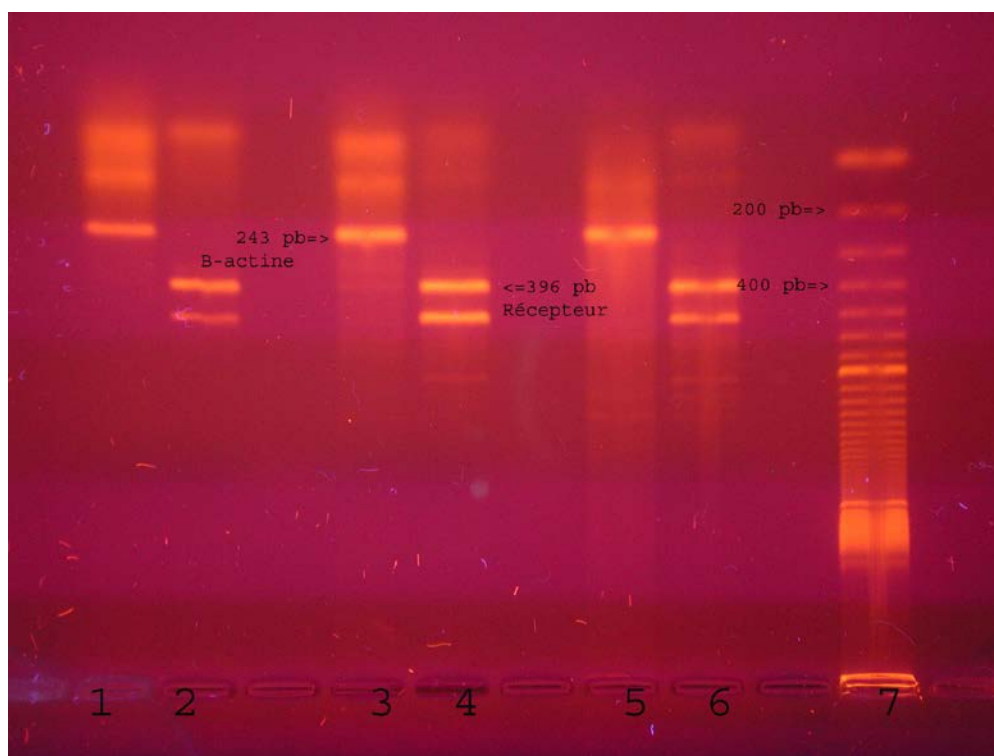


Figure 56 : Image obtenue après RT-PCR semi quantitative sur des échantillons de différents tissu ovariens

La photo représentée en figure 56, quant à elle, est obtenue après une RT-PCR semi-quantitative avec de l'ARN extrait à partir de tissus ovariens prélevés sur les vaches. Les colonnes 1 et 2 sont de l'ADN de follicule, les colonnes 3 et 4 sont de l'ADN de corps jaune et les colonnes 5 et 6 sont de l'ADN d'ovaire.

Chapitre V :
Discussions

Pour rappel, les objectifs poursuivis dans cette étude étaient de mettre en évidence une éventuelle influence directe de la leptine sur l'activité ovarienne chez le bovin. Pour cela, nous avons recherché dans un premier temps une relation entre la synthèse de leptine par le tissu adipeux de la vache et la synthèse des stéroïdes par ses follicules *in vitro*, et un effet d'un conditionnement *in vitro* des follicules par des doses variables de leptine sur la stéroïdogénèse ultérieure. Dans un second temps, nous avons cherché à mettre en évidence la présence de récepteurs cellulaires spécifiques de la leptine au niveau des différentes structures ovariennes, par immunohistochimie puis par RT-PCR.

1. Stéroïdogénèse *in vitro*

La technique de périfusion utilisée est une technique mise au point au laboratoire qui a été validée en conséquence des résultats probants qu'elle fournissait (Noël *et al.* 1995). La stimulation des follicules avec de la FSH et de la LH induit une stéroïdogénèse dont la dynamique peut être suivie au fil des échantillons (Figure 57) et le préconditionnement hormonal a déjà fait ses preuves lors de précédentes recherches sur les effets de la mélatonine, de l'IGF-1, EGF, TGFprogestérone (Perrad *et al.* 1998).

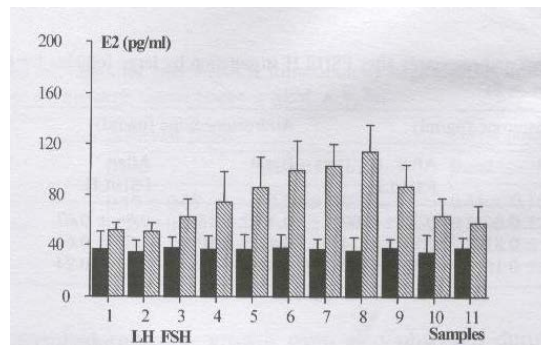


Figure 57: Sécrétion d'E2 par les petits follicules en réponse à la stimulation des gonadotropines *in vitro* (barres hachurées)

En dépit du respect scrupuleux de la méthode et des trois expériences entreprises, aucune influence directe n'a pu être observée sur la stéroïdogénèse que ce soit suite à l'apport de LH ou de FSH ce qui a empêché d'analyser un effet de la leptine *in vitro*. Lors de la troisième expérience, plusieurs modifications avaient été réalisées en vue d'améliorer les résultats mais ce fut en vain. Il est difficile de mettre à jour la ou les raisons pour lesquelles le système n'a pas fonctionné avec les follicules bovins comme avec les follicules ovins. Peut-être que les follicules ovariens bovins ne sont pas aptes à subir un tel traitement, ce qui impliquerait l'apport d'autres modifications au système pour l'adapter ainsi à l'espèce étudiée.

Néanmoins quelques résultats concernant le comportement sécrétoire des follicules peuvent être tirés de la première expérience.

1.1 Stéroïdogénèse en fonction de la taille des follicules

Pour la P₄, les plus gros follicules (8 et 10 mm) sécrètent dès le départ une quantité d'hormone supérieure à celle des plus petits follicules. Mais la réponse à la stimulation est plus importante chez les follicules de taille moyenne qui atteignent un maximum de sécrétion similaire au maximum atteint par les gros follicules qui pourtant en produisaient plus au départ. Pour ce qui est des petits follicules (≤ 6 mm), l'effet de la stimulation ne se fait pas sentir de façon significative, une légère augmentation de P₄ apparaît sous l'effet de la LH.

Le fait que la LH ne disparaisse pas complètement dès l'arrêt de son administration pourrait être une explication au léger maintien de la sécrétion de P₄ après le pic.

En ce qui concerne l'E₂, la sécrétion de base se répartit en deux groupes ; le gros follicule (10 mm) a une sécrétion beaucoup plus importante que les autres (≤ 8 mm) ceux-ci suivent une évolution identique avec des valeurs semblables. Le gros follicule quant à lui suit une évolution similaire mais a des concentrations beaucoup plus élevées et montre un pic de sécrétion beaucoup plus grand. Cette observation était attendue car il est bien connu que l'activité aromatase augmente avec la taille des follicules.

L'absence de réponse des petits follicules est peut-être due à l'absence de récepteurs aux gonadotropines. Chez la brebis, la taille critique est environ 2 mm ; nous n'avons pas pu trouver dans la littérature des données concernant ce phénomène chez les bovins.

1.2 Stéroïdogénèse en fonction des traitements de leptine

Pour la sécrétion de P₄, il semblerait que l'origine de la leptine n'ait pas vraiment d'importance car c'est à la leptine bovine 5ng et à la leptine souris 5ng que le pic de progestérone est plus important, ce serait donc la quantité et non pas l'origine de la leptine qui aurait une influence.

En ce qui concerne la sécrétion de E₂, on peut voir que la leptine stimule la sécrétion de E₂ après son injection, cette stimulation est perceptible a toutes les concentrations de leptine administrées.

Plusieurs points restent inexplicables. Après une diminution de production due probablement à l'épuisement des réserves cellulaires en hormones, une augmentation de sécrétion tant d'E₂ que de P₄ s'observe sur un grand nombre de follicules qu'ils soient traités avec de la leptine ou non. Ce phénomène n'avait jamais été observé auparavant au laboratoire. Les deux autres expériences ayant raté, nous n'avons pas pu confirmer cette observation, encore moins d'attribuer à la leptine un effet direct sur la sécrétion et/ou la synthèse de P₄ ou de E₂.

D'autre part, si la sécrétion de P₄ présente un profil « normal », l'inhibition brutale de la libération d'E₂ pendant la stimulation FSH est pour le moins paradoxale et est contraire aux observations habituelles. Il ne peut pourtant s'agir d'erreur de mesures puisque l'observation est reproductible et que les tubes étaient mélangés au cours du RIA, réalisé lui-même en duplicata.

Il ne peut s'agir non plus d'un effet « leptine » puisque les follicules témoins non-traités réagissent de la même manière que ceux stimulés par la leptine.

1.3 Stéroïdogénèse en fonction de la synthèse de leptine de la vache

Le but de la manipulation était de mettre en évidence une possible corrélation entre la leptinémie d'une vache et la stéroïdogénèse des follicules avant préconditionnement. En effet, comme il est mentionné plus haut dans ce travail, il existe un taux de leptinémie en dessous duquel le système reproducteur n'est pas activé, de plus une valeur critique de leptine et le maintien de son rythme circadien sont essentiels au bon fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Goumenou *et al.* 2003). La leptine serait donc le lien direct entre le tissu adipeux et les gonades.

Il n'existe pas de corrélation significative entre la libération des stéroïdes au début de la périfusion et la synthèse de leptine dans le tissu adipeux de la vache, même lorsqu'on étudie des follicules de diamètre identique.

Mais, même si l'expression varie de 1 à 10 selon les animaux, ces valeurs sont, par rapport à ce qu'on peut observer dans d'autres conditions et avec d'autres races, toutes situées dans des valeurs faibles. Cela est à mettre en relation avec le caractère très peu gras de la race Blanc-Bleu-Belge et la relative homogénéité des résultats due au fait que les vaches abattues présentaient un état corporel très proche.

L'étude devrait être réalisée avec des animaux maigres et gros ou de races différentes.

La seule chose qui puisse être observée est que, au sein d'une même race réputée comme étant très peu grasse (le blanc-bleu belge), il existe quand même de fortes variations de leptinémie. L'observation d'un plus grand échantillon ainsi que la comparaison inter-races seraient intéressantes à réaliser.

2. Recherche des récepteurs spécifiques de la leptine

2.1 Recherche par immunohistochimie

La première technique utilisée (c'est à dire celle utilisant le kit Envision de chez Dako) s'est soldée par un non-marquage des tissus. Seule une coloration jaune-orangée du collagène a pu être observée de façon quasiment systématique sur les coupes traitées avec de l'anticorps primaire. Ce phénomène doit sûrement être dû à une réaction non spécifique étant donné que les récepteurs ont bien été mis en valeur grâce à la technique de RT-PCR. Une autre technique ayant recours au kit LSAB⁺ fut alors utilisée afin de les mettre en évidence. Malgré les conditions de fixations et de traitement des coupes améliorées, les résultats obtenus ne furent pas concluants. En effet, un marquage ne pouvait pas vraiment être observé, mais en plus la couleur rouge que prenait certaines structures se retrouvait à la fois dans le contrôle positif et négatif. L'anticorps primaire utilisé ne doit sans doute pas convenir pour des tests réalisés sur bovins malgré la grande homologie existant entre les ADN de récepteur à la leptine entre les différentes espèces. (Pour rappel, l'anticorps Ob-R (B-3) sc-8391 est un anticorps efficace contre souris, rat et humain.). Un autre anticorps primaire plus adapté devrait donc être testé afin de pouvoir mettre au point une méthode d'immunohistochimie probante dans l'étude des récepteurs

2.2 Recherche par RT-PCR

A la base, cette manipulation n'était pas prévue dans ce projet ; c'est la raison pour laquelle elle n'a pas été réalisée sur des ovaires prélevés pour les trois expériences mais sur des ovaires spécialement prélevés à cet effet. La technique de la RT-PCR a permis de mettre en évidence la présence des récepteurs à la leptine à la fois dans les corps jaunes, les follicules et l'ovaire proprement dit. Cette première approche semble montrer que, si l'on rapporte l'expression de la leptine à la quantité de tissu actif, les gros follicules synthétiseraient beaucoup plus de récepteurs que les autres tissus ovariens. Il serait très intéressant de répéter la manipulation sur un plus grand échantillon et ce à différentes périodes de l'année pour ainsi mettre en évidence des variations dans cette synthèse en fonction de la saison et de l'état physiologique de l'animal. Cela pourrait contribuer à l'approfondissement de la connaissance du rôle de la leptine au niveau de la fonction reproductrice.

Chapitre VI :
Conclusions et
Perspectives

Les essais réalisés lors de ce travail méritent d'être repris avec des variantes destinées à approfondir certaines études.

Tout d'abord en ce qui concerne la culture in vitro des follicules, plusieurs modifications doivent encore être apportées. L'idéal serait de travailler avec des follicules ayant atteint un même stade de développement et de cette manière ne plus avoir de variations de sécrétion due à la taille pour ainsi bien évaluer l'influence des différents traitements. Il serait également bien avenant de pouvoir travailler avec des follicules d'une même vache dans chaque traitement, de manière à pouvoir analyser l'effet « individu ». Des follicules de grande taille devraient également être utilisés car ils possèdent théoriquement plus de récepteurs LH et FSH et une plus grande capacité de sécrétion. Enfin, la stimulation devrait être dans un premier temps, effectuée uniquement avec de la leptine à différentes concentrations. En effet, cela permettrait de voir l'effet de la leptine seule sur les follicules et corps jaunes et une fois que ces effets seraient connus, on pourrait ajouter une stimulation de LH et FSH pour pouvoir distinguer les effets des différentes hormones : c'est ce qui a été tenté lors de notre troisième essai.

La RT-PCR semi-quantitative sur tissu adipeux est une technique qui peut se révéler très intéressante dans l'étude de l'effet de la leptine sur la fonction reproductrice. Il serait donc opportun de réaliser une batterie de tests sur un plus grand échantillon d'individus de même race mais d'états corporels fort différents afin de connaître la variation qu'il peut exister en son sein et de pouvoir par la suite comparer les différentes races entre-elles. La mesure de la leptinémie par R.I.A. donnerait peut-être des résultats aussi intéressants sinon plus pour l'étude des effets de cette hormone sur l'activité ovarienne in vivo.

La RT-PCR sur tissu ovarien peut s'avérer être une bonne méthode au niveau de la quantification relative de l'expression du récepteur à la leptine entre les différentes structures et à différentes périodes de l'année. Ces données pourraient également être corrélées avec la stéroïdogénèse et éventuellement avec les données obtenues pour la leptinémie de base.

Concernant l'immunohistochimie, l'anticorps primaire devrait être remplacé par un autre mieux adapté au tissu bovin et la mise au point d'une technique pourrait alors être mieux envisageable.

Les résultats obtenus au terme de ce travail ne permettent pas de tirer de conclusions précises. Tout ce que l'on peut affirmer c'est que malgré les différentes techniques utilisées au cours de cette recherche, aucun effet direct de la leptine sur l'activité ovarienne n'a pu être observé. Sa découverte étant assez récente et son fonctionnement au niveau de la fonction reproductrice étant encore parfois assez flou et paradoxal, il n'est pas improbable que, après quelques améliorations des différentes techniques et une meilleure connaissance de l'hormone, un effet direct de la leptine soit enfin observé puisque ses récepteurs sont, tel qu'il a été prouvé dans ce travail, synthétisés au niveau des différentes structures ovariennes.

Références
bibliographiques

Auwerx J., Staels B.

Leptin

The Lancet **351** (9104), 737-742 (1998).

Barash I.A., Cheung C.C., Weigle D.S., Ren H., Kabisting E.B., Kuijper J.L., Clifton D.K., Steiner R.A.

Leptin is a metabolic signal to the reproductive system.

Endocrinology **137** (7), 3144-3147 (1996).

Bister J.L., Noël B., Perrad B., Mandiki S.N.M., Mbayahaga J., Paquay R.

Control of ovarian follicles activity in the ewe.

Domestic Animal Endocrinology **17** (2-3), 315-328 (1999).

Blum W.F.

Leptin: The voice of the adipose tissue.

Hormone Research **18**, (supl 4), 2-8 (1997).

Brann D.W., Wade M.F., Dhandapani K.M., Mahesh V.B., Buchanan C.D.

Leptin and reproduction.

Steroids **67** (2), 95-104 (2002).

Buchanan C., Mahesh V., Zamorano P., Brann D.

Central nervous system effects of leptin.

Trends in Endocrinology and Metabolism **9** (4), 146-150 (1998).

Cameo P., Bischof P., Calvo J.C.

Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture.

Biology of Reproduction **68**, 472-477 (2003).

Caprio M., Fabbri E., Isidori A.M., Aversa A., Fabbri A.

Leptin in reproduction.

Trends in endocrinology & metabolism **12** (2), 65-70 (2001).

Chehab F.F.

Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction.

Trends in Pharmacological Sciences **21** (8), 309-314 (2000).

Chehab F.F., Jun Qiu, Mounzih K., Ewart-Toland A., Ogus S.

Leptin and reproduction.

Nutrition Reviews **60** (10), 39-46 (2002).

Chilliard Y., Bocquier F., Delavaud C., Faulconnier Y., Bonnet M., Guerre-Millo M., Martin P., Ferlay A.

La leptine chez le ruminant. Facteurs de variation physiologiques et nutritionnels.

INRA Productions Animales **12**, 225-237 (1999).

Chilliard Y., Bonnet M., Delavaud C., Faulconnier Y., Leroux C., Djiane J., Bocquier F.

Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration.

Domestic Animal Endocrinology **21**, 271-295 (2001).

Clarke I.J., Henry B.A.

Leptin and reproduction.

Reviews of Reproduction **4**, 48-55 (1999).

Garcia M.R., Amstalden M., Stanko R.L., Morrison C.D., Keisler D.H., Nizielski S.E., Williams G.L.

Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle.

Domestic Animal Endocrinology **23** (1-2), 339-349 (2002).

Garcia M.R., Amstalden M., Williams S.W., Stanko R.L., Morrison C.D., Keisler D.H., Nizielski S.E., Williams G.L.

Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle.

Journal of Animal Science (American Society of Animal Science) **80**, 2158-2167 (2002).

Goumenou A.G., Matalliotakis I.M., Koumantakis G.E., Panidis D.K.

The role of leptin in fertility

European Journal of Obstetrics & Gynaecology and Reproductive Biology **106** (2), 117-124 (2003).

Hendriksen P.J.M., Vos P.L.A.M., Steenweg W.N.M., Bevers M.M., Dieleman S.J.

Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes

Theriogenology **53**, 11-20 (2000).

Holness M.J., Munns M.J., Sugden M.C.

Currents concepts concerning the of leptin in reproductive function.

Molecular and Cellular Endocrinology **157** (1-2), 11-20 (1999).

Jorritsma R., Wensing T., Kruip T.A.M., Vos P.L.A.M., Noordhuizen J.P.T.M.

Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance I dairy cows.

Veterinary Research **34**, 11-26 (2003).

Lindheim S.R., Sauer M.V., Carmina E., Chang P.L., Zimmerman R., Lobo R.A.

Circulating leptin levels during ovulation induction: Relation to adiposity and ovarian morphology.

Fertility and Sterility **73** (3), 493-498 (2000).

Magni P., Motta M., Martini L.

Leptin: A possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function.

Regulatory Peptides **92** (1-3), 51-56 (2000).

Marikovsky M., Rosenblum C.I., Faltin Z., Friedman-Einat M.

Appearance of leptin in wound fluid as a response to injury.

Wound Repair and Regeneration **10**, 302-307 (2002)

Moschos S., Jean L. Chan, Mantzoros C.S.

Leptin and reproduction: A review.
Fertility and Sterility **77**, 433-444 (2002).

Mohan M. and Rajamahendran R.
Effects of unilateral ovariectomy on follicular development and ovulation in cattle.
Theriogenology **49**, 1059-1070 (1998).

Schneider J.E., Zhou D., Blum R.M.
Leptin and metabolic control of reproduction.
Hormones and Behavior, **37**, 306-326 (2000).

Schubring C., Blum W.F., Kratzsch J., Deutscher J., Kiess W.
Leptin, the ob gene product, in female health and disease.
European Journal of Obstetrics & Gynaecology and Reproductive Biology **88** (2), 121-127 (2000).

Spicer L.J.
Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction.
Domestic animal endocrinology **21** (4), 251-270 (2001).

Annexes

1. Solutions non-autoclavées

Ethanol 75%

Usage : on en utilise 0,5 ml par échantillon à extraire

Préparation : dilution dans de l'eau DEPC à partir d'éthanol 95%

Tampon de chargement pour l'ADN 10X concentré

Usage : utilisé pour les électrophorèses en gel d'agarose

Préparation : dans du tampon 10X : - 25% de ficoll 400 *pour faire tomber l'échantillon au fond du puits*
- 0,025% de bleu de bromophénol
- 0,025% de xylène cyanol 2 *colorants pour des gammes de masses moléculaires différentes.*

Tampon TAE 1X, pH 8.0

Usage : pour le gel et la phase liquide de l'électrophorèse, prévoir 1 litre.

Préparer une solution stock de TAE 50X avec : - Tris base 242 g
- acide acétique glacial 57.1ml
- 0.5M EDTA (pH 8.0) 100 ml
Porter à 1 litre avec H₂O et ajuster à pH~8.5

Préparation : pour 1 l de TAE 1X : 20 ml de solution stock TAE 50X + 980 ml d'eau distillée

Préparation du PBS 10X

Usage : utilisé pour les rinçage en immunohistochimie.

Composition: Na₂HPO₄ 14.4 g
KH₂PO₄ 2.4 g

Préparation : porter à 1 litre avec de l'eau déminéralisée.

Préparation du PBS salin 1X

Usage : utilisé pour diluer l'anticorps primaire en immunohistochimie.

Préparation : ajouter : - 0.8 g de NaCl
- 0.02 g de KCl

à 100ml de PBS 1X.

2. Solutions auto-clavées

Eau

eau désionisée, distillée puis auto-clavée pour préparer les tampons, diluer les réactifs RT-PCR, rincer le matériel.

T10E1

Usage : pour diluer l'ARN, l'ADN, les primers, le tampon colorant, faire les mélanges RT et PCR, diluer les dNTPs ...

Composition : - Tris 10mM, pH 8
 - EDTA 0,2mM
 - eau DEPC

Utiliser : - une solution stock de EDTA 20mM : 0,372 g EDTA/50 ml eau DEPC
 - la solution stock de Tris-HCl 100X concentré (1M) (*Sigma*)
 - de l'eau DEPC

Préparation : pour 250 ml : 2,5 ml de solution stock Tris-HCl 1M + 2,5 ml de solution stock EDTA 20mM + 245 ml d'eau DEPC

Autoclaver 2 heures.

T3E0.2

Usage : pour diluer les random primers

Composition : - Tris 3 mM, pH 7
 - EDTA 0,2 mM
 - eau DEPC

Utiliser : - une solution stock de EDTA 20 mM : 0,372 g EDTA/50 ml eau DEPC
 - la solution stock de Tris-HCl 100X concentré (1M) (*Sigma*)
 - de l'eau DEPC

Préparation : pour 100 ml : 300 µl de solution stock Tris-HCl 1M + 1 ml de solution stock EDTA 20 mM + 98,7 ml d'eau DEPC

Autoclaver 2 heures.

3. Préparations des réactifs et mélanges congelés

Sondes (Eurogentec)

-2 amorces de 18 bases utilisées pour amplifier la leptine :

LEP1= 5'-GACATCTCACACACGCAG-3'
LEP2= 5'-GAGGTTCTCCAGGTCATT-3'
(issues de l'article de Yuen et al. (1999))

-2 amorces de 21 bases utilisées pour amplifier la β -actine :

ACTINB1 = 5'-AGACCTTCAACACCCCTGCC-3'
ACTINB2 = 5'-TGCTGGAAGGTGGACAGTGA-3'
(issues de l'article de Tai et al. (1998))

Sous forme lyophilisée (quantité variable) à aliquoter à du 100 μ M dans du T10E1.

Ajouter 10 μ l de T10E1 par nmole d'amorce.

Aliquoter par 50 μ l dans des petits tubes PCR autoclavés

dNTP (Amersham)

Faire un mélange à 25 mM des 4 nucléotides.

Mélanger les 4 solutions de nucléotides (250 μ l chacun à 100mM), on obtient 1ml de mélange à 100 mM

Ajouter 3 ml de T10E1 on obtient 4 ml de mélange à du 25 mM et des nucléotides à du 6.25 mM chacun.

Aliquoter par 5, 25 et 300 μ l.

Random primers (Gibco)

On veut un mélange à 100 ng/ μ l

Les RP sont en solution à 3 μ g/ μ l et on a 110 μ l dans le tube.

Diluer 30 fois en ajoutant 3190 μ l de T3E0.2.

Nous obtenons 3300 μ l de solution à aliquoter par 10 μ l ou 50 μ l.

Mélange RT

Matériel

-glace pilée

-tubes PCR 0.2 ml autoclavés

Réactifs et solutions

Sont fournis dans le kit, conservés à -20°C , décongeler à t° ambiante juste avant la réaction et recongeler immédiatement:

- reverse transcriptase 10 000 U, 200 U/ μ l (dans 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.01% NP-40, 50% glycérol).
- 5x First-strand Buffer (250mM Tris-HCL (pH 8.3 RT), 375mM KCl, 15 mM MgCl₂).
- 0.1 M DTT

Préparation :

mélange RT 1 pour 10 tubes (conserver à -20°)

- 10 μ l = 100 ng random primers/tube
 - 4 μ l 10 mM dNTP Mix(6.25 mM each dATP, dGTP, dCTP et dTTP à pH neutre)
 - 106 μ l eau distillée stérile
- Aliquoter en 40 μ l et congeler.

mélange RT 2 pour 10 tubes

- 40 μ l 5x buffer
 - 20 μ l DTT
- Aliquoter en 20 μ l et congeler.

Mélanges PCR

Réactifs :

Un kit de Taq DNA polymérase (réf. T0303Z de amersham pharmacia biotech) fournit le MgCl₂ et le tampon PCR 10x.

Préparation des mélanges PCR leptine (à l'avance et congeler) :

Pour 1 ml :

- 5 μ l amorce LEP1 100 μ M
 - 5 μ l amorce LEP2 100 μ M
 - 32 μ l dNTP 25 mM
 - 54 μ l de MgCl₂
 - 100 μ l tampon PCR
 - 804 μ l d'eau distillée stérile
- Aliquoter par 50 μ l.

Préparation des mélanges PCR β -actine (à l'avance et congeler) :

Pour 1 ml :

- 8 μ l amorce ACTINB1 100 μ M
 - 8 μ l amorce ACTINB2 100 μ M
 - 32 μ l dNTP 25 mM
 - 100 μ l tampon PCR (concentré 10X)
 - 104 μ l de MgCl₂
 - 748 μ l d'eau distillée stérile
- Aliquoter par 50 μ l.

4. Préparation des solutions de FSH, LH et leptine pour la périfusion

La périfusion a un débit de 2,34 ml/30 min/tube, ce qui fait 11,17 ml/30 min pour 5 tubes et 55,85 ml/30 min pour 25 tubes.

FSH

Mélanger de la FSH standard avec du TCM199 pour obtenir une solution de concentration 15 ng/ml.

Pour périfuser 25 follicules et/ou corps jaunes pendant 1 heure, 200 ml de solution sont requis, il faut donc ajouter 600 µl de FSH standard concentrée à 5 ng/µl dans 200 ml de TCM199.

LH

Mélanger de la LH standard avec du TCM199 pour obtenir une solution de concentration 10 ng/ml.

Pour périfuser 25 follicules et/ou corps jaunes pendant 20 minutes, 100 ml de solutions sont requis, il faut donc ajouter 200 µl de LH standard concentrée à 5 ng/µl dans 100 ml de TCM199.

Leptine

- a. Leptine murine 20 ng/ml
- b. Leptine murine 5 ng/ml
- c. Leptine murine 1 ng/ml
- d. Leptine bovine 5 ng/ml

La leptine murine est concentrée à 1 µg/µl il faut donc la diluer 10 fois pour obtenir une concentration de 100 ng/µl.

Solution a → Ajouter 600 ng (6 µl) de leptine murine 100 ng/µl dans 30 ml de TCM199.

Solution b → Pipeter 10 ml de solution « a » (200 ng de leptine) et l'ajouter à 30 ml de TCM199.

Solution c → Pipeter 5 ml de solution « b » (25 ng de leptine) et l'ajouter à 20 ml de TCM199.

Données concernant les follicules mis en culture lors de la première expérience

Follicule n°	Poids du follicule	Diamètre du follicule	Vache n°	Etat de la carcasse
1	0,1682 gr	6 mm	6512	2
2	0,2073 gr	7 mm	3852	2
3	0,2493 gr	8 mm	4164	2
4	0,1686 gr	7 mm	4164	2
5	0,1050 gr	7 mm	3684	2
6	0,0667 gr	5 mm	6512	2
7	0,0744 gr	5 mm	3852	2
8	0,1207 gr	6 mm	4164	2
9	0,0899 gr	6 mm	4164	2
10	0,0985 gr	6 mm	3684	2
11	0,0613 gr	4 mm	6512	2
12	0,1168 gr	6 mm	9279	2
13	0,0433 gr	4 mm	4164	2
14	0,5494 gr	10 mm	2578	2
15	0,1315 gr	7 mm	3684	2
16	0,1170 gr	6 mm	3852	2
17	0,0674 gr	5 mm	9279	2
18	0,1805 gr	8 mm	4164	2
19	0,1370 gr	7 mm	2578	2
20	0,0769 gr	6 mm	3684	2
21	0,1866 gr	8 mm	3852	2
22	0,0402 gr	4 mm	9279	2
23	0,1207 gr	6 mm	4164	2
24	0,2004 gr	8 mm	2578	2
25	0,1221 gr	6 mm	2203	2
26	x	x	x	2
27	x	x	x	2
28	x	x	x	2
29	x	x	x	2
30	x	x	x	2

Données concernant les follicules et corps jaunes mis en culture lors de la seconde expérience

Follicule ou corps jaune n°	Poids du follicule ou du corps jaune	Diamètre du follicule	Vache n°	Carcasse
Corps jaune	0,2881 gr	x	2183	2
Follicule	0,2610 gr	7 mm	8800	2
Follicule	0,2167 gr	8 mm	8800	2
Follicule	0,3484 gr	9 mm	795	2
Follicule	0,2706 gr	8 mm	2191	2
Follicule	0,7463 gr	11 mm	5125	2
Corps jaune	0,2611 gr	x	2183	2
Follicule	0,1442 gr	7 mm	795	2
Follicule	0,0880 gr	5 mm	8642	2
: Follicule	0,4320 gr	9 mm	5125	2
: Follicule	0,0792 gr	6 mm	8642	2
: Follicule	1,0954 gr	12 mm	9610	2
: Corps jaune	0,2251 gr	x	8642	2
: Follicule	0,4890 gr	10 mm	8777	2
: Follicule	0,2082 gr	7 mm	5615	2
: Follicule	0,1326 gr	6 mm	8642	2
: Follicule	0,3977 gr	9 mm	5125	2
: Follicule	1,5695 gr	15 mm	8777	2
: Corps jaune	0,2288 gr	x	8642	2
: Follicule	0,0751 gr	5 mm	5615	2
: Follicule	0,1020 gr	5 mm	8642	2
: Follicule	0,6408 gr	11 mm	9610	2
: Follicule	0,5430 gr	10 mm	8777	2
: Corps jaune	0,2288 gr	x	6460	2
: Corps jaune	0,2098 gr	x	6460	2
: Corps jaune	x	x	8642	2
: Corps jaune	x	x	6460	2
: Corps jaune	x	x	6460	2
: Corps jaune	x	x	2183	2
: Corps jaune	x	x	2183	2

Données concernant les follicules mis en culture lors de la troisième expérience

Tube n°	Taille du follicule en mm	Poids du follicule en gr	Etat de la carcasse
1	23	3,8624	2
2	16	2,4459	2
3	13	1,3	2
4	12	0,8242	2
5	9	0,5824	2
6	10	0,4668	2
7	7	0,259	2
9	21	3,4717	2
10	17	1,7188	2
11	12	0,9816	2
12	8	0,6401	2
13	10	0,525	2
14	8	0,2856	2
15	8	0,2472	2
17	18	2,9673	2
18	15	1,535	2
19	11	0,9404	2
20	9	0,6167	2
21	10	0,5019	2
22	7	0,2738	2
23	6	0,2084	2