

LA LEPTINE CHEZ LE MANCHOT ROYAL : EXPRESSION DU GÈNE , ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES AU COURS DU JEÛNE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Philippe, Jean-Luc, René GUICHARD
Né, le 14 novembre 1977 à Saint Martin d'Hères (Isère)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Hervé LEFEBVRE**

JURY

PRESIDENT :
M. Daniel RIVIERE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Hervé LEFEBVRE
Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. René GROSCOLAS

Directeur de Recherches au C.N.R.S. de STRASBOURG

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur par intérim	:	M.	G. BONNES
Directeurs honoraires.....	:	M.	R. FLORIO
		M.	R. LAUTIE
		M.	J. FERNEY
		M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	:	M.	A. BRIZARD
		M.	L. FALIU
		M.	C. LABIE
		M.	C. PAVAUX
		M.	F. LESCURE
		M.	A. RICO

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

- M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **HAY Magali**, *Zootecnie*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

A Monsieur le Professeur RIVIERE, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, *Physiologie*, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur LEFEBVRE, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, *Physiologie et Thérapeutique*, qui a accepté ce sujet et m'a donné l'impulsion nécessaire à la rédaction finale de cette thèse. Sincères remerciements.

A Madame le Docteur BOURGES-ABELLA, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, *Histologie, Anatomie Pathologique*, qui a accepté avec gentillesse de faire partie du jury de cette thèse. Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur GROSCOLAS, Directeur de Recherches au Centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques de Strasbourg, et à Monsieur le Docteur TAOUIS, Directeur de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tours, qui m'ont guidé tout au long de cette étude.

Au personnel du Centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques de Strasbourg et de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tours, et à tous ceux qui m'ont apporté leur soutien technique et moral au cours de cette année.

Ce travail a été réalisé au Centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques de Strasbourg (UPR 9010, CNRS), au sein de l'équipe "Stockage et mobilisation des réserves énergétiques" dirigée par René Groscolas.

L'ensemble des manipulations portant sur la leptine (recherche de l'expression, dosage plasmatique) a été effectué à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tours, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe "Régulation du métabolisme des oiseaux" dirigée par Mohamed Taouis.

Les prélèvements de terrain ont été réalisés en accord avec les "Mesures agréées pour la conservation de la faune antarctique et sub-antarctique", et avec le soutien financier de l'Institut Français pour la Recherche et la Technologie Polaires et le support logistique des Terres Australes et Antarctiques Françaises.

SOMMAIRE

Table des illustrations	9
Abréviations utilisées	10
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	
1- De la théorie lipostatique à la découverte de la leptine	15
2- Rappels sur la leptine	16
2.1- Chez les mammifères	16
2.1.1- Lieu d'expression, structure, et récepteur de la leptine	16
2.1.2- Régulation	16
2.1.3- Fonctions	16
2.2- Chez le poulet	18
2.2.1- Lieu d'expression, structure, et récepteur de la leptine	18
2.2.2- Régulation	19
2.2.3- Fonctions	20
2.3- Chez les animaux sauvages	20
3- Le manchot royal : un animal de choix pour l'étude des interrelations entre réserves énergétiques, comportement alimentaire et reproduction	21
4- Objectifs de l'étude	24
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	
1- Localisation de l'expression et séquençage du gène LEP ; caractérisation de la leptine chez le manchot royal	27
1.1- Prélèvements tissulaires	27
1.2- Etude de l'expression du messenger (ARNm) de la leptine	27
1.2.1- Extraction des ARN totaux	28
1.2.2- Transcription inverse	28
1.2.3- Amplification par PCR	28
1.2.4- Electrophorèse sur gel d'agarose	28
1.2.5- Southern Blot sur les produits de PCR	29
1.3- Caractérisation de la protéine LEP dans les tissus	29
1.3.1- Solubilisation des tissus	29
1.3.2- Western Blot	29
1.4- Séquençage d'un fragment du gène LEP du manchot royal	31
1.4.1- Purification	31
1.4.2- Topo-isomérisation et transformation	31
1.4.3- Mini-prep	33
1.4.4- Restriction	33
1.4.5- Séquençage	33

2- Variation de la leptinémie en fonction de l'état métabolique au cours du jeûne	33
2.1- Traitement des animaux	33
2.1.1- Jeûne d'incubation	33
2.1.2- Jeûne en parc	35
2.2- Prélèvements et traitement du sang	37
2.3- Dosage de la leptine plasmatique	37
2.3.1- Milieu d'incubation	37
2.3.2- Anticorps	37
2.3.3- Préparation de leptine marquée	37
2.3.4- Dosage radio-immunologique	39
2.4- Dosage des métabolites plasmatiques	40
3- Analyse statistique	40
 TROISIEME PARTIE : RESULTATS	
1- Expression et caractérisation de la leptine chez le manchot royal ; séquence du gène LEP	43
1.1- Expression du gène LEP	43
1.2- Caractérisation de la leptine	43
1.3- Séquence d'un fragment du gène LEP de manchot royal	45
2- Validation du dosage de la leptine plasmatique	45
2.1- Dilution	45
2.2- Reproductibilité intra-essai	45
2.3- Récupération	47
3- Evolution de l'état métabolique et des concentrations plasmatiques de la leptine au cours du jeûne	47
3.1- Jeûne d'incubation chez le manchot royal	47
3.2- Jeûne en parc chez le manchot royal non couveur	49
 QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION	
1- Expression et caractérisation de la leptine chez le manchot royal ; séquence du gène LEP	52
1.1- Expression et caractérisation de la leptine	52
1.2- Séquence d'un fragment du gène LEP	53
2- Evolution de la leptinémie au cours du jeûne	54
2.1- Validation du dosage de la leptine plasmatique	54
2.2- Leptine et utilisation des réserves énergétiques au cours du jeûne	55
2.3- Leptinémie et signal de réalimentation	55
 CONCLUSION	 57
 PERSPECTIVES	 58
 Références bibliographiques	 61

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

<u>Figure 1</u> : Modifications de la balance énergétique en fonction des variations de la prise alimentaire et de la dépense énergétique ; conséquences sur la masse corporelle ou l'adiposité	14
<u>Figure 2</u> : Facteurs de régulation de la leptine et implication de cette hormone dans le métabolisme énergétique chez les mammifères	17
<u>Figure 3</u> : Facteurs de régulation de la leptine chez le poulet	19
<u>Figure 4</u> : Principales variations physiologiques au cours du jeûne de reproduction chez le manchot royal	22
<u>Figure 5</u> : Recherche de l'expression du gène LEP : étapes et principe de la méthodologie	26
<u>Figure 6</u> : Séquençage du gène LEP : étapes et principe de la méthodologie.....	30
<u>Figure 7</u> : Jeûne de reproduction chez le manchot royal	32
<u>Figure 8</u> : Dosage radio-immunologique de la leptine : étapes et principe de la méthodologie	38
<u>Figure 9</u> : Expression du gène LEP dans différents tissus de manchot royal	42
<u>Figure 10</u> : Niveau relatif d'expression du gène LEP dans différents tissus	42
<u>Figure 11</u> : Présence de leptine dans différents tissus de manchot royal (poussins d'un an en mue)	42
<u>Figure 12</u> : Séquence d'un fragment du gène LEP de manchot royal	44
<u>Figure 13</u> : Courbe étalon obtenue à partir d'une gamme standard de leptine de poulet lors des premiers dosages	44
<u>Figure 14</u> : Courbes de dilution obtenues à partir de plasmas de manchot royal	44
<u>Figure 15</u> : Concentrations en leptine mesurées sur 2 échantillons de plasma de manchot royal, seuls et avec surcharge de leptine recombinante de poulet	46
<u>Figure 16</u> : Récupération de leptine après surcharge de 4 ng de leptine recombinante de poulet (par ml de plasma)	46
<u>Figure 17</u> : Courbe étalon obtenue à partir d'une gamme standard de leptine de poulet lors du dosage définitif	46
<u>Figure 18</u> : Evolution de la leptinémie au cours du jeûne chez des manchots royaux non couveurs en parc	48

Tableaux

<u>Tableau 1</u> : Leptinémie et concentrations plasmatiques en AGNE et AU à 4 stades du jeûne d'incubation chez des manchots royaux	50
<u>Tableau 2</u> : Concentrations plasmatiques en AGNE et AU à 5 stades d'un jeûne en parc chez des manchots royaux non couveurs	50

ABREVIATIONS UTILISEES

ADN : acide désoxyribo-nucléique
ADNc : ADN complémentaire
AGNE : acides gras non estérifiés
AMV : virus de la myeloblastose aviaire
ARN : acide ribo-nucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
AU : acide urique
BET : bromure d'éthidium
BSA : sérum-albumine bovine
DEPC : di-éthyl-pyro-carbonate
dNTP : désoxyribo-nucléotide tri-phosphate
EDTA : acide éthyl-diamine-tétra-acétique
EGTA : acide éthylène-bis(oxy-éthylène-nitrilo)tétra-acétique
IPTG : isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
kD : kilodalton
LEP : leptine
MC : masse corporelle
MI : milieu d'incubation
pb : paire de bases
PBS : tampon phosphate
PCR : réaction en chaîne de la polymérase
PEG : poly-éthylène-glycol
RIA : dosage radio-immunologique
RT : transcription inverse
SLALP : sérum de lapin anti leptine de poulet
SM : solution mère de leptine marquée
SMAL : sérum de mouton anti sérum de lapin
SNK : test de Student - Newman - Keuls
SNL : sérum normal de lapin
TAIA : tissu adipeux intra-abdominal
TASC : tissu adipeux sous-cutané
UI : unité internationale
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

INTRODUCTION

L'image du manchot est bien connue du grand public, sous l'aspect d'un être volontiers sympathique qui va en se dodelinant sur la banquise. En revanche, les manchots de chair et d'os (mais aussi de plume et surtout de graisse) sont bien plus que ces dénommés "pingouins" prôtant parfois à rire : ils présentent des adaptations aussi remarquables que variées.

Par exemple, les manchots royaux plongent en routine à des profondeurs supérieures à 100 mètres, sont capables de jeûner pendant des semaines voire des mois, parfois même au cœur de l'hiver austral, et parviennent à reconnaître le chant de leur poussin ou de leur partenaire au milieu de milliers d'autres. Comme si ce n'était pas suffisant pour une même espèce, voilà que l'on découvre le mâle de manchot royal capable, pour nourrir son poussin dès l'éclosion, de régurgiter des aliments qu'il a conservés presque intacts dans son estomac, alors qu'il jeûne depuis plus de trois semaines.

Depuis de nombreuses années, le Centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques de Strasbourg étudie les mécanismes adaptatifs des animaux aux contraintes environnementales. Un de ses thèmes de recherche porte sur la capacité du manchot à gérer ses réserves énergétiques, notamment au cours des périodes de jeûne. Il est vraisemblable que des hormones, faisant le lien entre réserves et comportement, interviennent dans cette gestion. C'est dans ce contexte que s'intègre la recherche de l'existence et du rôle de la leptine chez le manchot royal, dont nous présentons ici les résultats après quelques rappels bibliographiques.

Cette étude comporte deux volets. Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence la production de leptine dans différents tissus du manchot royal, à l'aide des outils de la biologie moléculaire. Par la suite, nous avons cherché à mettre en évidence un rôle de la leptine dans la gestion des réserves énergétiques en examinant les variations de sa concentration au cours du jeûne, chez des manchots couveurs ou non.

PREMIERE PARTIE :

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

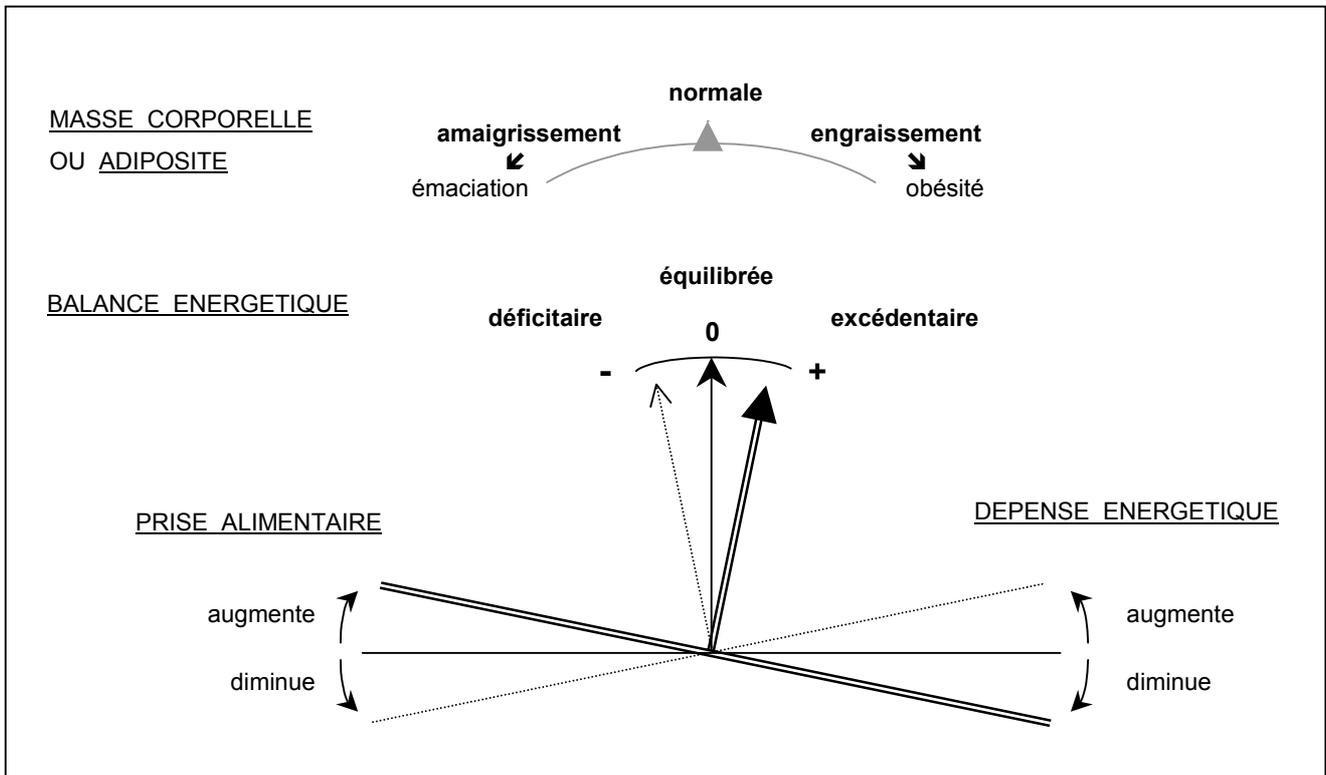


Figure 1. Modifications de la balance énergétique en fonction des variations de la prise alimentaire et de la dépense énergétique ; conséquences sur la masse corporelle ou l'adiposité.

A partir d'une situation "normale", équilibrée, une augmentation de la prise alimentaire et/ou une diminution de la dépense énergétique conduisent à une balance énergétique excédentaire et par conséquent à une augmentation de l'adiposité et de la masse corporelle. A l'inverse, une réduction de la prise alimentaire et/ou une augmentation de la dépense énergétique conduisent à une balance énergétique déficitaire et par conséquent à une diminution de l'adiposité et de la masse corporelle. Ces deux paramètres sont maintenus stables à long terme par un système régulateur dynamique ajustant la prise alimentaire et la dépense énergétique de manière à éviter l'émaciation ou l'obésité (d'après Bertile, 2000).

1- DE LA THEORIE LIPOSTATIQUE A LA DECOUVERTE DE LA LEPTINE

L'assimilation, le stockage et l'utilisation de l'énergie issue des nutriments constituent un système homéostatique essentiel à la vie. Pour la majorité des animaux, la dépense énergétique est continue alors que les apports alimentaires sont ponctuels, impliquant la nécessité d'un système tampon d'accumulation / libération d'énergie. Chez les vertébrés, la capacité à stocker des quantités suffisantes de triglycérides (réserves à haute densité énergétique) dans le tissu adipeux assure leur survie lors de longues périodes de restriction alimentaire. Cependant, un excès de tissu adipeux peut être préjudiciable à l'animal, et un système physiologique complexe s'est développé pour réguler les réserves adipeuses et la balance énergétique (Friedman & Halaas, 1998).

Une "*théorie lipostatique*" a été proposée en 1953 par Kennedy pour expliquer comment un niveau d'adiposité optimal pouvait être maintenu au cours de la vie adulte chez la plupart des organismes (Schwartz et coll., 1999). Cette théorie mettait en jeu une boucle de rétrocontrôle reliant le tissu adipeux blanc et le cerveau. Plus précisément, un facteur issu du tissu adipeux aurait pour fonction d'informer le système nerveux central de l'état des réserves énergétiques corporelles. En réponse, des variations appropriées de la prise alimentaire, de la dépense énergétique ou de l'utilisation différentielle des nutriments seraient engendrées afin de maintenir l'homéostasie énergétique (voir figure 1). Des expériences ultérieures (union en parabiose de souris obèses avec des souris sauvages) ont confirmé cette théorie (Coleman & Humel, 1969 ; Coleman, 1973). Elles ont suggéré l'existence d'un facteur de satiété, ou facteur lipostatique, circulant dans le courant sanguin, qui serait impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et de la masse corporelle.

En 1994, Zhang et coll. ont identifié le gène *ob*, dont la mutation est responsable chez la souris d'une obésité sévère due à une hyperphagie et à un hypométabolisme. Cette mutation est aussi associée à d'autres dysfonctionnements comme l'infertilité. La protéine codée par le gène *ob* a été caractérisée l'année suivante par Halaas et coll. (1995), et baptisée "*leptine*", du grec "*leptos*" : mince. En effet, après avoir administré cette hormone à des souris *ob/ob*, ils ont constaté une réduction de la masse corporelle et de l'adiposité ainsi qu'une normalisation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Parallèlement, la fertilité de ces animaux était restaurée. La leptine (LEP) s'est avérée être le premier facteur lipostatique connu, faisant le lien entre la variation de la masse adipeuse et le contrôle de la prise alimentaire.

2- RAPPELS SUR LA LEPTINE

Le gène *ob* (ou gène LEP) a été cloné chez de nombreuses espèces parmi lesquelles l'homme, la souris, le rat, le mouton, la vache, le porc, le chien, le macaque Rhésus, le poulet et la dinde. La forte conservation de séquence suggère que la leptine aurait des fonctions ou des mécanismes d'action similaires parmi ces espèces (Ashwell et coll., 1999a).

2.1- CHEZ LES MAMMIFERES

2.1.1- Lieu de synthèse, structure, et récepteur de la leptine

La leptine est synthétisée majoritairement dans le tissu adipeux et à des degrés moindres dans le muscle, le cœur, le placenta, l'épithélium gastrique et l'ovaire (Cioffi et coll., 1997 ; Considine & Caro, 1997 ; Harris, 2000). Après clivage d'une séquence-signal (21 acides aminés), elle est sécrétée dans le sang sous la forme d'un peptide de 16 kD, constitué de 146 acides aminés (Zhang et coll., 1994).

Le récepteur de la leptine, dont il existe plusieurs formes, est présent dans de nombreux tissus : hypothalamus, plexus choroïde, rein, foie, tissu adipeux, muscles squelettiques, pancréas et poumon (Baile et coll., 2000), reflétant l'action à la fois périphérique et centrale de cette hormone.

2.1.2- Régulation

Les concentrations en leptine plasmatique dépendent principalement du niveau d'adiposité et des variations de la balance énergétique (Considine & Caro, 1997) : sur le long terme, la leptinémie est corrélée positivement à la masse adipeuse, et à court terme elle diminue en réponse à un déficit énergétique. Elle varie aussi selon l'âge et le sexe, lors d'une exposition au froid et au cours du cycle nyctéméral (Ahrén et coll., 1997). En outre, l'expression du gène LEP est régulée par différentes hormones, impliquées ou non dans la régulation énergétique (voir figure 2) : l'insuline, les glucocorticoïdes et les œstrogènes stimulent la synthèse de leptine, alors que les hormones thyroïdiennes, la testostérone et l'hormone de croissance l'inhibent (Considine & Caro, 1997 ; Baile et coll., 2000).

2.1.3- Fonctions

La leptine possède de nombreuses fonctions, principalement liées à l'homéostasie énergétique (Baile et coll., 2000 ; Reidy & Weber, 2000 ; voir figure 2).

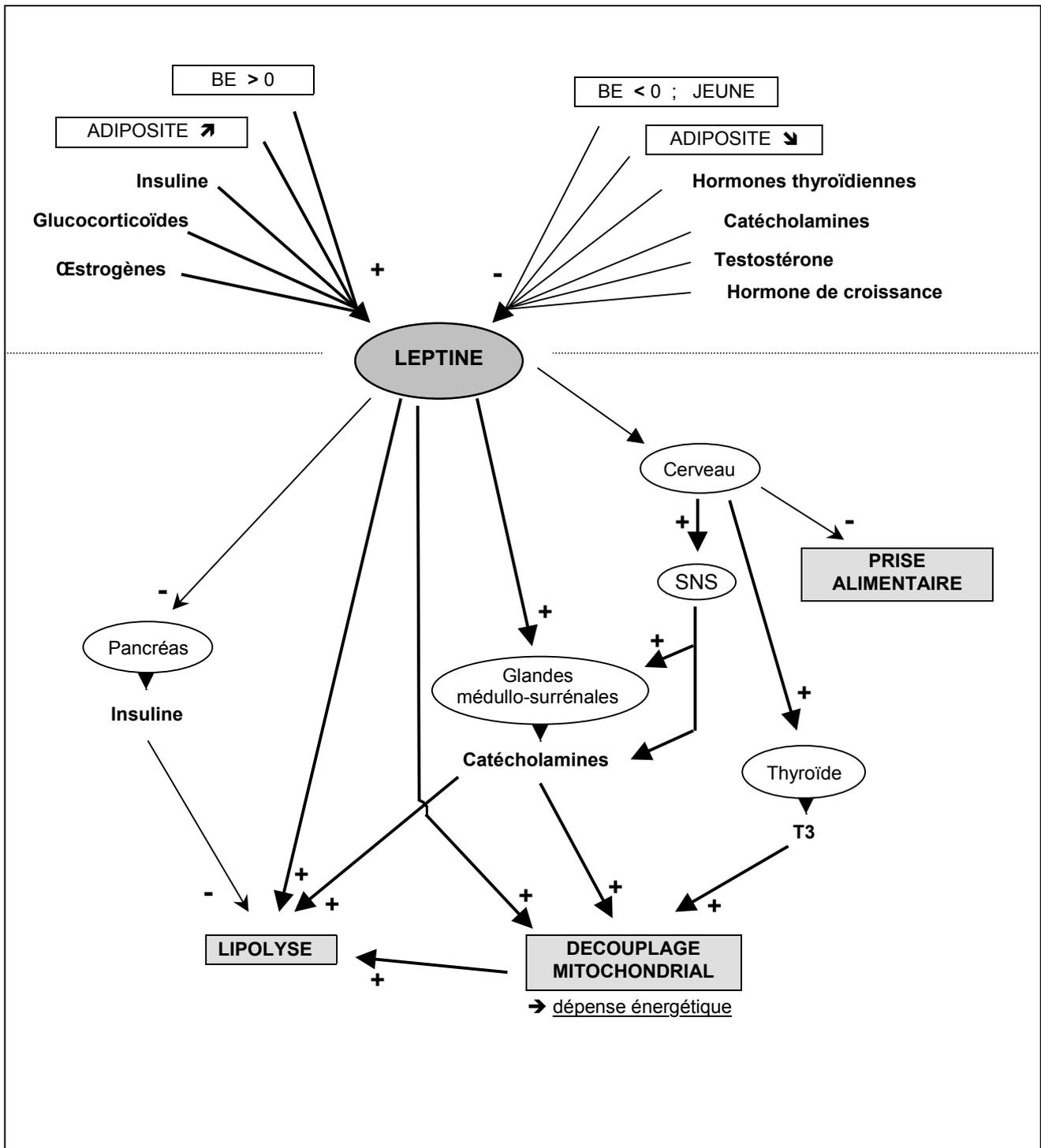


Figure 2. Facteurs de régulation de la leptine et implication de cette hormone dans le métabolisme énergétique chez les mammifères (d'après Reidy & Weber, 2000).

BE : balance énergétique ; **SNS** : système nerveux sympathique ; **T3** : triiodothyronine ;
+ : stimulation ; **-** : inhibition

Son rôle premier est d'informer le système nerveux central sur l'état des réserves adipeuses (Considine & Caro, 1997), mais elle est aussi un témoin de la balance énergétique (Flier, 1998). La leptine participe à la régulation de la masse corporelle, via des récepteurs centraux et périphériques, en diminuant la prise alimentaire et en augmentant les dépenses énergétiques (Friedmann & Halaas, 1998). Cette hormone stimule aussi la lipolyse, l'oxydation des acides gras et le découplage mitochondrial (Reidy & Weber, 2000), et inhibe la glycogénolyse hépatique (ce qui s'accompagne d'une augmentation de l'oxydation des graisses dans cet organe ; Schwartz et coll., 1999).

Par ailleurs, la leptine est impliquée dans les fonctions de reproduction (Paolisso et coll., 1998 ; Schneider et coll., 2000) ainsi que dans la réponse inflammatoire et surrénalienne (Harris, 2000).

Enfin, elle joue un rôle fondamental dans l'*adaptation neuro-endocrinienne au jeûne*, qui pourrait être la fonction primaire pour laquelle la molécule s'est développée (Ahima & Flier, 2000b). Une baisse de la leptinémie est observée dès les premiers jours du jeûne (Ahima et coll., 1996, 2000a ; Groscolas et coll., 1998 ; Bertile, 2000 ; Frühbeck et coll., 2001), et cette chute serait un signal initiant la réponse physiologique au jeûne, incluant entre autres la limitation de la procréation et la réduction de la thermogénèse, autant d'éléments propres à améliorer la survie lors d'une restriction alimentaire prolongée (Ahima et coll., 1996). De plus, l'administration de leptine chez la souris annule les effets immunosuppresseurs observés lors d'une telle restriction (Lord et coll., 1998).

2.2- CHEZ LE POULET

2.2.1- Lieu de synthèse, structure, et récepteur de la leptine

L'existence du gène LEP chez le poulet, bien que supposée dès 1994 (Zhang et coll.), n'a été mise en évidence qu'en 1998 (Taouis et coll.). Si la séquence de ce gène montre une séquence proche de celle des mammifères (80 % d'homologie en moyenne, plus de 90 % avec la souris ; Ashwell et coll., 1999a), la protéine circulante présente toutefois des différences structurales : elle comporte un acide aminé de moins (soit 145), et 3 cystéines au lieu de 2 (Taouis et coll., 1998 ; Ashwell et coll., 1999a). Cette deuxième particularité pourrait avoir un impact majeur sur la conformation de la molécule (Dridi et coll., 2000b).

Chez le poulet, le gène LEP est exprimé non seulement dans le tissu adipeux, mais aussi et surtout dans le foie, ce qui peut être associé au rôle important de cet organe dans la lipogénèse chez les volailles (Taouis et coll., 1998 ; Ashwell et coll., 1999a). De plus, le foie

semble répondre plus que le tissu adipeux à la régulation hormonale de la leptine (Richards et coll., 1999).

Comme chez les mammifères, le récepteur de la leptine présente une large distribution dans l'organisme : hypothalamus, foie, rein, intestin, ovaire (Ohkubo et coll., 2000) et pancréas (Benomar et coll., 2000).

2.2.2- Régulation

L'étude des rôles et de la régulation de la leptine chez le poulet est très récente, et montre de fortes similitudes avec ce qui est connu chez les mammifères (voir figure 3).

Le contrôle hormonal de la synthèse de leptine chez le poulet présente cependant quelques différences (quant à l'effet de l'hormone de croissance et des œstrogènes) : l'insuline, la corticostérone et l'hormone de croissance ont un effet stimulant, le glucagon et les œstrogènes ont un effet inhibiteur (Ashwell et coll., 1999a,b).

Lors d'un jeûne de 16 à 24 h, l'expression du gène LEP et la leptinémie diminuent ; elles retrouvent des niveaux comparables après quelques jours de réalimentation (Dridi et coll., 2000b ; Sato et coll., 2000).

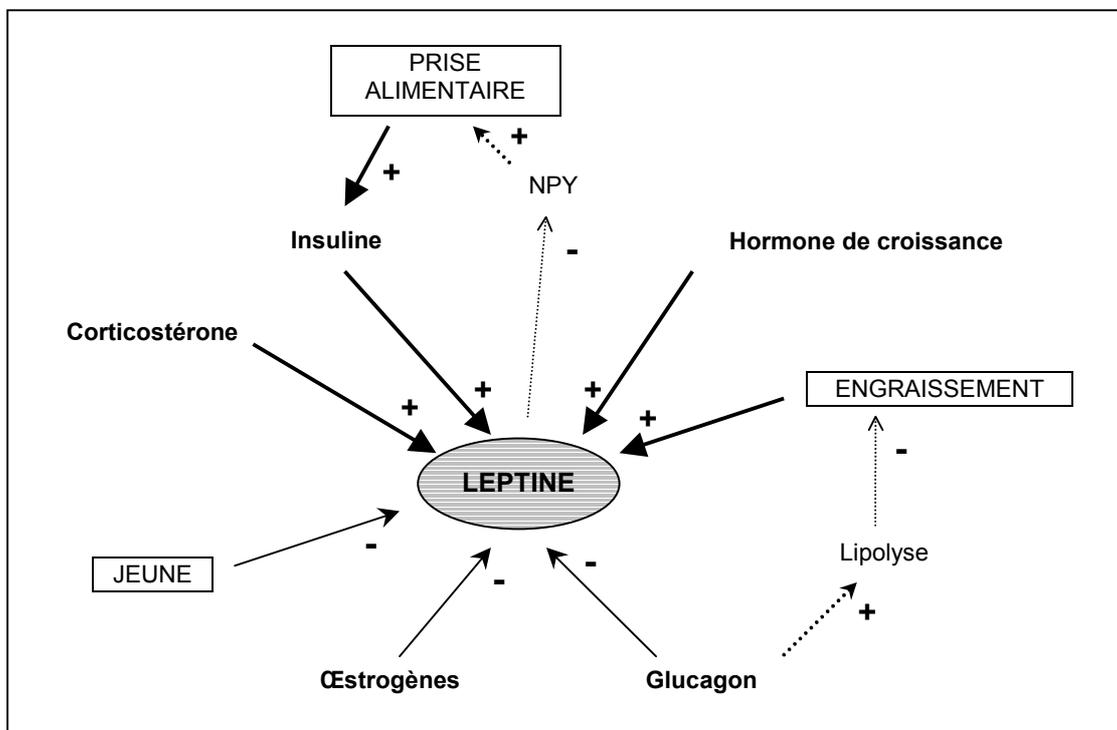


Figure 3. Facteurs de régulation de la leptine chez le poulet.

NPY : neuro-peptide Y ; + : stimulation ; - : inhibition

2.2.3- Fonctions

La leptine semble être un élément majeur du métabolisme nutritionnel et énergétique chez le poulet (Ohkubo et coll., 2000).

Son administration (intra-veineuse, intra-péritonéale ou intra-cérébroventriculaire) entraîne une **réduction de la prise alimentaire** chez le poulet (Raver et coll., 1998 ; Denbow et coll., 2000, Dridi et coll., 2000a). L'insuline, l'hormone de croissance, le glucagon et les œstrogènes ont déjà été impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire (chez les mammifères et les oiseaux), et l'action de ces hormones pourrait être liée à la leptine. Comme chez les mammifères, la leptine régulerait la prise alimentaire *via* l'hypothalamus, mais son mode d'action reste encore à préciser (Cassy et coll., non publié). Ce contrôle de la prise alimentaire par la leptine serait plus fin chez les oiseaux par rapport aux mammifères (Ashwell et coll., 1999b).

Enfin, les œstrogènes seraient impliqués dans la régulation de l'expression d'un récepteur à la leptine dans l'intestin, ce qui suggère un rôle de la leptine dans les relations entre les fonctions gonadiques et métaboliques chez les oiseaux (Ohkubo et coll., 2000).

2.3- CHEZ LES ANIMAUX SAUVAGES

Globalement, nos connaissances sur la leptine dérivent essentiellement de travaux réalisés chez l'homme et l'animal de laboratoire ou d'élevage. Quelques études ont cependant été effectuées chez des mammifères sauvages (en captivité ou dans leur milieu) : l'écureuil arctique (Ormseth et coll., 1996 ; Boyer et coll., 1997), la chauve-souris (Widmaier et coll., 1997 ; Kronfeld-Schor et coll., 2000), le chien viverin et le renard polaire (Nieminen et coll., 2001).

Elles ont confirmé d'une part l'action de cette hormone dans le contrôle de la prise alimentaire et de la masse corporelle (Ormseth et coll., 1996 ; Boyer et coll., 1997), et d'autre part la chute de la leptinémie lors d'un jeûne court (Widmaier et coll., 1997). Ces études permettent aussi de suggérer que la leptinémie varie selon l'état reproducteur et la concentration circulante des hormones thyroïdiennes (Widmaier et coll., 1997 ; Nieminen et coll., 2001), et qu'il existerait chez la chauve-souris une résistance à la leptine lors de l'engraissement pré-hibernatoire (Kronfeld-Schor et coll., 2000). Cependant, aucune étude n'a été réalisée chez un oiseau sauvage, et on ne sait rien sur le rôle de la leptine lors d'un jeûne naturel de longue durée.

3- LE MANCHOT ROYAL : UN ANIMAL DE CHOIX POUR L'ETUDE DES INTERRELATIONS ENTRE RESERVES ENERGETIQUES , COMPORTEMENT ALIMENTAIRE ET REPRODUCTION

Le manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*) est un oiseau des zones subantarctiques naturellement soumis, au cours de son cycle annuel, à des périodes de jeûne prolongé. En effet, alors qu'il se nourrit exclusivement en mer, il doit pour muer et se reproduire effectuer plusieurs séjours à terre durant lesquels il est contraint de vivre sur ses réserves énergétiques, notamment adipeuses, qui présentent donc de fortes variations annuelles spontanées (Groscolas, 1990). Ceci est reflété par des fluctuations de masse corporelle allant presque du simple au double (entre 9 et 16 kg).

Lors de la reproduction, mâles et femelles sont à terre et jeûnent pendant la formation des couples et pendant l'incubation de l'œuf, qui dure au total 54 jours. Les deux sexes se partageant les tâches d'incubation, chaque partenaire alterne des périodes de jeûne à terre et d'alimentation en mer d'une quinzaine de jours en moyenne. Mais le premier épisode de jeûne du mâle atteint et même dépasse un mois puisqu'à la période de formation du couple (de l'arrivée à terre à la ponte, soit environ 12 jours) succède le début d'incubation. La masse corporelle diminue alors de 14 à 10, voire 9 kg. Des travaux récents (Gauthier-Clerc et coll., 2001 ; Robin et coll., sous presse) montrent qu'il y a une relation étroite entre masse corporelle – et donc réserves énergétiques – et activité de reproduction. En effet, les animaux ne s'engagent pas dans la reproduction s'ils ont une masse corporelle inférieure à 12,5 kg, alors qu'à l'inverse, ils abandonnent leur reproduction si le jeûne induit une baisse de la masse corporelle en- dessous de 9 kg. Il existe donc un contrôle de l'activité locomotrice dans lequel interviennent les réserves énergétiques, mais on ignore presque tout de la nature de ce contrôle.

D'un point de vue physiologique, le **jeûne d'incubation du manchot** peut se découper en trois phases, caractérisées par des modifications métaboliques et hormonales (Cherel et coll., 1988a,b ; voir figure 4, page suivante) :

- la phase I (post-absorptive) est une phase rapide d'adaptation au jeûne, avec diminution progressive de la vitesse d'amaigrissement, réduction du catabolisme protéique et activation de la mobilisation des réserves lipidiques. Les concentrations plasmatiques en acide urique (AU), acides gras non estérifiés (AGNE) et corticostérone diminuent légèrement.
- la phase II correspond à un état métabolique stable caractérisé par une épargne des protéines

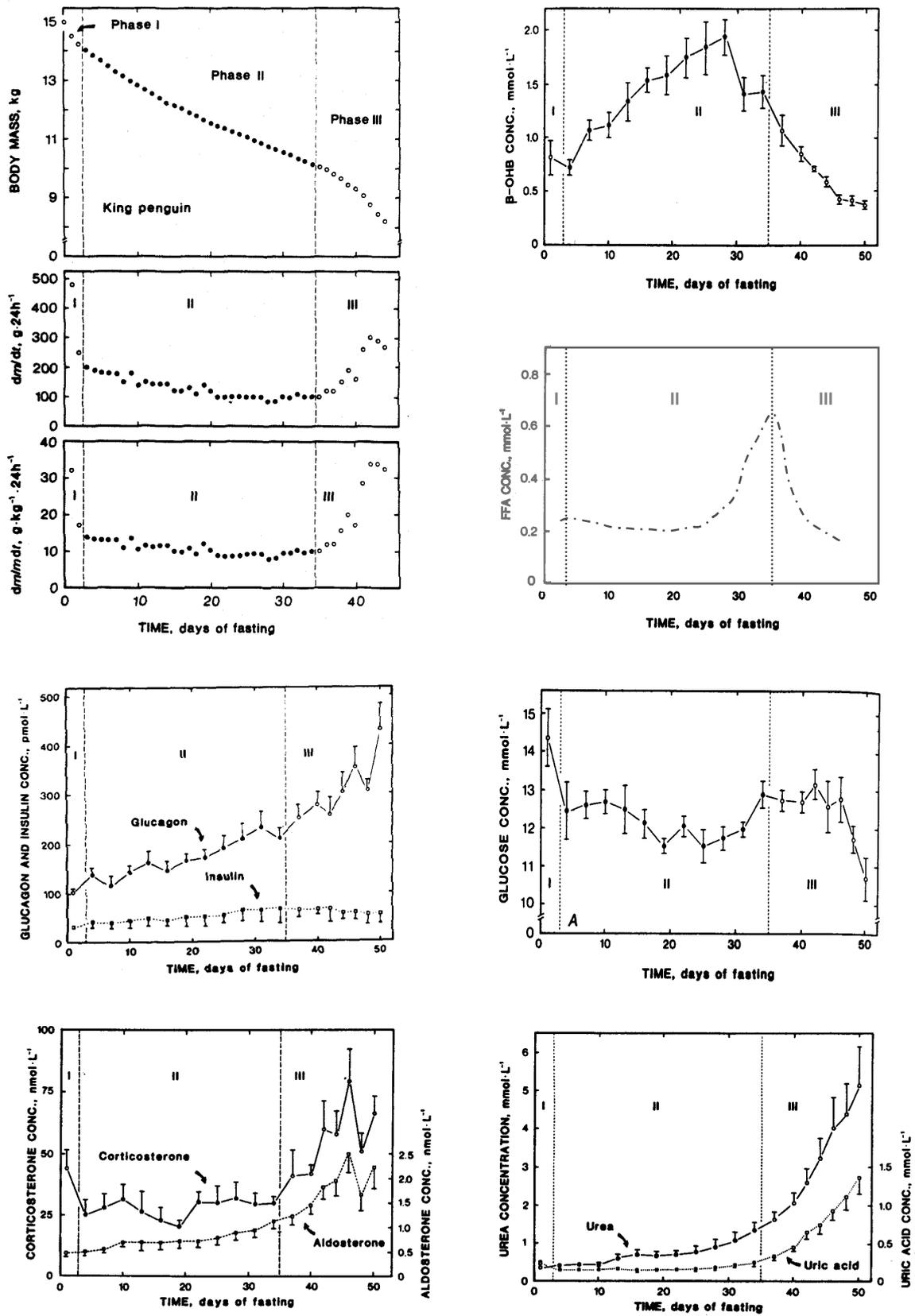


Figure 4. Principales variations physiologiques au cours du jeûne de reproduction chez le manchot royal (d'après Cherel et coll., 1988a,b). Sont données, en fonction de la durée du jeûne (TIME, days of fasting) : la masse corporelle (BODY MASS) et sa diminution quotidienne (dm/dt et dm/mdt), les concentrations plasmatiques en glucagon, insuline, corticostérone, aldostérone, et celles en β -hydroxybutyrate (β -OHB), acides gras non estérifiés (FFA), glucose, urée et acide urique. Valeurs = moyennes \pm ESM.

corporelles et une mobilisation préférentielle des réserves lipidiques. La vitesse d'amaigrissement est alors minimale et constante, tout comme les concentrations en AU, AGNE et corticostérone.

- la phase III est une phase finale survenant après un épuisement critique mais non total des réserves lipidiques ; elle est marquée par une accélération progressive du catabolisme protéique et par une augmentation de la vitesse d'amaigrissement. Les concentrations plasmatiques en AU, corticostérone et glucagon s'élèvent rapidement alors que celles en prolactine et β -hydroxybutyrate chutent.

La **transition métabolique phase II – phase III** s'accompagne de changements comportementaux, tels que l'augmentation de l'activité locomotrice (Robin et coll., 1998) et l'abandon de l'œuf chez le couveur (Groscolas et coll., 2000). L'ensemble de ces observations a conduit à émettre l'hypothèse, maintenant bien fondée, de l'existence d'un **signal de réalimentation** endogène qui réoriente l'activité de l'animal vers la recherche alimentaire aux dépens de l'incubation. Parmi les composantes de ce signal, diverses hormones telles la corticostérone et la prolactine semblent impliquées (Groscolas & Robin, 2001). En l'état actuel de nos connaissances sur la régulation à long terme de la balance énergétique et du comportement alimentaire, d'autres hormones pourraient intervenir, la leptine étant un candidat de choix.

L'étude des modifications métaboliques et hormonales associées à la transition phase II – phase III pourrait donc apporter des informations intéressantes sur cette régulation. Dans ce contexte, le manchot royal apparaît comme un **animal particulièrement approprié** et commode. En effet, il tolère sans préjudice une phase III de longue durée (alors qu'elle atteint seulement 48 heures chez le rat, elle peut dépasser 10 jours chez le manchot ; Cherel et coll., 1988), ce qui offre à l'expérimentateur un important laps de temps pour intervenir. D'autre part, grâce à ses particularités biologiques mais aussi du fait de sa grande tolérance vis à vis de l'homme, le manchot royal est un des rares animaux sauvages sur lesquels il est possible d'obtenir des données physiologiques sur de longues périodes alors qu'ils évoluent dans leur milieu naturel.

En plus d'apporter une compréhension spécifique des mécanismes d'adaptation à l'environnement subantarctique et antarctique, l'étude de la physiologie et de l'endocrinologie du jeûne et du comportement alimentaire chez les manchots est donc susceptible de fournir des informations générales sur le contrôle à long terme de la balance énergétique, dont la connaissance est fondamentale pour comprendre les dysfonctionnements associés aux pathologies métaboliques comme l'obésité.

4- OBJECTIFS DE L' ETUDE

Ce travail avait pour but de déterminer si la leptine joue un rôle dans les interrelations entre réserves énergétiques et comportement alimentaire chez le manchot royal, et plus spécifiquement si elle intervient dans le signal de réalimentation. Au préalable, il convenait de vérifier l'existence de cette hormone chez le manchot royal.

La première partie de notre étude visait donc à déterminer si chez cette espèce, comme chez le poulet, le gène LEP est exprimé dans le tissu adipeux et le foie, voire dans d'autres tissus, en utilisant la technique de RT-PCR suivie d'un Southern Blot. Ensuite, nous avons vérifié que les fragments d'ADNc amplifiés par RT-PCR correspondaient bien à la leptine, en les clonant puis en les séquençant. Enfin, nous avons recherché directement la présence de la protéine dans les tissus considérés, par Western Blot.

La deuxième partie de notre étude examinait le rôle potentiel de la leptine dans le signal de réalimentation. Un tel rôle peut être suspecté si la leptinémie varie lorsque ce signal se déclenche. Nous avons donc tenté de mesurer le niveau circulant de la leptine en appliquant au manchot royal, après validation, un dosage radio-immunologique mis au point chez le poulet (Dridi et coll., 2000). La leptinémie a été dosée au moment de l'abandon de l'œuf et comparée à celle d'animaux en début et en fin d'un épisode normal d'incubation, soit au moment de la relève par le partenaire dans ce dernier cas. Il nous a paru intéressant de travailler aussi sur des animaux à jeun mais non couveurs afin de discriminer l'effet du jeûne seul de celui de la reproduction. En effet, chez des couveurs, les variations éventuelles de la leptinémie peuvent être dues à la fois au jeûne (réduction des réserves énergétiques) et à la reproduction (par exemple variations hormonales liées à l'incubation). Chez les non couveurs, les variations éventuelles de la leptinémie peuvent être plus spécifiquement reliées à celles des réserves énergétiques.

DEUXIEME PARTIE :

MATERIEL ET METHODES

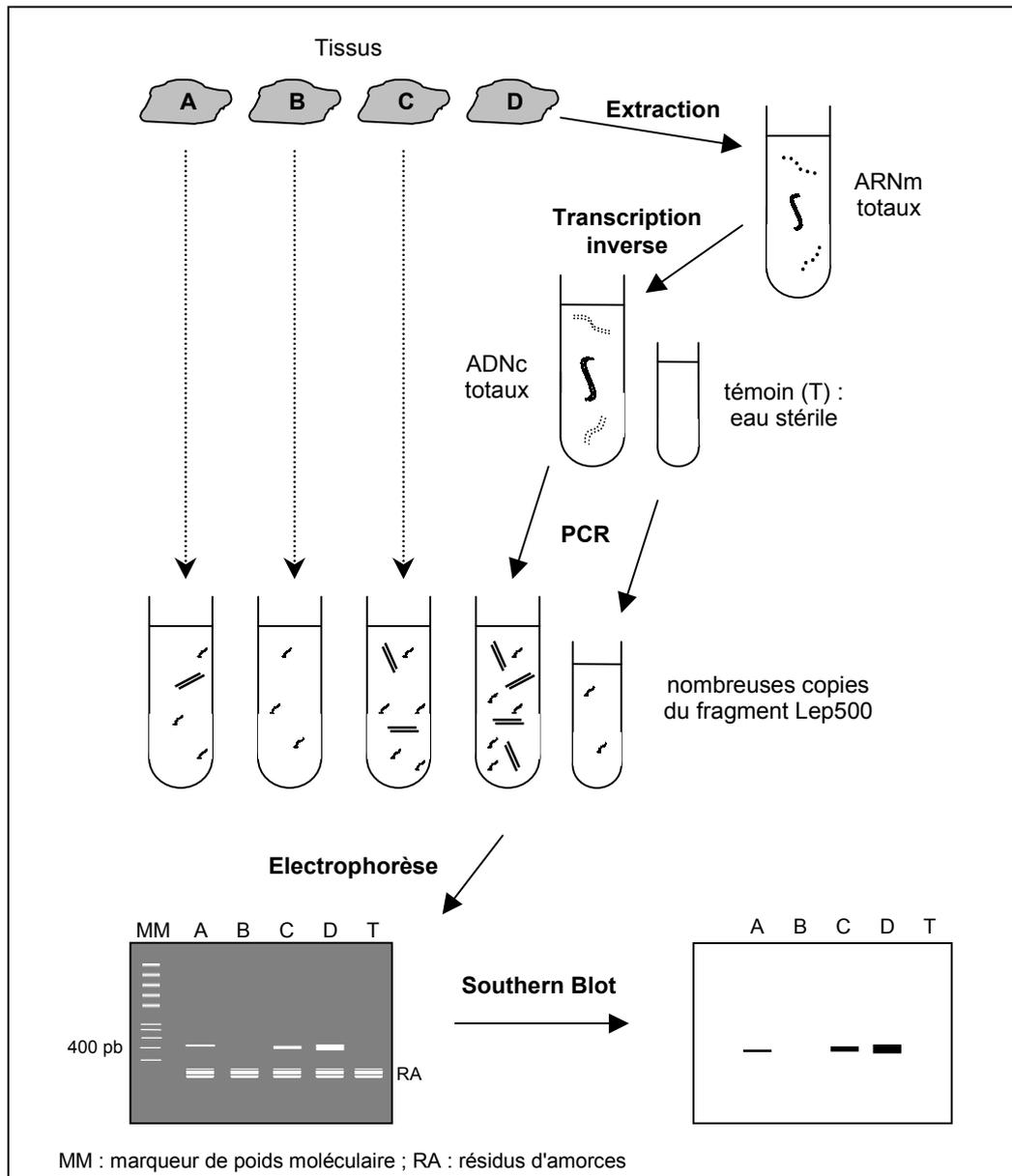


Figure 5. Recherche de l'expression du gène LEP.

Principe : Il s'agit de rechercher la présence d'ARNm LEP dans différents tissus. Une première étape, l'extraction permet d'obtenir l'ensemble des ARN présents dans un tissu (ARNm LEP ainsi que de nombreux autres). La transcription inverse (RT) assure la synthèse de fragments d'ADN complémentaires à ces ARN totaux. Puis l'amplification (PCR), grâce à des amorces spécifiques, donne de nombreuses copies de fragments d'ADNc LEP. Les amorces utilisées amplifient un fragment de 410 pb chez le poulet. Ce sont donc des fragments d'une taille similaire qui ont été recherchés par la suite chez le manchot royal, compte tenu de la forte conservation de la séquence du gène LEP entre taxons (et a fortiori au sein d'une même classe). L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de visualiser le résultat de l'amplification (présence ou absence de fragments d'ADNc LEP). Le Southern Blot permet de mieux discerner les différences d'expression par renforcement du signal. De plus, seules les bandes spécifiques (ADNc LEP) sont ainsi mises en évidence.

Appliquée en parallèle à plusieurs tissus, cette procédure permet de comparer l'intensité de l'expression dans chacun d'eux. Pour quantifier ces différences d'expression, on amplifie des fragments d'ADNc correspondant à l'ARN ribosomique 18S (dont l'expression est constante d'un tissu à l'autre) puis pour un même tissu, on calcule le ratio (en unités arbitraires) entre l'intensité des signaux Lep500 et 18S.

1- LOCALISATION DE L' EXPRESSION ET SEQUENCAGE DU GENE LEP ; CARACTERISATION DE LA LEPTINE CHEZ LE MANCHOT ROYAL

1.1- PRELEVEMENTS TISSULAIRES

Ils ont été effectués sur des manchots royaux dans la colonie de la Baie du Marin, sur l'Ile de la Possession (Archipel de Crozet ; 46°25' S, 51°45' E), lors des campagnes d'été 1999-2000 et 2000-2001.

Des échantillons de tissu adipeux sous-cutané ont été obtenus par biopsie (incision cutanée sous anesthésie générale au zolétil) chez 2 manchots royaux adultes, non reproducteurs, en début de jeûne.

Des échantillons de tissu adipeux sous-cutané (TASC), de foie, de muscles de la patte, du cou et des pectoraux ont été obtenus chez un poussin sacrifié à l'âge de 15 jours (nourri quotidiennement) et chez un poussin sacrifié à l'âge de 1,5 mois, quelques jours après son émancipation thermique (nourri épisodiquement).

Des échantillons de TASC, de tissu adipeux intra-abdominal (TAIA), de foie, d'intestin, de muscle pectoral, de cœur, de rein, de poumon et de cerveau ont été obtenus, dans cet ordre, chez 2 individus sacrifiés, âgés d'un an. Il s'agissait de 2 poussins en fin de mue, proches de leur départ en mer et jeûnant depuis 2 semaines. Leur masse corporelle était de 11,5 et 12,2 kg.

Les échantillons tissulaires ont été prélevés dans un abri-laboratoire situé dans l'enceinte de la colonie, avec le maximum de précautions aseptiques (gants et matériel chirurgical stériles). Ils ont été aussitôt clampés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C, jusqu'à leur utilisation 6 à 12 mois plus tard.

Les animaux sacrifiés servaient parallèlement à d'autres études, les sacrifices étant réalisés sous autorisation du Comité d'Ethique de l'Institut Français pour la Recherche et la Technologie Polaires.

1.2- ETUDE DE L'EXPRESSION DU MESSAGER (ARNm) DE LA LEPTINE

Le principe et les étapes de la méthodologie utilisée sont décrits figure 5.

1.2.1- Extraction des ARN totaux

Pour chaque échantillon, 100 mg de tissu sont homogénéisés dans 2 ml de RNA-Instapure (kit EUROAGENTEC) par broyage à l'aide d'un Ultra-Turrax, selon les recommandations du fournisseur. L'addition de chloroforme suivie d'une centrifugation permet de séparer la phase aqueuse (contenant les ARN) de la phase organique et d'une interphase protéique. Les ARN sont par la suite précipités après l'addition d'isopropanol suivie d'une centrifugation. Le culot ainsi obtenu est lavé avec une solution d'éthanol 70 %. Après évaporation, chaque culot d'ARN a été remis en suspension dans 50 à 60 µl de DEPC à 1 ‰ (USB).

La concentration des ARN totaux est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre avec une lecture à 260 nm. Des dilutions sont effectuées afin d'obtenir pour chaque échantillon une solution d'ARN totaux à 1 µg/µl. La qualité des ARN est déterminée par l'estimation du ratio DO 260 nm / DO 280 nm (≤ 2), et sur gel d'agarose.

1.2.2- Transcription inverse (RT)

A 1 µg d'ARN totaux dénaturés (65°C, 5 min) sont ajoutés 1 µl d'amorces "random hexamer" (PROMEGA) et 1 µl de dNTP (20 mM, SIGMA), pour un volume total de 16,5 µl. Cette solution est portée à 75°C pendant 10 min. 1 µl de reverse-transcriptase AMV (SIGMA), 2 µl de tampon AMV (SIGMA), et 0,5 µl d'inhibiteur de RNases (RNA Guard, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) sont ensuite ajoutés. La réaction de RT est réalisée à 42°C pendant 50 min après une incubation de 15 min à 25°C afin de favoriser l'hybridation des amorces.

1.2.3- Amplification par PCR

La PCR est effectuée sur 2 µl de produit de RT dans un volume final de 50 µl, en présence de 1 UI de Taq polymérase (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH), de dNTP (20 nmol, SIGMA) et d'amorces sens (Lep500 S) et anti-sens (Lep500 AS) (SIGMA-GENOSYS) spécifiques du gène LEP de poulet (encadrant une région de 410 pb). Elle a été accomplie en 35 cycles, dont les paramètres étaient : 30 sec à 94°C, 30 sec à 60°C, 30 sec à 72°C. La même réaction a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques à l'ARNr 18S à la place des amorces LEP.

1.2.4- Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour chaque échantillon, 9 µl de produit de PCR ont été mélangés avec 1 µl de Bleu d'ADN (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 %, glycérol 30 %) puis déposés dans un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (BET, BIO-RAD) ou de Vistra Green (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). La taille des fragments d'ADNc amplifiés (410 pb pour

Lep500 et 550 pb pour 18S) est déterminée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder 200 lanes, EUROGENTEC).

Les gels colorés au bromure d'éthidium sont révélés sous ultra-violet alors que ceux colorés au Vista Green sont révélés par un Storm Imager 840 (MOLECULAR DYNAMICS).

1.2.5- Southern Blot sur les produits de PCR

Les fragments d'ADNc ayant migré dans le gel d'agarose - BET sont dénaturés à l'aide d'une solution alcaline, transférés par capillarité sur une membrane nylon Hybond-N+ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH), puis hybridés avec une amorce PEPM marquée au ³³P (l'amorce PEPM est localisée entre les deux amorces Lep500 (S et AS) qui ont servi pour la PCR). La radio-activité est par la suite mesurée grâce au Storm Imager 840.

1.3- CARACTERISATION DE LA PROTEINE LEP DANS LES TISSUS

1.3.1- Solubilisation des tissus

Pour chaque échantillon, 300 à 700 mg de tissu ont été homogénéisés à l'aide d'un Ultra-Turrax, dans un tampon de lyse (NaCl 150 mM, Tris Base 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, inhibiteurs de protéases et de phosphatases, détergents). Une première centrifugation (1000 g, 30 min, 4°C) permet de précipiter les débris et noyaux cellulaires. Le surnageant est soumis à une deuxième centrifugation (45000 tr/min, 45 min, 4°C). La fraction inférieure du nouveau surnageant, contenant les protéines, est prélevée. La concentration en protéines totales de chacune des fractions obtenues est déterminée à l'aide d'un dosage spectrophotométrique (Biorad Protein Assay, BIO-RAD).

1.3.2- Western Blot

Les protéines totales de chaque échantillon (75 µg) sont séparées sur un gel polyacrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose (BIO-RAD). La membrane est incubée en présence d'un anticorps primaire (sérum de lapin anti leptine de poulet, 1/1000^{ème}) pendant 16 h à 4°C, dans un tampon PBS - Tween 0,05 % - lait 5 %. Après quelques lavages, la membrane est incubée dans le même tampon, en présence d'un anticorps secondaire (sérum de chèvre anti sérum de lapin) couplé à la peroxydase, pendant 1 h à température ambiante. Après incubation (1 min) avec un substrat électro-chémi-luminescent (Super Signal West Pico, PIERCE) qui réagit avec la peroxydase, la présence de leptine est révélée par autoradio-

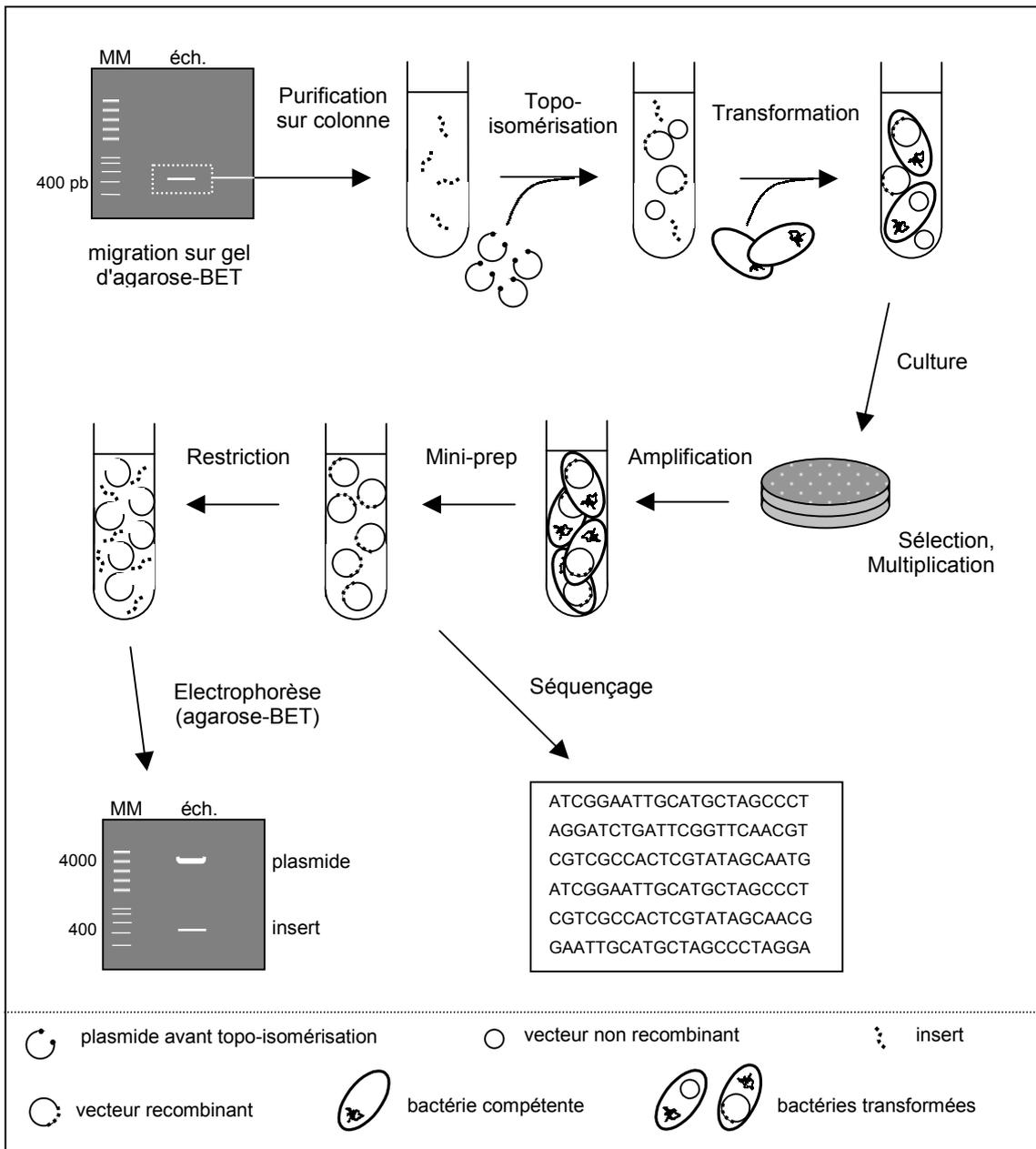


Figure 6. Séquençage du gène LEP.

Principe : pour une meilleure reproductibilité, le séquençage automatique d'un fragment d'ADN s'effectue après l'avoir inséré dans un plasmide.

A partir des fractions séparées sur gel d'agarose, la purification permet d'obtenir une solution avec uniquement des fragments d'ADNc Lep500. La topo-isomérisation consiste alors en l'insertion de ces fragments dans des plasmides (pour former des vecteurs recombinants). La transformation correspond à l'incorporation de ces vecteurs recombinants dans des bactéries compétentes. Celles-ci sont mises en culture, ce qui assure la multiplication des vecteurs. La mini-prep sert ensuite à séparer l'ADN plasmidique des ADN bactériens et des protéines bactériennes ; on obtient ainsi un produit prêt à séquencer.

La restriction permet de vérifier que les plasmides ont bien inséré le fragment d'ADN désiré. Après découpage du plasmide de part et d'autre de l'insert (par une endonucléase), une migration sur gel d'agarose est réalisée. Le plasmide seul donne une bande de haut poids moléculaire (4000 pb) alors que si l'insert est présent, on observe une deuxième bande, de faible poids moléculaire (environ 430 pb).

graphie sur un film photographique (Bio-Max, KODAK). Nous avons recherché une protéine de poids moléculaire analogue à celui de la leptine du poulet, c'est-à-dire proche de 16 kD (Taouis et coll., 1998).

1.4- SEQUENÇAGE D'UN FRAGMENT DU GENE LEP DU MANCHOT ROYAL

Le principe et les étapes de la méthodologie utilisée sont décrits figure 6. Le séquençage a été effectué à partir des produits de PCR issus du poumon, du foie et du TAIA d'un poussin d'un an en mue.

1.4.1- Purification

Les produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose et les bandes d'ADNc désirées sont ensuite découpées puis solubilisées. La purification est effectuée avec le kit QIAquick gel extraction (QIAGEN), en se conformant aux instructions du fabricant.

1.4.2- Topo-isomérisation et transformation

Ces réactions ont été effectuées avec le kit Topo TA Cloning (INVITROGEN), suivant les instructions du fabricant.

2 µl de produit de purification (ADNc LEP) sont mélangés à 10 ng du plasmide (Topo-vector 2.1), pour un volume final de 5 µl, et laissés 5 min à température ambiante.

2 µl de cette solution sont additionnés à 50 µl de bactéries compétentes (*Escherichia coli* Top10F') et l'ensemble est incubé à 4°C pendant 30 min. Un choc thermique (42°C, 30 sec) assure la transformation des bactéries. Après 30 min à 37°C dans 250 µl de milieu nutritif, les bactéries sont étalées sur des boîtes de pétri contenant un milieu solide de Luria-Bertani. Ce milieu contient de l'ampicilline (50 mg/l), et est recouvert avec 20 µl d'IPTG (0,2 M) et 20 µl d'X-Gal (10 %). Les boîtesensemencées sont mises en culture à 37°C pendant 16h. Les caractéristiques des plasmides et du milieu de culture permettent la sélection des colonies de bactéries hébergeant un plasmide avec insert : elles apparaissent de couleur blanche (les bactéries hébergeant un plasmide sans insert forment des colonies de couleur bleue). Les colonies sélectionnées sont prélevées et mises en culture 24 h à 37°C dans un milieu liquide de Luria-Bertani enrichi en ampicilline (150 mg/l) puis conservées à 4°C.

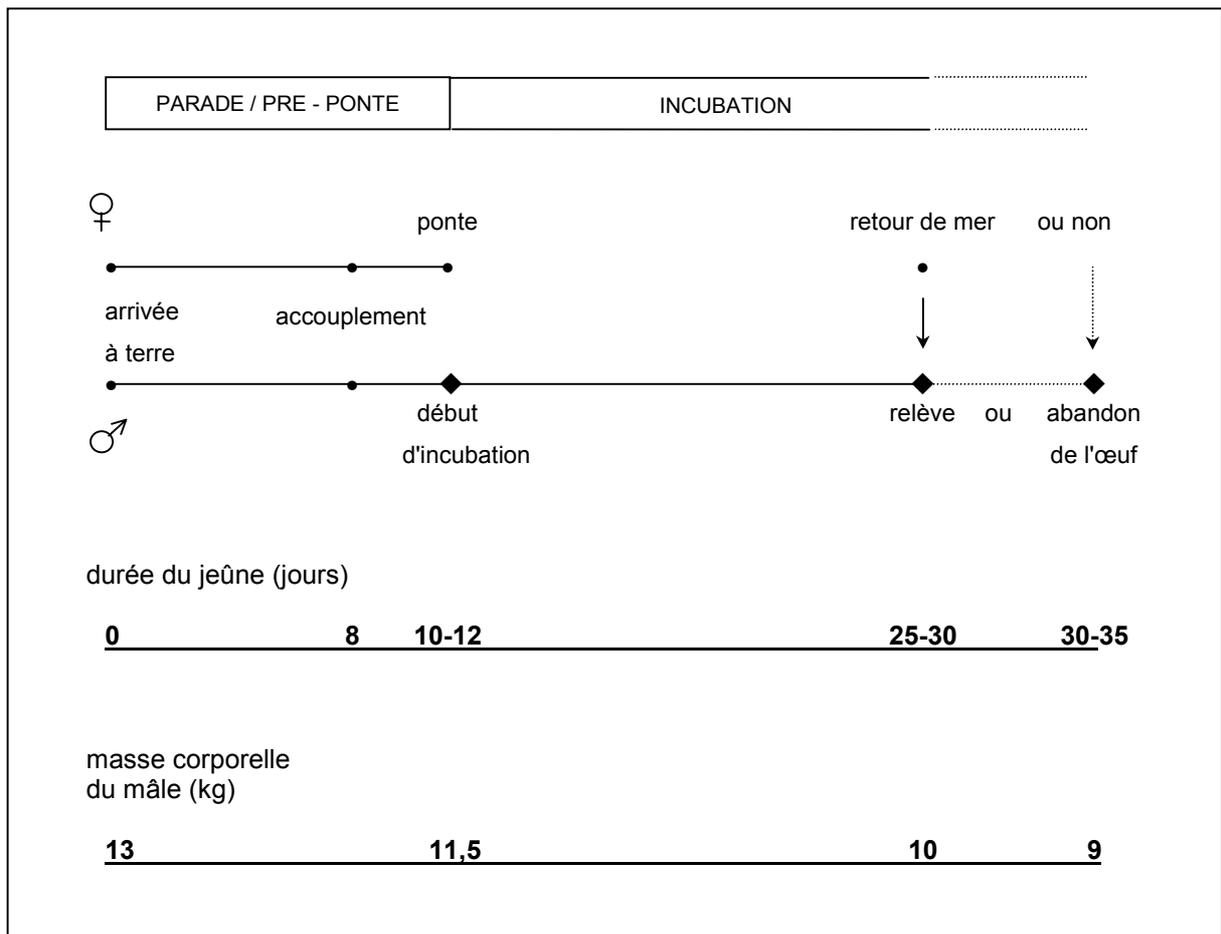


Figure 7. Jeûne de reproduction chez le manchot royal.

Dès l'arrivée à terre (début du jeûne) a lieu la recherche d'un partenaire et la parade qui dure environ une semaine. Une fois formé, le couple choisit un emplacement dans la colonie où la femelle pondra un œuf unique, quelques jours plus tard. Rapidement (en l'espace de quelques heures), elle va le confier au mâle et partir se nourrir en mer. Ainsi le mâle va assurer le début de l'incubation jusqu'au retour de la femelle (relève) une quinzaine de jours plus tard. Celle-ci va assurer un deuxième épisode d'incubation en attendant la relève du mâle, et ainsi de suite jusqu'à l'éclosion qui se produit vers le 54^{ème} jour d'incubation. Il arrive dans certains cas que la relève tarde à se faire : l'adulte couveur (dans notre exemple, le mâle lors du premier épisode d'incubation) entre alors dans une phase critique d'utilisation de ses réserves énergétiques, ce qui aboutit à l'abandon de l'œuf.

Seul le premier épisode de jeûne est présenté sur la figure. Les données concernant la durée du jeûne et la masse corporelle se rapportent uniquement au mâle, et sont indicatives. Les losanges indiquent les stades auxquels les prises de sang ont été réalisées.

1.4.3- Mini-prep

Elle a été effectuée avec le kit QIAprep miniprep (QIAGEN), suivant les instructions du fabricant. Les tubes de culture sont centrifugés. Le culot est resuspendu puis soumis à une lyse alcaline. Après neutralisation du pH, les déchets du lysat sont séparés par centrifugation. Le surnageant est passé sur colonne de silice afin de retenir l'ADN plasmidique, qui sera par la suite élué dans du tampon Tris-Cl (10 mM, pH 8,5).

1.4.4- Restriction

A 5 µl des produits de miniprep (plasmides comportant l'insert) sont additionnées 2 UI d'enzymes de restriction (Eco-RI, ROCHE) dans un volume final de 50 µl. L'ensemble est placé à l'étuve (37°C) pendant 1 h. La restriction est vérifiée sur gel d'agarose coloré au BET.

1.4.5- Séquençage

La région du plasmide comprenant l'insert a été séquencée avec un séquenceur automatique ABI (PERKIN ELMER).

2- VARIATION DE LA LEPTINEMIE EN FONCTION DE L'ETAT METABOLIQUE AU COURS DU JEUNE

2.1- TRAITEMENT DES ANIMAUX

2.1.1- Jeûne d'incubation (dans la colonie puis en parc)

Trois stades ont été définis : le début d'incubation, la relève (fin normale d'incubation), et l'abandon de l'œuf (voir figure 7).

Aux deux premiers stades, les prises de sang ont été effectuées chez des animaux en liberté dans la colonie. Seuls des mâles en premier épisode d'incubation ont été utilisés pour éviter toute variabilité liée au sexe ou au degré d'avancement de l'incubation. Rappelons que ce premier épisode d'incubation concerne en gros les 15 premiers jours suivant la ponte, celle-ci ayant lieu alors que les mâles jeûnent déjà depuis 8-10 jours environ.

Début d'incubation. Des couples cantonnés (jours précédant la ponte) ont été marqués au bleu de Nil puis observés quotidiennement pour déterminer la date de la ponte. Dès qu'un individu du couple était vu seul et en train de couvrir il était bagué. Dans tous les cas il

s'agissait du mâle puisque celui-ci assume systématiquement le premier épisode d'incubation chez cette espèce.

Afin de s'assurer que l'animal était bien motivé à couvrir, et pour lui permettre de bien s'adapter à sa nouvelle situation de couveur, nous attendions le 3^{ème} jour d'incubation pour réaliser la prise de sang correspondant au stade "début d'incubation". Cette prise de sang se faisait dans la colonie, sans manipulation ou immobilisation particulière du couveur dont les facultés de déplacement sont très limitées, l'œuf étant couvé sur les pattes. Afin de ne pas perturber excessivement l'animal, aucune pesée n'était faite lors de cette prise de sang. Nous avons cependant pu déterminer la masse corporelle en début d'incubation chez un autre lot d'animaux. Le lot "début d'incubation" comprenait 12 animaux.

Relève. Par la suite, les couveurs bagués étaient observés régulièrement pour détecter le moment de la relève par le partenaire. Cette relève est brève et l'animal relevé part en mer très rapidement. De nombreuses relèves sont ainsi manquées, ce qui explique qu'un grand nombre (une cinquantaine) d'animaux ont dû être marqués en début d'incubation pour pouvoir constituer notre lot d'animaux relevés. D'autre part, il était généralement impossible de prélever à la relève un individu déjà prélevé en début d'incubation. Nos lots "début d'incubation" et "relève" sont donc constitués d'individus différents. Chez les animaux relevés, la prise de sang se faisait dans les minutes après que le couveur eut cédé l'œuf à son partenaire. Elle était aussitôt suivie d'une pesée. Le lot "relève" comprenait 14 animaux.

Abandon de l'œuf. Si l'abandon de l'œuf après atteinte d'un état critique d'épuisement des réserves énergétiques n'est pas un phénomène rare chez le manchot royal (il concerne 10 % des œufs pondus dans les années normales mais peut atteindre 60 % lors des années défavorables ; Olsson, 1995), observer un tel abandon au sein d'une colonie de plusieurs milliers d'individus et pouvoir intervenir pour faire une prise de sang sur l'animal abandonnant sans perturbation excessive des autres couveurs est très difficile. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler chez des animaux couveurs en parc. Les travaux antérieurs (Groscolas et coll., 2000) ont montré que le comportement d'incubation d'animaux couveurs mis en parc en début d'incubation est tout à fait normal. La mise en parc a comme intérêt d'empêcher la relève (le partenaire du couveur ne peut le retrouver) et donc de forcer les couveurs captifs à jeûner jusqu'à ce que le signal de réalimentation se déclenche et que se produise l'abandon de l'œuf. Nous avons donc là un moyen de réaliser assez facilement une prise de sang sur un nombre suffisant d'animaux au moment précis de l'abandon de l'œuf.

Au total 30 mâles couveurs ont été mis en parc au 3^{ème} jour d'incubation, marqués, pesés puis laissés dans la plus grande tranquillité. Les animaux ont été parqués par lot de 10 individus, afin de faciliter le suivi individuel. Ce suivi était réalisé en continu grâce à une caméra et un moniteur vidéo, l'image étant enregistrée sur un magnétoscope à la fréquence d'une image/seconde. Nous avons ainsi pu détecter les changements comportementaux (principalement les abandons transitoires de l'œuf, décrits par Groscolas et coll., 2000) précédant l'abandon définitif ainsi que le moment précis de cet abandon. Dans les 2 heures suivant l'abandon, l'animal était libéré (ouverture à distance de la porte du parc sans intervention humaine directe) et capturé pour une prise de sang suivie d'une pesée.

Abandon en phase II et en phase III. Bien qu'aucune différence notable du comportement d'abandon n'ait pu être mise en évidence, les animaux abandonnant leur œuf ont été *a posteriori* classés en 2 catégories en fonction de leur état métabolique à l'abandon. Une partie des animaux a été classés parmi les animaux abandonnant "prématurément" leur œuf car n'étant pas clairement dans un état de jeûne caractéristique de la phase III lors de l'abandon (voir tableau 1, page 50). Il s'agit vraisemblablement d'animaux ayant perdu leur motivation à couvrir (comme en témoigne la chute de la prolactinémie observée chez ces individus ; Groscolas et coll., non publié) indépendamment de l'atteinte d'un épuisement critique de leurs réserves énergétiques. Notons cependant qu'il s'agit plutôt d'animaux de faible masse puisqu'après seulement 10 jours d'incubation leur masse corporelle était comparable à celle d'animaux relevés ayant jeûné 16 jours (tableau 1). Les autres animaux abandonnant, considérés comme "normaux", présentaient les caractéristiques d'animaux en phase III de jeûne (tableau 1). Nous avons dosé la leptine et les métabolites plasmatiques chez 10 individus de chacune de ces deux catégories d'animaux abandonnant.

Les données sur des manchots couveurs concernent donc au total 46 individus.

2.1.2- Jeûne en parc (animaux non couveurs)

Treize manchots royaux mâles ont été capturés alors qu'ils paradaient sur la plage d'accès à la colonie de reproduction. Le sexage a été effectué visuellement, en tenant compte du fait qu'à l'intérieur d'un couple et à ce stade du cycle annuel les mâles sont plus gros que les femelles. Le sexe a été confirmé *a posteriori* par dosage de la testostérone, une hormone sexuelle dont la concentration circulante est très élevée chez les mâles en parade alors que dans le même temps elle est pratiquement nulle chez les femelles.

Cinq stades du jeûne en parc ont été définis de façon à correspondre au mieux aux stades du jeûne d'incubation (en terme de masse corporelle).

Stade 0 du jeûne. Au moment de la capture, les animaux jeûnaient depuis 1 à 2 jours environ. Une prise de sang a été réalisée dans les 3 minutes suivant la capture, puis les animaux ont été pesés sur une balance à plateau (± 4 g), marqués sur la poitrine avec un colorant (nyanzol) et placés dans un parc de contention en bois (3 m x 3 m, hauteur 1,8 m) à proximité immédiate de la colonie et dans la même ambiance climatique que les animaux libres.

Stade 1 du jeûne. Une deuxième prise de sang a été effectuée 6 jours après la mise en parc, cette durée de contention étant considérée comme suffisante pour une bonne adaptation des animaux aux conditions de captivité. D'autre part, après 6 jours de contention les animaux sont dans un état d'amaigrissement sensiblement comparable à celui des animaux en début d'incubation.

Stade 2, 3 et 4 du jeûne. Les animaux ont ensuite été pesés régulièrement tous les 3 à 5 jours afin de déterminer la date des futures prises de sang. Notre objectif était en effet de réaliser ces prises de sang au moment où les animaux atteindraient la masse corporelle moyenne déterminée chez des mâles couveurs 1) au moment de leur relève par leur partenaire et 2) au moment où ils abandonnent spontanément leur œuf dans le cas où cette relève est retardée. Les masses corporelles correspondantes sont respectivement voisines de 10 et 9 kg (Groscolas et coll., 2000 ; Robin et coll., sous presse ; voir aussi tableau 2, page 50).

Ainsi, une troisième (stade 2 du jeûne) et une quatrième (stade 3 du jeûne) prise de sang ont été réalisées quand les animaux atteignaient ces masses corporelles, soit en moyenne après 22 et 31 jours de jeûne dans nos conditions de contention (tableau 2). Enfin, sur une partie des animaux, une cinquième prise de sang a été effectuée après quelques jours de jeûne supplémentaire, à une masse corporelle moyenne de 8,2 kg (stade 4 du jeûne), afin d'obtenir des données sur des animaux dans un état bien marqué de phase III de jeûne.

Au total 56 prises de sang ont été réalisées chez des manchots non couveurs : tous les animaux (13 individus) ont pu être prélevés aux stades 0 et 1, et seulement 12 d'entre eux aux stades 2 et 3. Le stade 4 était représenté par 6 individus.

2.2- PRELEVEMENTS ET TRAITEMENT DU SANG

Les prises de sang ont été réalisées à la veine alaire, avec une seringue héparinée de 5 ml équipée d'une aiguille de 0,8 mm de diamètre et 40 mm de long. Le sang (2-3 ml) a été immédiatement transvasé dans un tube en polyéthylène, conservé dans de la glace pilée et centrifugé dans les 30 minutes. Des aliquotes de plasma (0,35 ml) ont ensuite été réparties dans des tubes eppendorf de 0,5 ml puis congelés à -20°C et conservés à cette température jusqu'à l'analyse.

La durée entre la réaction de l'animal à l'approche des opérateurs et la fin de la prise de sang a été chronométrée. En général, elle était de 2 à 3 min, et au maximum de 5 min.

2.3- DOSAGE DE LA LEPTINE PLASMATIQUE

La concentration en leptine des plasmas de manchot obtenus dans les différentes situations a été mesurée à l'aide du dosage radio-immunologique mis au point par Dridi et coll. (2000) pour le poulet. Ce dosage nécessite la préparation des réactifs décrits ci-dessous.

2.3.1- Milieu d'incubation (MI)

Le milieu utilisé pour diluer les réactifs et les plasmas est composé de tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,05 M), de NaCl (0,15 M), de sérum-albumine bovine (BSA ; 0,1 %), d'azoture de sodium (0,1 %) et de Triton x100 (0,1 %).

2.3.2- Anticorps

La solution d'anticorps primaires est composée de sérum de lapin anti leptine de poulet (SLALP ; INRA de Jouy-en-Josas) dilué au 1/5000^{ème}.

La solution d'anticorps secondaires est composée d'un mélange dans la proportion 1/1 de sérum de mouton anti sérum de lapin (SMAL ; INRA de Tours) dilué au 1/10^{ème} et de sérum normal de lapin (SNL ; SIGMA) dilué au 1/100^{ème}.

2.3.3- Préparation de leptine marquée

5 µg de leptine recombinante de poulet sont mélangés à 500 µCi d'iode radioactif (¹²⁵I) dans 25 µl de tampon phosphate (0,5 M, pH 7,4). La réaction est initiée par l'ajout de 3 µg de chloramine T. Elle est stoppée au bout de 6 min par l'addition de 30 µg de métabisulfite de sodium puis, 2 min plus tard, de 140 µl de tampon phosphate.

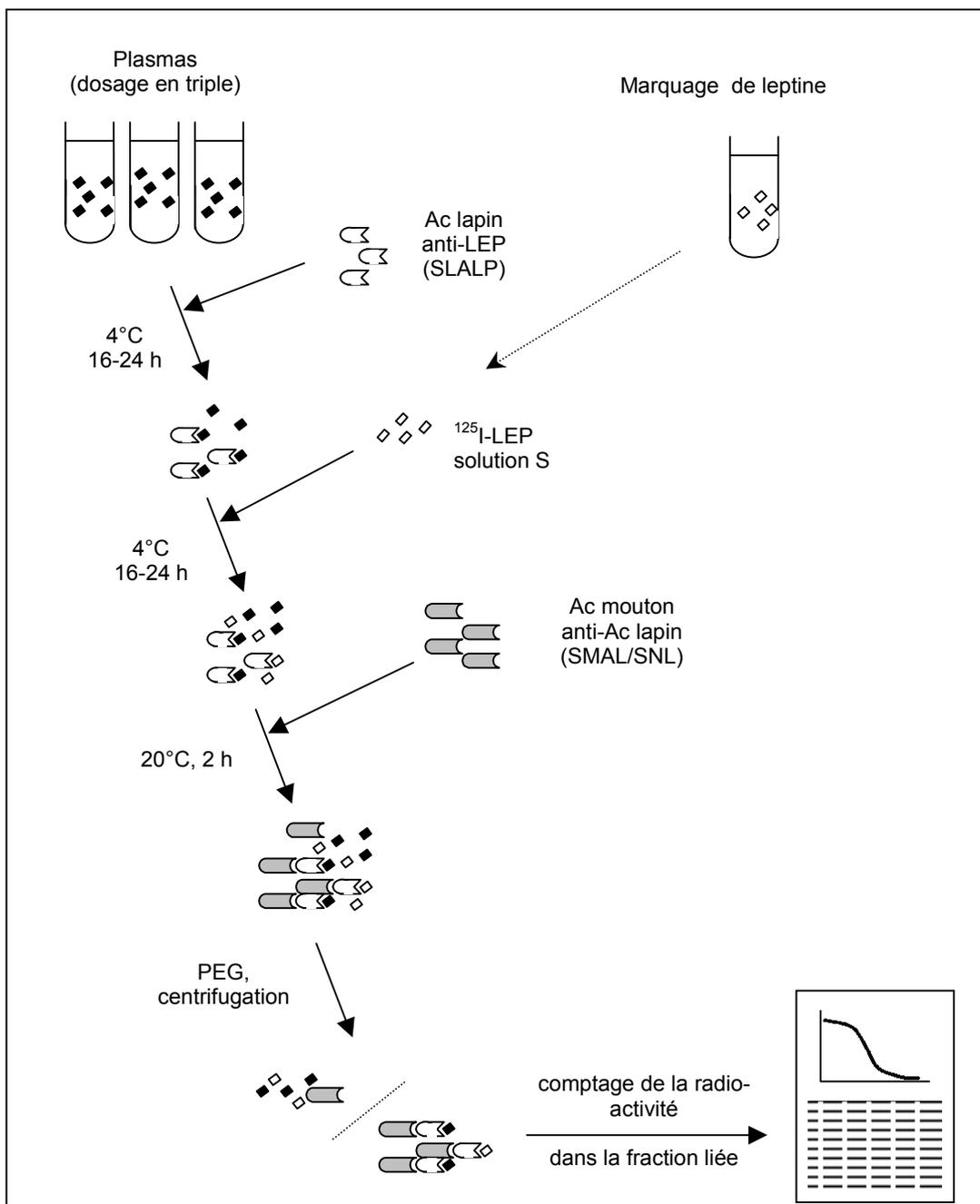


Figure 8. Dosage radio-immunologique de la leptine.

Le dosage met en jeu une réaction immunologique antigène-anticorps, et utilise un radio-élément comme traceur. Un antigène marqué avec un isotope radioactif (ici de la leptine de poulet marquée à l'iode 125) est mis en compétition avec un antigène "froid" non marqué (ici la leptine plasmatique de manchot) pour les sites de liaison d'un anticorps spécifique (sérum de lapin anti-leptine de poulet, SLALP). Les deux antigènes doivent avoir une affinité identique pour l'anticorps et la compétition est due au fait que la quantité d'anticorps disponibles dans le milieu est insuffisante pour permettre la fixation de tous les antigènes. La quantité d'hormone marquée introduite est connue, et seule la quantité d'antigène froid varie. Plus la concentration de ce dernier est élevée, plus il y aura de complexes anticorps-antigène froid formés, au détriment des complexes anticorps-antigène marqué. Après élimination des antigènes libres, (ajout d'anti-anticorps de lapin et de PEG, puis centrifugation), on mesure la radio-activité de la fraction liée (complexes antigènes-anticorps précipités).

Le dosage de standards (solutions de leptine recombinante de concentration connue) permet d'établir une courbe-étalon, qui donne la relation entre concentration de leptine froide et radio-activité liée.

Cette solution finale est déposée sur une colonne Sephadex G25 PD-10 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) préalablement saturée par passage de tampon phosphate - BSA (2%). Des fractions de 500 µl sont ensuite éluées avec du tampon phosphate, et recueillies dans des tubes contenant 100 µl de BSA (1%). 30 fractions sont collectées et, pour chacune d'elles, 10 µl sont comptés au compteur gamma (RIAstar). Les fractions contenant le pic de radio-activité sont complétées par 100 µl de Triton x100 et forment la solution-mère de leptine marquée (SM).

En moyenne, le rendement du marquage était de l'ordre de 20 %, l'activité spécifique de 20 µCi / µg leptine et l'activité de la solution SM comprise entre $0,8 \cdot 10^6$ et 10^6 cpm / 100 µl.

La solution SM était alors diluée dans du MI pour obtenir une solution S d'activité comprise entre 20000 et 40000 cpm / 100 µl.

2.3.4- Dosage radio-immunologique

Le principe et les étapes du dosage sont présentés figure 8.

A 100 µl de plasma ou de standard, sont ajoutés 100 µl de MI et 100 µl de SLALP. L'ensemble est incubé 20 heures à 4°C. 100 µl de la solution S de leptine marquée sont distribués avant une nouvelle incubation de 20 heures à 4°C. 100 µl de la solution SMAL / SNL sont alors ajoutés ; le tout est incubé 2 heures à 20°C. L'ajout d' 1 ml d'un mélange poly-éthylène-glycol (4 %, MERCK) / Tween 20 (0,1 %, BIO-RAD) puis une centrifugation (3000 tr/min, 30 min, 4°C) permettent la séparation des fractions libres (surnageants) et des fractions liées (culots). L'activité des culots est mesurée au compteur gamma (RIAstar).

Les valeurs obtenues pour la gamme standard (dosage en triple) permettent de tracer une courbe-étalon, donnant le pourcentage de liaison en fonction de la concentration en leptine. Les concentrations plasmatiques des échantillons dosés sont déterminées à partir de cette courbe.

Afin de valider l'utilisation du dosage radio-immunologique spécifique du poulet pour la mesure des concentrations en leptine dans le plasma de manchot royal, plusieurs essais ont été effectués :

- notre dosage étant hétérologue, il fallait s'assurer que la leptine de manchot possède la même affinité pour l'anticorps que la leptine de poulet. Pour cela, on compare la courbe obtenue avec la leptine standard (poulet) et celle obtenue à partir de la dilution d'un plasma de manchot. Des courbes de dilution de plasma de manchot ont été établies à partir de 4 échantillons. Les dilutions (dans du MI) étaient les suivantes : 1, 3/4, 1/2, 1/3, 1/4, 1/8.

- 3 échantillons ont servi à évaluer la reproductibilité intra-essai : chacun a été dosé 9 fois.
- pour déterminer le rendement de récupération de la leptine, 2 échantillons de plasma de manchot ont été dosés seuls ou avec surcharge de leptine recombinante de poulet, à différentes concentrations : 0,5 ng, 1 ng, 5 ng et 10 ng /ml.
- 6 échantillons ont été dosés avec ou sans ajout de 4 ng de leptine de poulet pour vérifier le rendement de récupération en vue de l'appliquer au dosage de nos échantillons plasmatiques.

Au total, 4 séries de dosages ont été effectuées sur des plasmas de manchot, auxquelles il faut ajouter les contrôles de la qualité des marquages. Chaque échantillon étant dosé en triple, ceci représente en tout près de 1200 dosages.

2.4- DOSAGE DES METABOLITES PLASMATIQUES

Ils ont été effectués à l'aide de kits commerciaux utilisant des méthodes enzymologiques et spectrophotométriques, à savoir : le kit NEFA C Wako (UNIPATH) pour doser les acides gras non estérifiés et le kit UA Plus - MPR1 (BOEHRINGER MANNHEIM) pour l'acide urique.

3- ANALYSE STATISTIQUE

Pour les deux types de jeûne et à chaque stade, la moyenne (\bar{X}) et l'erreur standard de la moyenne (ESM) ont été calculées pour tous les paramètres mesurés (masse corporelle et concentrations plasmatiques en AGNE, AU et leptine). Les résultats sont présentés sous la forme $\bar{X} \pm \text{ESM}$.

Pour un paramètre donné, une analyse de variance (ANOVA) à un critère a permis de tester si une différence significative des valeurs moyennes existait entre les différents stades du jeûne. Si tel était le cas, un test non paramétrique de Student-Newman-Keuls (SNK) a été utilisé pour comparer les moyennes deux à deux.

Le traitement statistique a été effectué à l'aide du logiciel "Sigma-Stat".

La limite de significativité statistique retenue était : $P < 0,05$.

TROISIEME PARTIE :

RESULTATS

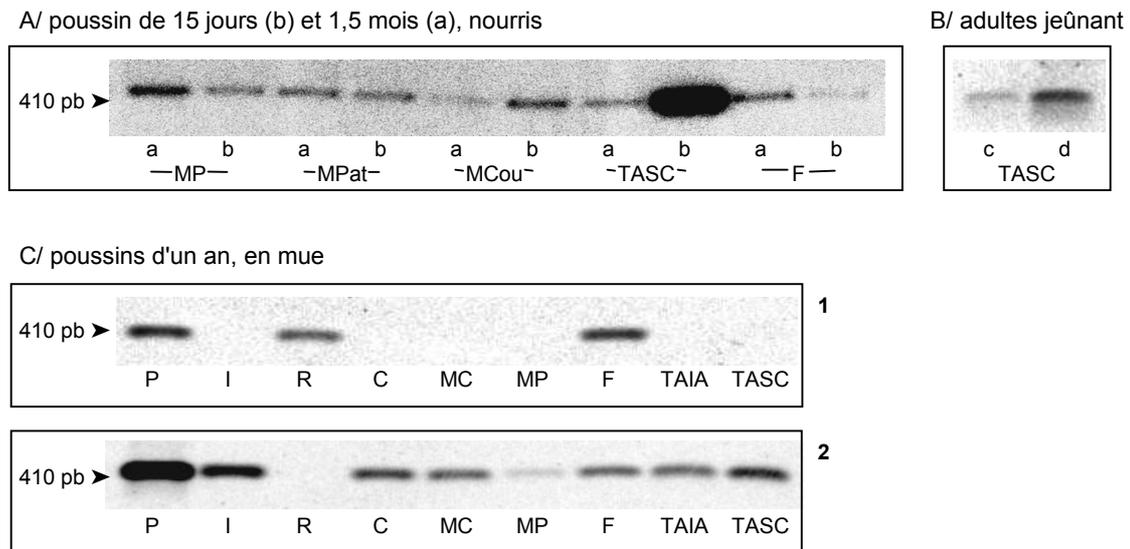


Figure 9. Expression du gène LEP dans différents tissus de manchot royal. Southern Blot réalisé chez A/ 2 poussins nourris âgés de 15 jours (a) et de 1,5 mois (b), B/ deux adultes (c,d) en début de jeûne de reproduction, et C/ deux poussins en mue âgés d'un an (1 et 2). Les amorces Lep500 (S, AS) ont permis l'amplification de fragments de 410 pb. L'intensité du signal varie avec celle de l'expression du gène.
MP: muscle pectoral, MPat: muscle de la patte, Mcou: muscle du cou, TASC: tissu adipeux sous-cutané, F: foie, P: poumon, I: intestin, R: rein, C: cerveau, MC: myocarde, TAIA: tissu adipeux intra-abdominal.

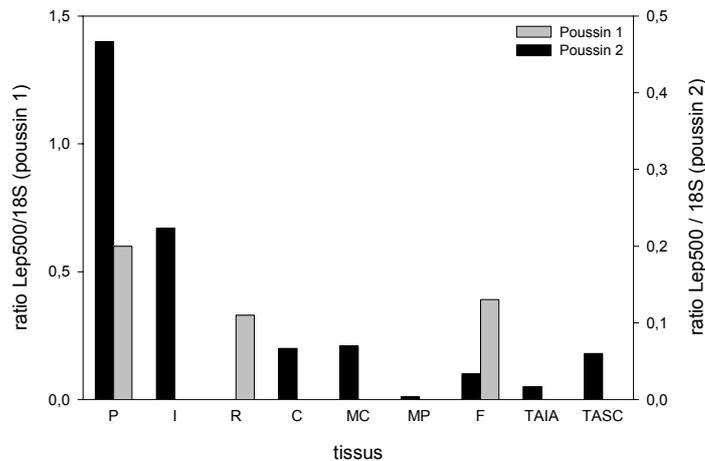


Figure 10. Niveau relatif d'expression du gène LEP dans différents tissus. Ratio entre les intensités (unités arbitraires) des signaux obtenu après amplification des fragments Lep500 d'une part et 18S d'autre part. Valeurs obtenues chez 2 poussins d'un an, en mue. Mêmes abréviations que pour la figure 9.

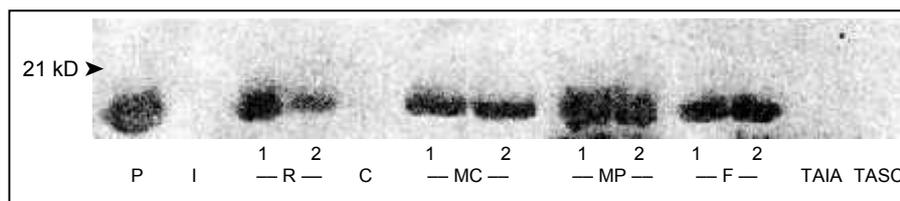


Figure 11. Présence de leptine dans différents tissus de manchot royal (poussins d'un an en mue). L'intensité du signal obtenu par Western-Blot varie avec la concentration en leptine. Dans le cas du poumon, de l'intestin, du cerveau, du TAIA et du TASC, les tissus des 2 poussins ont été poolés. Mêmes abréviations que pour la figure 9.

1- EXPRESSION ET CARACTERISATION DE LA LEPTINE CHEZ LE MANCHOT ROYAL ; SEQUENCE DU GENE LEP

1.1- Expression du gène LEP

A travers la détection de fragments d'ADNc d'une taille voisine de 410 pb, l'utilisation de la technique de RT-PCR a permis de mettre en évidence l'expression d'un homologue du gène LEP du poulet dans différents tissus du manchot royal. C'est ce qu'illustre la figure 9.

Chez un poussin de 15 jours et chez un poussin de 1,5 mois (nourris), l'expression du gène LEP a été détectée dans les cinq tissus où elle a été recherchée, à savoir le TASC, le foie et les muscles pectoraux, de la patte et du cou. Le niveau d'expression est similaire d'un tissu à l'autre et d'un animal à l'autre, excepté pour le TASC à l'âge de 15 jours (très forte expression) et pour le foie à ce même âge (faible expression). Chez deux poussins âgés de 1 an en mue (à jeun), les résultats sont variables : pour un individu, l'expression du gène LEP a été mise en évidence dans 8 des 9 tissus où elle a été recherchée, soit le poumon, l'intestin, le cerveau, le myocarde, le muscle pectoral, le foie, le TAIA et le TASC, mais pas le rein. Pour le deuxième poussin d'un an, l'expression a été décelée dans seulement 3 tissus : le poumon, le rein et le foie. Enfin, l'expression du gène LEP a été observée dans le TASC des deux adultes ayant subi une biopsie en début de jeûne de reproduction.

Chez les deux poussins d'un an, l'expression de la leptine a été comparée à celle de l'ARNr 18S (dont l'expression est constante d'un tissu à l'autre). Cette approche semi-quantitative montre que le niveau relatif d'expression du gène LEP est fort dans le poumon, et moyen à faible dans le foie, le TAIA et le TASC (figure 10).

1.2- Caractérisation de la leptine

Un Western Blot a été effectué à partir de solubilisats des neuf tissus prélevés chez les deux poussins d'un an. Pour cinq tissus, en quantité trop faible, les échantillons des deux animaux ont été poolés avant solubilisation. La présence de leptine a été détectée dans le poumon, le rein, le myocarde, le muscle pectoral et le foie, mais pas dans l'intestin, le cerveau, le TAIA et le TASC (figure 11).

135	GAATGTCCTG CAGAGAGCCC TGCAGCCTGC TCAAAGCCAC CACCTCTGTG GAGTAGAGTG	194
195	AGGCTTCCAG GACGCCATCC AGGCTCTCTG GCTTCTGCAG GCCACTGGTC TGAGGCAGGA	254
255	GGAGCAGCTC TTGGAGAAGG CCAGCAGATG GGAGGTCTCG GAGATTCTCC AGGTCATTGG	314
315	CTATCTGCAG CACATTTTGG GAAGGCAGGC TGGTGAAGGAC CTGTTGATAG ACTGCCAGAG	374
375	TCTGGTCCAT CTTGGACAAA CTCAGAATGG GGTGAAGCCC AGGAATGAAG TCCAAGCCAG	434
435	TGACCCTCTG CTTGGCGGAT ACCGAC	460

Figure 12. Séquence d'un fragment du gène LEP de manchot royal. Enchaînement des 326 nucléotides (brin codant) convenablement séquencés à partir de fragments Lep500 issus du foie. Le nucléotide en gras souligné indique la différence entre la séquence du manchot royal et celle du poulet. A : adénine ; G : guanine ; T : thymine ; C : cytosine.

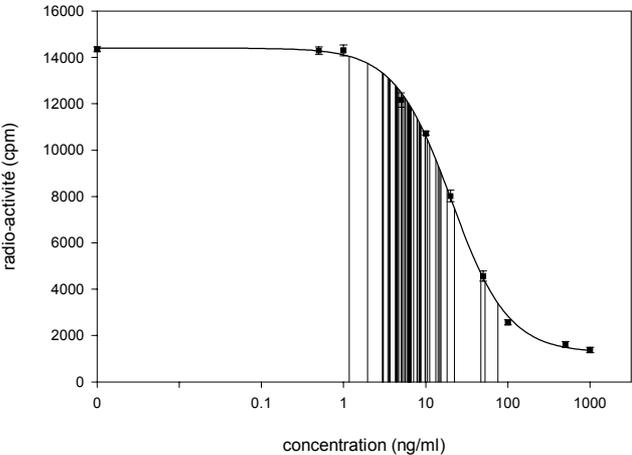


Figure 13. Courbe étalon obtenue à partir d'une gamme standard de leptine de poulet. Elle permet de convertir l'activité du culot de centrifugation (cpm) en leptinémie (ng/ml). Les traits verticaux correspondent aux valeurs des plasmas de manchot dosés lors des essais.

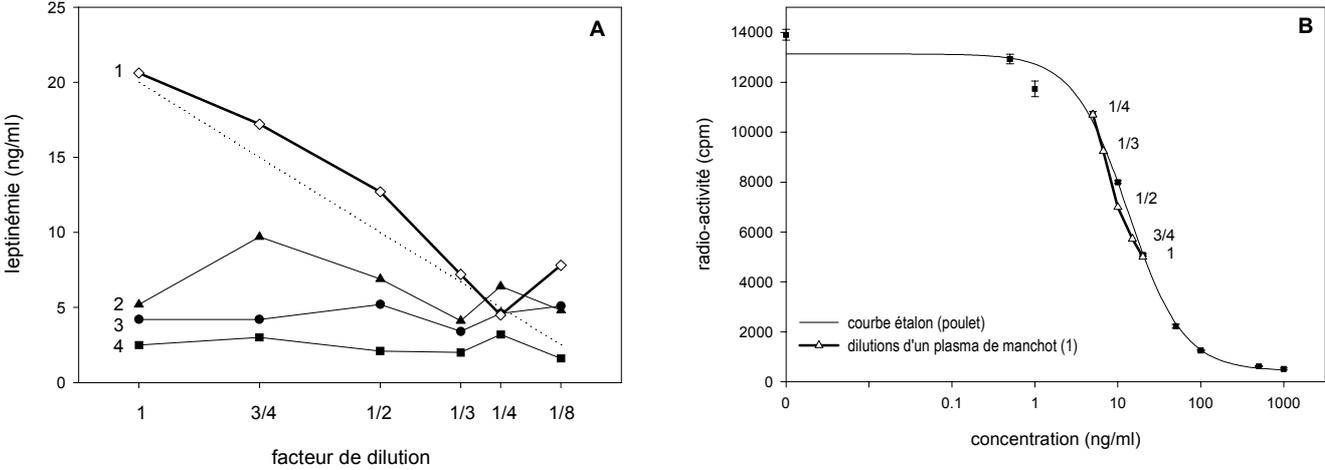


Figure 14. Courbes de dilution. A. Courbe obtenue a partir de 4 échantillons de plasma de manchot royal. La ligne pointillée donne la courbe theorique pour un plasma a 20 ng/ml. B. Comparaison d'une courbe de dilution réalisée avec un plasma de manchot contenant 20 ng/ml de leptine, avec une courbe étalon faite avec de la leptine recombinante de poulet.

1.3- Séquence d'un fragment du gène LEP de manchot royal

Nous avons cloné et séquencé 3 fragments Lep500 (410 pb) amplifiés à partir du foie, du poumon et du TAIA d'un des poussins d'un an. Le séquençage a pu être réalisé convenablement sur 223 à 326 pb selon les tissus, ce qui représente entre 45 et 65 % environ de la partie codante du gène de la leptine. Sur ces portions, 99 % d'homologie ont été observés entre la séquence du manchot royal et celle du poulet.

La séquence du fragment amplifié à partir du foie est présentée sur la figure 12. Dans ce cas, la différence manchot-poulet concerne le remplacement d'une adénosine (poulet) par une guanine (manchot) sur le brin codant.

2- VALIDATION DU DOSAGE DE LA LEPTINE PLASMATIQUE

2.1- Dilution

Les dosages réalisés avec les premiers marquages de leptine ont donné des courbes standard dont la partie linéaire débutait vers 5 ng/ml (figure 13). La leptinémie de nombreux plasmas de manchot dosés lors de ces essais s'est trouvée à la limite inférieure de la gamme, donc dans une zone où l'imprécision de la mesure est élevée.

En accord avec cette observation, les essais de dilution sur plasma de manchot se sont avérés satisfaisants pour un échantillon à concentration élevée en leptine : la courbe de dilution de cet échantillon est proche de la courbe théorique (figure 14A, courbe 1) et se superpose à la courbe étalon (figure 14B). En revanche, aucun effet visible de la dilution n'a pu être détecté pour des plasmas présentant une leptinémie inférieure à 5 ng/ml (figure 10A, courbes 3 et 4).

2.2- Reproductibilité intra-essai

Sur 3 plasmas de manchot, la concentration en leptine a été dosée 9 fois. Les coefficients de variation ($CV = [ESM / \text{moyenne}] \times 100$) étaient compris entre 6,5 et 11,8 %. D'autre part, sur l'ensemble des dosages effectués en triple sur des plasmas de manchot, le CV était en moyenne de 8 %.

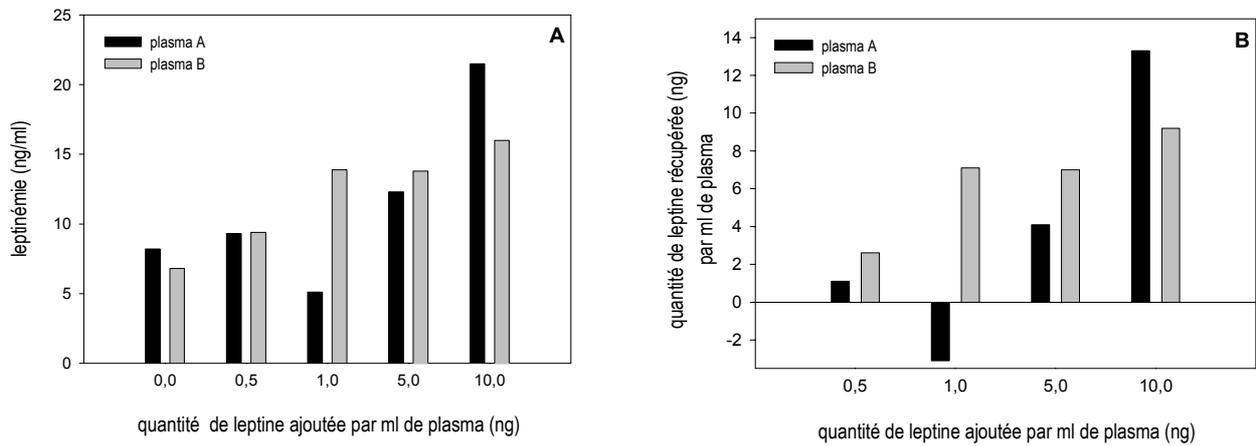


Figure 15. Récupération de leptine de poulet. **A.** Concentrations en leptine mesurées sur 2 échantillons de plasma de manchot royal, seuls et avec surcharge de leptine recombinante de poulet. **B.** Quantité de leptine de poulet récupérée (différence entre les valeurs avec et sans surcharge).

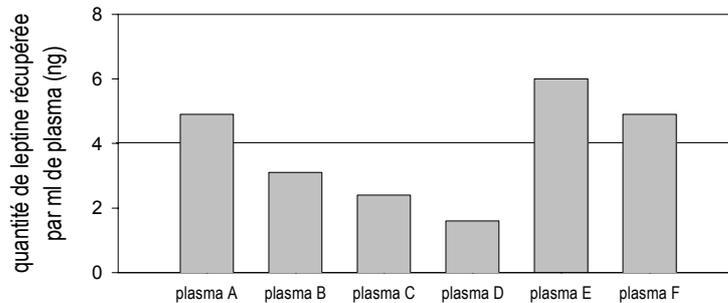


Figure 16. Récupération de leptine de poulet. 6 échantillons de plasma ont été dosés seuls et avec surcharge de 4 ng de leptine recombinante de poulet (par ml de plasma). Les histogrammes représentent la quantité de leptine récupérée.

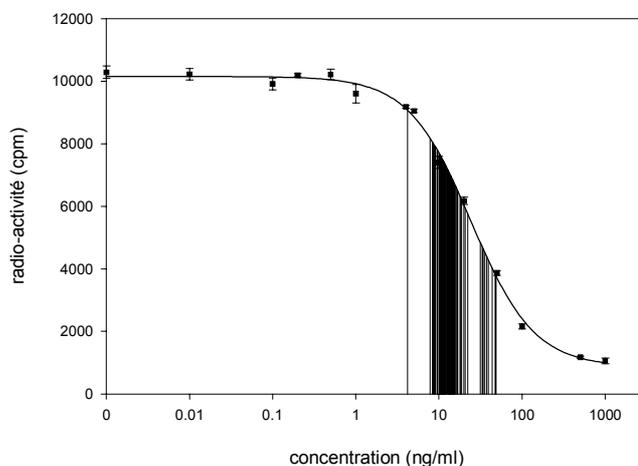


Figure 17. Courbe étalon et valeurs de leptinémie (traits verticaux) obtenues lors du dosage définitif sur plasmas de manchot, après ajout de 4 ng/ml de leptine recombinante de poulet.

2.3- Récupération

Des essais de surcharge de deux plasma de manchot avec de la leptine recombinante de poulet ont été réalisés. On observe que la concentration en leptine des échantillons dosés croît globalement avec la quantité de leptine de poulet ajoutée (figure 15A). Cependant, ce n'est qu'à partir d'une surcharge de 5 ng/ml environ que l'on retrouve plus précisément la quantité ajoutée (figure 15B).

De nouveaux marquages de leptine ayant permis d'augmenter la sensibilité du dosage (abaissement de la limite de linéarité aux alentours de 3 à 4 ng/ml), un essai de surcharge avec 4 ng de leptine recombinante de poulet par ml de plasma de manchot a été réalisé sur 6 échantillons. La récupération de leptine de poulet a été de $3,8 \pm 0,8$ ng/ml, soit en moyenne de 95 % (figure 16).

Pour le dosage définitif des plasmas de manchot au cours du jeûne, nous avons donc décidé de rajouter systématiquement 4 ng de leptine de poulet (par ml de plasma), ceci afin de s'affranchir de la sensibilité insuffisante du dosage. Les concentrations en leptine ainsi mesurées étaient situées en milieu de gamme, c'est-à-dire dans la zone de linéarité où le dosage est le plus précis, pour la majorité des plasmas (figure 17). La surcharge de 4 ng a bien sûr été retranchée dans le calcul définitif de la leptinémie du manchot.

3- EVOLUTION DE L' ETAT METABOLIQUE ET DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE LA LEPTINE AU COURS DU JEUNE

3.1- Jeûne d'incubation chez le manchot royal

Le tableau 1 (page 50) présente les valeurs de la durée d'incubation, de la masse corporelle, de la concentration de métabolites plasmatiques et de la leptinémie aux quatre stades du jeûne d'incubation étudiés. Chez les animaux abandonnant leur œuf (phase III), la durée du jeûne était supérieure de 9 jours à celle des animaux normalement relevés par leur partenaire (ANOVA : $F_{3,45} = 81,111$, $P < 0,001$; SNK : $P < 0,001$). La masse corporelle a significativement diminué tout au long du jeûne (ANOVA : $F_{3,45} = 19,912$, $P < 0,001$), de 20 % entre le début d'incubation et l'abandon de l'œuf (en phase III). La masse corporelle à l'abandon (phase III) était significativement inférieure de 1,2 kg à celle des animaux relevés (SNK : $P < 0,001$). Les concentrations circulantes d'acides gras non estérifiés (AGNE) et

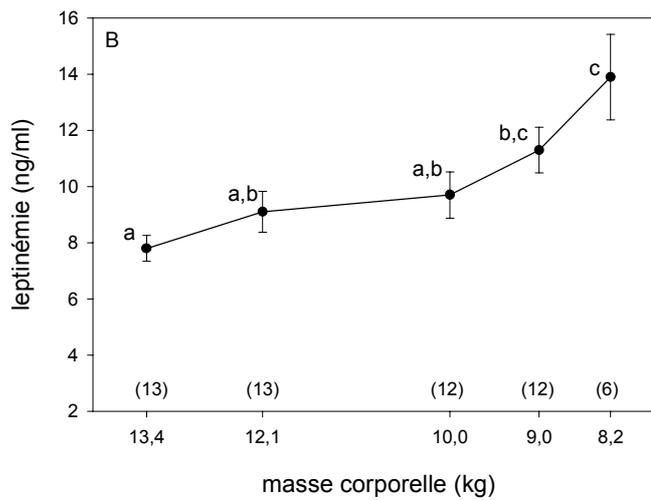
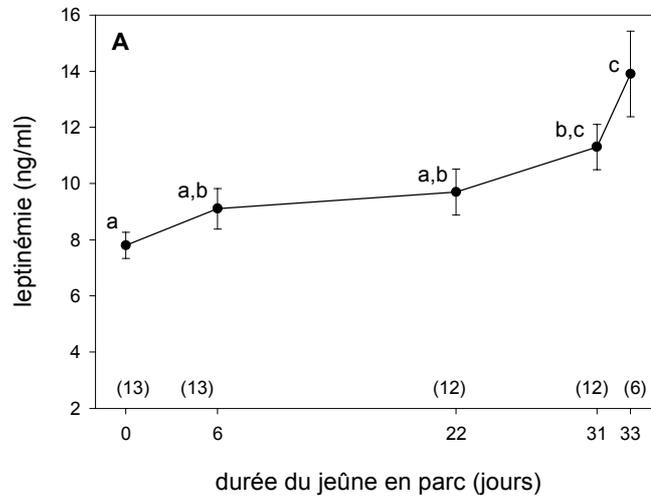


Figure 18. Evolution de la leptinémie au cours du jeûne chez des manchots royaux non couveurs en parc. **A.** en fonction de la durée du jeûne. **B.** en fonction de la masse corporelle. Valeurs = moyenne \pm ESM (ng/ml), avec taille de l'échantillon entre parenthèses. Les valeurs qui ne partagent pas la même lettre-exposant sont significativement différentes ($P < 0,01$).

d'acide urique (AU) ont varié significativement au cours du jeûne (ANOVA : $F_{3,45} = 3,264$, $P < 0,05$ et $F_{3,45} = 9,422$, $P < 0,001$, respectivement). Au moment de l'abandon (phase III), elles étaient significativement plus élevées qu'aux autres stades d'incubation (SNK : $P < 0,05$ et $P < 0,001$, respectivement).

Au cours de l'incubation, la leptinémie n'a présenté aucune variation significative (ANOVA : $F_{3,45} = 2,632$, $P = 0,062$), et notamment aucune baisse au moment de l'abandon de l'œuf.

3.2- Jeûne en parc chez le manchot royal non couveur

Le tableau 2 (page 50) présente l'évolution de la masse corporelle et de la concentration d'AGNE et d'AU au cours du jeûne en parc chez des manchots non couveurs. Les valeurs moyennes de la masse corporelle (MC) différaient significativement entre les 5 stades considérés (ANOVA : $F_{4,55} = 266,232$, $P < 0,001$). Au cours des 33 jours du jeûne, MC a diminué de 39 % (SNK : $P < 0,001$). La concentration circulante des AGNE a présenté une élévation transitoire significative quand les animaux ont atteint une MC de 10 - 9 kg (ANOVA : $F_{4,55} = 7,058$, $P < 0,001$). L'uricacidémie est restée stable pendant la majeure partie du jeûne puis a augmenté très nettement (ANOVA : $F_{4,55} = 39,736$, $P < 0,001$) en-dessous de 10 kg.

La figure 18 montre l'évolution de la leptinémie, en fonction de la durée du jeûne (A) ou de la masse corporelle (B). La leptinémie a varié significativement au cours du jeûne (ANOVA : $F_{4,55} = 6,585$, $P < 0,001$). Elle a augmenté assez progressivement pour atteindre en fin de jeûne (MC = 8,2 kg) une valeur supérieure de 78 % à celle du début de jeûne ($13,9 \pm 1,5$ ng/ml vs $7,8 \pm 0,5$ ng/ml ; SNK : $P < 0,001$). A la MC de 9 kg, masse corporelle moyenne des animaux abandonnant leur œuf dans la colonie, la leptinémie ($11,3 \pm 0,8$ ng/ml) était également supérieure (de 45 %) à celle mesurée en début de jeûne (SNK : $P = 0,01$). Notons cependant qu'aucune élévation significative de la leptinémie ne s'observe entre les 6^{ème} et 31^{ème} jours de jeûne, quand la masse corporelle diminue de 12 à 9 kg (gamme de MC observée chez des couveurs entre le début de l'incubation et l'abandon de l'œuf).

Tableau 1. Jeûne d'incubation. Leptinémie et concentrations plasmatiques en acides gras non estérifiés (AGNE) et acide urique (AU) à 4 stades du jeûne d'incubation chez des manchots royaux. La durée d'incubation et la masse corporelle des animaux (MC) sont données en parallèle. Les valeurs ($= \bar{X} \pm \text{ESM}$) qui ne partagent pas la même lettre-exposant sont significativement différentes ($P < 0,05$).

stade	N	durée d'incubation (jours)	MC (kg)	AGNE (mmol/l)	AU (mmol/l)	leptinémie (ng/ml)
début d'incubation	12	3,0 ^a ± 0,0	11,20 ^{a*} ± 0,20	0,41 ^a ± 0,05	0,14 ^a ± 0,02	11,4 ± 0,6
relève	14	16,0 ^b ± 0,5	10,10 ^b ± 0,20	0,43 ^a ± 0,06	0,18 ^a ± 0,03	9,1 ± 0,7
abandon phase 2	10	9,7 ^c ± 0,8	9,91 ^b ± 0,17	0,47 ^a ± 0,05	0,21 ^a ± 0,03	10,0 ± 0,5
abandon phase 3	10	25,1 ^d ± 2,1	8,94 ^c ± 0,23	0,68 ^b ± 0,10	0,42 ^b ± 0,07	12,5 ± 1,7

* Déterminée chez un lot d'animaux différent de celui chez lequel les concentrations plasmatiques ont été mesurées (voir Matériel et méthodes, page 34)

Tableau 2. Jeûne en parc. Concentrations plasmatiques en acides gras non estérifiés (AGNE) et acide urique (AU) à 5 stades d'un jeûne en parc chez des manchots royaux non couveurs. La durée du jeûne et la masse corporelle des animaux (MC) sont données en parallèle. Les valeurs ($= \bar{X} \pm \text{ESM}$) qui ne partagent pas la même lettre-exposant sont significativement différentes ($P < 0,05$)

stade	N	durée du jeûne en parc (jours)	MC (kg)	AGNE (mmol/l)	AU (mmol/l)
0	13	0 ± 0,0	13,4 ^a ± 0,2	0,26 ^a ± 0,02	0,24 ^a ± 0,02
1	13	6 ± 0,0	12,1 ^b ± 0,1	0,27 ^a ± 0,02	0,14 ^a ± 0,02
2	12	21,6 ± 0,8	10,0 ^c ± 0,0	0,67 ^b ± 0,11	0,25 ^a ± 0,03
3	12	30,8 ± 0,6	9,0 ^d ± 0,1	0,51 ^{b,c} ± 0,08	0,70 ^b ± 0,09
4	6	33,0 ± 0,4	8,2 ^e ± 0,1	0,32 ^{a,c} ± 0,08	1,15 ^c ± 0,14

QUATRIEME PARTIE :

DISCUSSION

1- EXPRESSION ET CARACTERISATION DE LA LEPTINE CHEZ LE MANCHOT ROYAL ; SEQUENCE DU GENE LEP

1.1- Expression et caractérisation de la leptine

Différentes techniques (RT-PCR-Southern Blot, Western Blot) ont permis de mettre en évidence l'expression du gène de la leptine et la présence de cette protéine dans plusieurs tissus de manchot royal. Les résultats obtenus ont montré quelques divergences et nous avons mis en avant des hypothèses physiologiques pouvant les expliquer. Cependant il ne faut pas oublier, en première explication, que les techniques mises en œuvre sont complexes et délicates, et que l'obtention de résultats contradictoires peut être directement liée à la manipulation. Nous avons présenté ici les données qui nous paraissaient les plus fiables en l'état actuel de l'avancement de nos travaux, sachant que des investigations complémentaires sont nécessaires

Par RT-PCR, nous avons remarqué chez deux poussins d'un an une forte variabilité inter-individuelle, en terme d'expression relative mais aussi en terme de lieu de synthèse. L'expression pulmonaire et hépatique est néanmoins une constante chez ces deux animaux. Alors que nous observons aussi une expression dans le cœur, l'intestin, le muscle, le cerveau et le tissu adipeux du manchot, cette expression n'a été décelée chez le poulet que dans le foie et le tissu adipeux (Taouis et coll., 1998 ; Ashwell et coll., 1999a). Une expression pulmonaire n'a pas non plus été mentionnée à ce jour chez un mammifère. Chez le manchot, elle pourrait être associée au rôle cytokine-like de la leptine, récemment démontré chez la souris et impliquant cette hormone dans la réponse immunitaire (Harris, 2000), à moins que chez un animal plongeur capable de longues apnées tel le manchot, la leptine ait un rôle plus spécifique au niveau pulmonaire.

Chez deux adultes en début de jeûne de reproduction, l'expression du gène LEP a été recherchée et démontrée dans le TASC, où elle semble présenter des niveaux différents entre les deux individus. Les résultats obtenus chez ces deux animaux et sur les poussins d'un an indiquent une forte variabilité individuelle et confirment le fait que chez l'oiseau le tissu adipeux est un site de synthèse de la leptine.

Enfin, chez deux jeunes poussins, divers lieux d'expression ont été mis en évidence (TASC, foie, et trois types de muscles squelettiques), ceci de façon concordante. L'expression hépatique apparaît comme étant supérieure à l'âge de 1,5 mois par rapport à celle observée à 15 jours, alors que le tissu adipeux présente une expression du gène LEP beaucoup plus forte

à 15 jours qu'à 1,5 mois. Ces différences pourraient être liées à l'âge, mais aussi à l'état nutritionnel des animaux (proximité variable du dernier repas au moment du prélèvement). Cette hypothèse doit être avancée avec prudence compte tenu de la variabilité inter-individuelle mentionnée précédemment.

Chez les poussins d'un an, le Western Blot (appliqué pour la première fois à la leptine chez l'oiseau) a permis de mettre en évidence la présence de la protéine dans 5 tissus (poumon, rein, myocarde, muscle pectoral et foie). Les discordances observées par rapport aux résultats de la RT-PCR (tissus exprimant le gène LEP mais où la présence de la protéine n'est pas décelée) peuvent être imputables aux processus de régulation de la traduction, alors que l'observation inverse (mise en évidence de la protéine sans expression du gène) serait plutôt imputable à un problème méthodologique.

Quoi qu'il en soit, nos résultats sont très nettement en faveur de l'existence de la leptine chez le manchot royal. Ils indiquent par ailleurs que le gène LEP serait exprimé dans un grand nombre de tissus, et suggèrent que cette expression pourrait dépendre de l'âge et de l'état physiologique des animaux. Ces résultats devraient être définitivement validés par la recherche directe d'ARNm de leptine (Northern Blot) et par la confirmation des données préliminaires concernant la caractérisation de la protéine LEP (Western Blot).

1.2- Séquence d'un fragment du gène LEP

La séquence du fragment Lep500 amplifié chez le manchot présente 99 % d'homologie avec celle du poulet. Cette proportion peut paraître élevée, mais d'une part elle ne concerne qu'un fragment du gène, et d'autre part il faut rappeler que la séquence de la leptine est relativement bien conservée entre espèces : depuis l'homme au poulet, en passant par la souris, le mouton, le porc et le chien (Ashwell et coll., 1999a). Le séquençage permet donc de confirmer que les signaux (bandes d'ADNc à 410 pb) pris en considération lors de la RT-PCR correspondent effectivement à l'expression de la leptine.

Bien qu'il ait été précisé que l'homologie concernait seulement un fragment du gène, cela laisse supposer que la leptine du manchot et la leptine du poulet ont des structures très voisines, et donc une affinité sans doute très semblable pour l'anticorps anti-leptine de poulet utilisé dans le dosage radio-immunologique. Ceci est une condition importante à remplir pour qu'un dosage hétérologue puisse être utilisé valablement.

2- EVOLUTION DE LA LEPTINEMIE AU COURS DU JEUNE

2.1- Validation du dosage de la leptine plasmatique

Les essais effectués à partir de plasma de manchot pour valider l'utilisation du dosage spécifique du poulet ont donné des résultats encourageants, bien que non totalement satisfaisants. Par rapport au dosage mis au point par Dridi et coll. (2000), nous avons dû utiliser un nouveau lot de leptine recombinante (pour le marquage et pour la gamme standard). L'activité biologique de cette protéine a été testée sur culture cellulaire et s'est avérée satisfaisante. Cependant, il est fort probable, au vu des résultats commentés ci-dessous, que la nouvelle solution de leptine comporte un pourcentage trop faible de monomères, modifiant donc les liaisons aux anticorps. D'autre part, il est nécessaire de rappeler que le dosage de la leptine est délicat : il porte sur une protéine de poids moléculaire relativement élevé, et une possible interaction avec une forme circulante du récepteur de la leptine (OB-Re) a été rapportée par Murakami et coll. (2001) chez le mouton. De plus, chez le poulet, la leptine comporte une cystéine supplémentaire, susceptible de modifier la conformation de la molécule (Dridi et coll., 2000), et donc la liaison aux anticorps.

L'observation d'une courbe de dilution proche de la courbe théorique et de la courbe étalon (figure 14, page 44) est un critère positif pour la validation d'un dosage hétérologue. De même, le fait que le rendement de récupération de la leptine de poulet, ajoutée lors du dosage sur plasma de manchot, soit en moyenne proche de 100 % supporte la validité du dosage. Enfin, la reproductibilité intra-essai que nous avons déterminée (CV de 6,5 à 11,8 %) est satisfaisante et comparable à celle obtenue lors du dosage de la leptine d'un mammifère tel que la chauve-souris avec un dosage radio-immunologique développé pour doser la leptine humaine (CV = 12 %, Kronfeld-Schor et coll., 2000).

A l'inverse, le dosage tel qu'on l'a réalisé présente une lacune : son manque de sensibilité qui s'accompagne d'une forte imprécision des mesures pour des leptinémies inférieures à 5 ng/ml environ. Cela signifie d'une part que certains dosages sont entachés d'erreur, et d'autre part que des faibles leptinémies ne peuvent pas être mesurées. L'ajout systématique d'une quantité fixe de leptine lors du dosage a permis de résoudre en partie ce problème, avec cependant, une reproductibilité encore médiocre de la récupération de cette surcharge (2 à 6 ng/ml récupérés pour 4 ng/ml ajoutés).

C'est avec ces réserves en mémoire que doivent être considérés les résultats concernant l'évolution de la leptinémie au cours du jeûne chez le manchot.

2.2- Leptine et utilisation des réserves énergétiques au cours du jeûne

Nos résultats obtenus chez des manchots non couveurs en parc, donc en l'absence de facteurs liés à la reproduction, suggèrent que non seulement la leptinémie ne diminue pas au cours du jeûne mais qu'elle augmente même légèrement. L'aspect progressif de cette augmentation supporte le point de vue qu'il s'agit là d'un phénomène bien réel et non du résultat de l'imprécision et/ou de la mauvaise reproductibilité de notre dosage. Dans ce dernier cas, une fluctuation aléatoire de la leptinémie aurait plutôt été observée.

La légère augmentation de la leptinémie est parallèle à une forte diminution de la masse corporelle. On peut estimer que dans le même temps (du stade 0 au stade 4 du jeûne) la masse adipeuse diminue au minimum de 90 %. Ce calcul est basé sur la relation entre masse corporelle et masse adipeuse déterminée par Thil et Groscolas (non publié) chez le manchot royal (masse adipeuse (kg) = 0,552 x masse corporelle (kg) - 4,260). Il n'y a donc pas de relation positive entre leptinémie et masse adipeuse chez le manchot royal en jeûne naturel. Autrement dit, il y a lors d'un tel jeûne dissociation entre leptinémie et masse adipeuse. Une telle dissociation a déjà été mise en évidence chez l'homme pendant un jeûne court (Weigle et coll., 1997) et chez le rat lors d'un jeûne prolongé jusqu'en phase III (Groscolas et coll., 1998).

Chez le manchot, cette dissociation pourrait en partie s'expliquer par le fait que le tissu adipeux n'est peut-être pas le site majeur de production de leptine. Notre étude sur la localisation de l'expression du gène de cette hormone montre en effet le rôle potentiel de divers tissus dans cette sécrétion. Par exemple, chez le poulet, le foie est un site majeur d'expression du gène de la leptine et contribuerait plus que le tissu adipeux à la régulation de la leptinémie (Richards et coll., 1999). Quelle que soit la cause de la dissociation leptinémie / masse adipeuse, notre travail suggère que chez le manchot royal à jeun la leptine ne jouerait pas un rôle "d'adipostat".

2.3- Leptine et signal de réalimentation

Chez le mammifère (Halaas et coll., 1995) comme chez l'oiseau (Denbow et coll., 2000), la leptine inhibe la prise alimentaire. En supposant un rôle identique chez le manchot, on aurait pu imaginer le scénario suivant pour expliquer le déclenchement du jeûne, puis son arrêt, chez cette espèce. L'entrée en jeûne aurait été facilitée par des niveaux circulants élevés de la leptine (inhibition de la prise alimentaire). A l'inverse, l'arrêt du jeûne et la

réalimentation auraient été stimulés par un abaissement de la leptinémie (levée de l'inhibition), cet abaissement pouvant être soit progressif jusqu'à atteinte d'une valeur seuil inférieure permettant la levée de l'inhibition, soit brutal et ne précédant l'arrêt spontané du jeûne que de quelques jours. Un tel abaissement brutal aurait pu, par exemple, être concomitant de l'entrée en phase III du jeûne, qui chez le couveur précède de quelques jours l'arrêt spontané du jeûne et le départ en mer pour se réalimenter, et semble donc les déclencher (Groscolas et coll., 2000).

Nos mesures de la masse corporelle et de la concentration circulante des AGNE et de l'AU montrent qu'effectivement, en fin de jeûne (stades 3 et 4 du jeûne en parc, abandon non prématuré de l'œuf chez les couveurs), les animaux étaient dans un état métabolique caractéristique de la phase III du jeûne. Cette phase survient quand la masse corporelle descend en dessous de 9,5 kg environ (Cherel et coll., 1988b) ; elle est marquée par une augmentation transitoire du niveau circulant des AGNE (Groscolas & Robin, non publié) et par une augmentation continue de l'uricacidémie (Cherel et coll., 1988b), phénomènes que nous observons tant chez les animaux couveurs que non couveurs pesant moins de 10 kg.

A l'inverse, nos données sur la leptinémie, tant chez les animaux couveurs que non couveurs, ne supportent pas le scénario présenté ci-dessus. Chez le manchot couveur, l'arrêt du jeûne et l'abandon de l'œuf ne coïncident avec aucune baisse progressive ou brutale de la leptinémie. Chez les non-couveurs, non seulement la leptinémie ne chute pas lors de l'entrée en phase III, mais elle continue même à augmenter légèrement. Ceci suggère que la leptine ne joue pas un rôle hormonal majeur dans le signal de réalimentation.

La phase III correspond principalement à une très forte augmentation du catabolisme protéique, et est associée à une augmentation de la corticostéronémie (Cherel et coll., 1988b). Le niveau élevé de la leptinémie observé chez les animaux non couveurs dans un état de phase III très marqué (stade 4 du jeûne en parc) pourrait être lié à cette hypercorticostéronémie. En effet, il a été montré chez le mammifère (Harris, 2000) comme chez l'oiseau (Ashwell et coll., 1999a) que les glucocorticoïdes stimulent l'expression de la leptine. Tout autant sinon plus que l'état énergétique, l'état hormonal du manchot pourrait donc affecter sa leptinémie.

CONCLUSION

Notre travail est le premier à avoir examiné l'expression du gène de la leptine chez un oiseau sauvage et à avoir abordé l'étude des variations de la leptinémie lors d'un jeûne naturel prolongé.

Il permet de suggérer que, chez le manchot royal, le gène LEP est exprimé non seulement dans le tissu adipeux et le foie (comme chez le poulet) mais aussi dans d'autres tissus (connus chez le poulet comme n'exprimant pas la leptine), avec toutefois une forte variabilité inter-individuelle. Sous réserve de confirmation, cette diversité indique que la leptine est plus qu'un adipostat (la première fonction qui lui ait été attribuée) et suggère même des rôles dépassant la régulation énergétique. La signification fonctionnelle de la forte expression détectée dans le poumon des poussins d'un an mériterait notamment d'être recherchée. De plus, l'observation que pour un même tissu, indépendamment du contrôle de la balance énergétique, l'expression de la leptine puisse varier avec l'âge pourrait indiquer un rôle de cette hormone dans les processus de développement et de maturation (par exemple sexuelle) chez le manchot. Ces rôles restent bien sûr à élucider.

La très grande homologie de la séquence du fragment cloné, entre manchot et poulet, confirme la forte conservation du gène LEP au cours de l'évolution.

La concentration en leptine du plasma de manchot peut être mesurée à l'aide du dosage radio-immunologique spécifique du poulet, avec cependant une sensibilité qu'il reste à améliorer. L'étude des variations de la leptinémie au cours du jeûne suggère que les concentrations plasmatiques de cette hormone sont dissociées de la masse adipeuse et ne peuvent donc jouer un rôle d'adipostat dans cette situation de déficit énergétique. Aucune variation significative de la leptinémie n'étant observée chez des animaux abandonnant spontanément leur œuf après avoir épuisé de façon critique leurs réserves énergétiques (phase III), il ne semble pas que chez le manchot royal la leptine joue un rôle majeur dans le déclenchement du signal de réalimentation.

PERSPECTIVES

Avant tout, et comme nous l'avons déjà précisé, les résultats de cette étude devront être confirmés après **validation complète de la méthodologie** appliquée au manchot. De plus, il pourrait être intéressant d'obtenir un profil de leptinémie plus fin au cours du jeûne (chez des animaux couveurs ou non), en effectuant des prélèvements plus nombreux, plus rapprochés.

Quoi qu'il en soit, caractériser **l'évolution de la leptinémie en début de jeûne** n'est pas possible chez des individus adultes puisqu'ils sont déjà à jeun depuis quelques jours lorsqu'ils arrivent à terre. Aussi, pour évaluer les effets d'un jeûne court et éventuellement de la réalimentation sur la leptinémie, nous proposons de travailler sur des animaux que l'on aura préalablement nourris, à savoir des **poussins âgés** - ayant terminé leur croissance - pour lesquels le nourrissage (épisodique) à terre est tout à fait naturel. L'étude des variations de la leptinémie en période post-prandiale permettrait de déterminer si chez le manchot cette hormone est impliquée dans la régulation à très court terme de la balance énergétique.

L'étude des **interrelations entre leptine et reproduction** pourrait être abordée de deux manières. En premier lieu, en recherchant s'il existe au cours de la reproduction une relation entre les concentrations circulantes de différentes hormones sexuelles (testostérone, œstrogènes) et celle de la leptine. La période la plus favorable pour une telle étude est sans doute le début de la reproduction (formation des couples, copulation, ponte), période pendant laquelle de fortes variations spontanées des concentrations plasmatiques de ces hormones sont observées. Par ailleurs, l'effet d'un traitement chronique avec de la testostérone et des œstrogènes sur la leptinémie pourrait être étudié sans grandes difficultés. On est en effet capable actuellement de perfuser en continu des manchots royaux porteurs d'un cathétérisme veineux et d'une pompe à perfusion ambulatoire, et donc libres de leurs mouvements. Un tel système a de plus l'avantage de réduire le stress de manipulation des animaux qu'impliqueraient des injections répétées.

Enfin, il serait possible d'appréhender les modalités de la **régulation de la leptinémie lors du jeûne** en étudiant les effets de l'administration d'insuline, de glucagon ou de triiodothyronine, connues pour avoir une implication majeure dans le métabolisme énergétique des oiseaux (et aussi des mammifères). Cette étude devrait être effectuée non seulement chez des animaux en **jeûne de reproduction** mais aussi chez des animaux en **jeûne de mue**, dont le métabolisme est soumis à de nombreux remaniements, en particulier à une stimulation simultanée du catabolisme des protéines musculaires (production d'acides aminés) et des synthèses protéiques (kératine des nouvelles plumes).

Nous voyons donc que le manchot royal offre de par ses caractéristiques écologiques et physiologiques (jeûne prolongé associé à différentes activités, phases d'engraissement, liens étroits entre réserves énergétiques et reproduction, etc.) de multiples possibilités et situations *naturelles* pour comprendre le rôle de la leptine dans le contrôle de la balance énergétique et de la reproduction. Mais le manchot pourrait nous réserver d'autres surprises et permettre de révéler de nouvelles fonctions de la leptine, comme le suggère par exemple notre mise en évidence d'une forte expression du gène LEP dans le poumon de jeunes manchots.

De telles perspectives montrent tout l'intérêt des recherches écophysiologiques et de l'utilisation en recherche fondamentale d'animaux sauvages, en complément des animaux de laboratoire ou d'élevage, plus classiques. N'oublions pas cependant que le manchot, comme toute espèce sauvage, mérite respect et protection, et que nous devons toujours avoir cette notion à l'esprit lors de nos recherches sur cet animal.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
M. GUICHARD Philippe, Jean-Luc, René
a été admis(e) sur concours en : 1997
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12 septembre 2001
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Hervé LEFEBVRE, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
déclare que j'ai lu la thèse de :
M. GUICHARD Philippe, Jean-Luc, René
intitulée :
La leptine chez le manchot royal : expression du gène, évolution des concentrations plasmatiques au cours du jeûne
et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



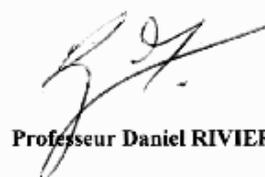
Professeur Hervé LEFEBVRE

**Vu :
Le Directeur par intérim
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Professeur Gilbert BONNES

**Vu :
Le Président de la thèse :**



Professeur Daniel RIVIERE

**Vu le : 24 septembre 2001
Le Président
de l'Université Paul Sabatier**



Professeur Raymond BASTIDE



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahima R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., Qu D., Lowell B., Maratos-Flier E., Flier J.S.** 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, **382**, 250-252.
- Ahima R.S., Saper C.B., Flier J.S., Elmquist J.K.** 2000a. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.*, **21**, 263-307.
- Ahrén B., Larsson H., Wilhelmsson C., Näsman B., Olsson T.** 1997. Regulation of circulating leptin in humans. *Endocrine*, **7**, 1-8.
- Ashwell C.M., Czerwinski S.M., Brocht D.M., McMurtry J.P.** 1999a. Hormonal regulation of leptin expression in broiler chicken. *Am. J. Physiol.*, **276**, R226-R232.
- Ashwell C.M., McMurtry J.P., Wang X.-H., Zhou Y., Vasilatos-Younken R.** 1999b. Effects of growth hormone and pair-feeding on leptin mRNA expression in liver and adipose tissue. *Domest. Anim. Endocrinol.*, **17**, 77-84.
- Baile C.A., Della-Fera M.A., Martin R.J.** 2000. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu. Rev. Nutr.*, **20**, 105-127.
- Benomar Y., Taouis M., Rideau N.** 2000. La leptine inhibe la sécrétion d'insuline du poulet. *Nutr. Clin. Métab. (Tours, France)*, **14**, CO7-127.
- Bertile F.** 2000. Leptinémie et expression du gène *ob* lors du jeûne prolongé et de la réalimentation chez le rat : implication dans la régulation des réserves énergétiques. *Mémoire, DEA, Physiologie intégrée en conditions extrêmes, Lyon I & Saint-Etienne*, 53 p.
- Boyer B.B., Ormseth O.A., Buck L., Nicolson M., Pellemounter M.A., Barnes B.M.** 1997. Leptin prevents posthibernation weight gain but does not reduce energy expenditure in arctic ground squirrels. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118**, 405-412.
- Cherel Y., Robin J.-P., Le Maho Y.** 1988a. Physiology and biochemistry of long-term fasting in birds. *Can. J. Zool.*, **66**, 159-166.
- Cherel Y., Robin J.-P., Walch O., Karmann H., Netchitailo P., Le Maho Y.** 1988b. Fasting in king penguin. I- Hormonal and metabolic changes during breeding. *Am. J. Physiol.*, **254**, R170-R177.
- Cioffi J.A., Van Blerkom J., Antczak M., Shafer A., Wittmer S., Snodgrass H.R.** 1997. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 467-472.
- Coleman D.L., Humel K.P.** 1969. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am. J. Physiol.*, **217**, 1298-1304.
- Coleman D.L.** 1973. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, **9**, 294-298.

- Considine R.V. & Caro J.F.** 1997. Leptin and the regulation of body weight. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**, 1255-1272.
- Denbow D.M., Meade S., Robertson A., McMurtry J.P., Richards M., Ashwell C.** 2000. Leptin-induced decrease in food intake in chickens. *Physiol. Behav.*, **69**, 359-362.
- Dridi, S., Raver, N., Gussakovsky E.E., Derouet M., Picard M., Gertler A., Taouis M.** 2000a. Biological activities of recombinant chicken leptin C4S analog compared with unmodified leptins. *Am. J. Physiol.*, **279**, E116-123.
- Dridi S., Williams J., Bruggeman V., Onagbesan M., Raver N., Decuypere E., Djiane J., Gertler A., Taouis M.** 2000b. A chicken leptin specific radioimmunoassay. *Domest. Anim. Endocrinol.*, **18**, 325-335.
- Flier J.S.** 1998. What's in a name ? In search of leptin's physiologic role. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 1407-1413.
- Friedman J.M. & Halaas J.L.** 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395**, 763-770.
- Frühbeck G., Gómez-Ambrosi J., Muruzábal F.J., Burrell M.A.** 2001 The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol.*, **280**, E827-E847
- Gauthier-Clerc M., Le Maho Y., Gendner J.-P., Durant J., Handrich Y.** 2001. State-dependant decisions in long term fasting king penguin, *Aptenodytes patagonicus*, during courtship and incubation. *Anim. Behav.*, **61**, 000-000
- Groscolas R.** 1990. Metabolic adaptations to fasting in emperor and king penguins. In : *Penguin Biology* (Ed. by L.S. Davis, & J.T. Darby), pp. 269-295. San Diego : Academic press.
- Groscolas R., Decrock F., Robin J.-P., Bach A., Mioskowski E.** 1998. Changes in plasma leptin during long-term fasting and refeeding in the rat : relation to fat mass and insulinemia. *Int. J. Obesity*, **22**, suppl.3, S171.
- Groscolas R., Decrock F., Thil M.-A., Fayolle C., Boissery C., Robin J.-P.** 2000. Refeeding signal in fasting-incubating king penguins : changes in behavior and egg temperature. *Am. J. Physiol.*, **279**, R2104-R2112.
- Groscolas R. & Robin J.-P.** 2001. Long-term fasting and refeeding in penguins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **128**, 645-655.
- Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burley S.K., Friedman J.M.** 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the *obese* gene. *Science*, **269**, 543-546.
- Harris R.B.S.** 2000. Leptin – Much more than a satiety signal. *Annu. Rev. Nutr.*, **20**, 45-75.

- Kennedy G.C.** 1953. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Lond.*, **140**, 578-592.
- Kronfeld-Schor N., Richardson C., Silvia B.A., Kunz T.H., Widmaier E.P.** 2000. Dissociation of leptin secretion and adiposity during prehibernation fattening in little brown bats. *Am. J. Physiol.*, **279**, R1277-R1281.
- Lord G.M., Matarese G., Howard J.K., Baker R.J., Bloom S.R., Lechler R.I.** 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, **394**, 897-901
- Murakami T., Otani S., Honjoh T., Doi T., Shima K.** 2001. Influence of the presence of OB-Re on leptin radioimmunoassay. *J. Endocrinol.*, **168**, 79-86.
- Nieminen P., Asikainen J., Hyvarinen H.** 2001. Effects of seasonality and fasting on the plasma leptin and thyroxin levels of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) and the blue fox (*Alopex lagopus*). *J. Exp. Zool.*, **289**, 109-118.
- Ohkubo T., Tanaka M., Nakashima K.** 2000. Structure and tissue distribution of chicken leptin receptor (cOb-R) mRNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **1491**, 303-308.
- Olsson O.** 1995. Timing and body-reserve adjustments in king penguin reproduction. *Ph.D. Thesis*, Faculty of Science and Technologie, Uppsala University.
- Ormseth O.A., Nicolson M., Pellemounter M.A., Boyer B.B.** 1996. Leptin inhibits prehibernation hyperphagia and reduces body weight in arctic ground squirrels. *Am. J. Physiol.*, **271**, R1775-R1779.
- Paolisso G., Rizzo M.R., Mone C.M., Tagliamonte M.R., Gambardella A., Riondino M., Carella C., Varricchio M., D'Onofrio F.** 1998. Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentration in healthy subjects. *Clin. Endocrinol.*, **48**, 291-297.
- Raver N., Taouis M., Dridi S., Derouet M., Simon J., Robinzon B., Djiane J., Gertler A.** 1998. Large-scale preparation of biologically active recombinant chicken obese protein (leptin). *Protein Expr. Purif.*, **14**, 403-408.
- Reidy S.P. & Weber J.-M.** 2000. Leptin : an essential regulator of lipid metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, **125**, 285-297.
- Richards M.P., Ashwell C.M., McMurtry J.P.** 1999. Analysis of leptin gene expression in chicken using reverse transcription polymerase chain reaction and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, **853**, 321-335.
- Robin J.-P., Boucontet L., Chillet P., Groscolas R.** 1998. Behavioral changes in fasting emperor penguins : evidence for a "refeeding signal" linked to a metabolic shift. *Am. J. Physiol.*, **274**, R746-R753.

- Robin J.-P., Fayolle C., Decrock F., Thil M.-A., Côté S.D., Bernard S., Groscolas R.** In press. Restoration of body mass in King Penguins after egg abandonment at a critical energy depletion state : early vs late breeders. *J. Avian Biol.*, **32**.
- Sato K., Nishida M., Takahashi T., Akiba Y.** 2000. Nutritional regulation of leptin expression in adipose tissues of broiler chickens. *Proceeding of the XXI World's Poultry Congress*, Montreal, Canada, p27.
- Schneider J.E., Zhou D., Blum R.M.** 2000. Leptin and metabolic control of reproduction. *Horm. Behav.*, **37**, 306-326.
- Schwartz M.W., Baskin D.G., Kaiyala K.J., Woods S.C.** 1999. Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**, 584-596.
- Taouis M., Chen J.-W., Daviaud C., Dupont J., Derouet M. & Simon J.** 1998. Cloning the chicken leptin gene. *Gene*, **208**, 239-242.
- Weigle D.S., Barton Duell P., Connor W.E., Steiner R.A., Soules M.R., Kuijper J.L.** 1997. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 561-565.
- Widmaier E.P., Long J., Cadigan B., Gurgel S., Kunz T.H.** 1997. Leptin, Corticotropin-Releasing Hormone (CRH), and Neuropeptide Y (NPY) in free-ranging pregnant bats. *Endocrine*, **7**, 145-150.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.** 1994. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue ; *Nature*, **372**, 425-432.

RESUME – La leptine chez le manchot royal : expression du gène, évolution des concentrations plasmatiques au cours du jeûne

Notre travail avait pour objectif de démontrer la présence de leptine chez un oiseau sauvage, le manchot royal, et de rechercher si cette hormone pouvait intervenir dans le signal de réalimentation qui, en dessous d'un épuisement critique des réserves énergétiques, redirige l'activité de l'animal vers la recherche alimentaire aux dépens du comportement d'incubation.

Nous avons mis en évidence l'expression du gène LEP dans une variété de tissus (tissu adipeux, foie, poumon, muscles, rein, intestin, cœur, cerveau) bien plus large que ce qui avait été observé jusqu'alors chez le principal oiseau étudié, le poulet. Le séquençage d'un fragment du gène LEP a révélé 99% d'homologie entre le manchot royal et cette espèce.

Diverses validations ont permis de montrer qu'un dosage radio-immunologique spécifique du poulet était applicable à la mesure de la leptinémie du manchot, avec cependant certaines limites. Il n'en reste pas moins que notre travail fournit les premières données de leptinémie chez un oiseau sauvage. Au cours d'un jeûne de 30 jours chez des manchots captifs non couveurs, la leptinémie augmente significativement alors que la masse adipeuse baisse de plus de 90 % ; l'entrée en phase III du jeûne n'est pas associée à une baisse de la leptinémie. Par ailleurs, chez des animaux couveurs abandonnant leur œuf, la leptinémie n'est pas différente de celle mesurée chez des animaux normalement relevés par leur partenaire ou en début d'incubation.

En conclusion, la concentration circulante de leptine ne semble pas jouer un rôle d'adipostat lors du jeûne d'incubation du manchot royal, les variations de la leptinémie étant dissociées de celles de la masse adipeuse. De plus, nos données actuelles, ne permettent pas de conclure à un rôle majeur de la leptine dans la régulation du comportement de recherche alimentaire chez cette espèce.

Mots-clés : oiseau – équilibre énergétique – dosage radio-immunologique – séquence génique

ABSTRACT – Leptin in the king penguin : gene expression, evolution of circulating leptin while fasting

This study aimed at evidencing leptin in a wild bird, the king penguin, and at determining whether this hormone plays a role in the refeeding signal that, below a critical exhaustion of energy reserves, redirects the activity of fasting penguins towards feeding behaviour at the expense of incubation.

We observed an expression of the leptin gene in a greater diversity of tissues (adipose tissue, liver, lung, muscles, kidney, gut, heart, brain) that previously reported in the chicken, the main studied bird. By sequencing a fragment of leptin gene, we demonstrated 99 percent homology between the king penguin and this species.

Various tests of validity showed that a chicken-specific radio-immuno-assay was suitable for measuring plasma leptin in the king penguin, with some limitations. We therefore present the first data on plasma leptin in a wild bird. During a 30 day fast in captive non-incubating penguins, plasma leptin increased significantly whereas fat mass decreased by about 90 percent. The entrance into phase III (high body protein catabolism) was not associated with a decrease in plasma leptin, as could be expected. At egg abandonment in fasting-incubating penguins, plasma leptin was similar to that at the onset of incubation and at normal relief.

Thus, the plasma leptin level does not seem to act as an adipostat in naturally fasting and incubating king penguins. Changes in circulating leptin are indeed dissociated from that in fat mass. Moreover, our data do not allow to conclude in a major role of leptin in regulating feeding behaviour in such a species.

Key-words : bird – energy balance – radio-immuno-assay – gene sequence