

2m11.3284.6

Université de Montréal

Étude de la sécrétion de la leptine gastrique chez le rat

Par
Christian Renaud

11624921

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue d'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

JANVIER 2005

©CHRISTIAN RENAUD, 2005



w

4

U58

2005

v.096

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Étude de la sécrétion de la leptine gastrique chez le rat

présenté par:

Christian Renaud

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Emile Levy.....président-rapporteur

Docteur Edgar Delvin.....directeur de recherche

Docteur Moïse Bendayan.....codirecteur

Docteur Cheri L. Deal.....membre du jury

Mémoire accepté le : 7 avril 2005

RÉSUMÉ

La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes et impliquée dans la régulation de la balance énergétique. Récemment, la leptine a aussi été retrouvée au niveau de l'estomac chez le rat et chez l'humain. Nous avons donc démontré par microscopie optique et électronique la voie de sécrétion de la leptine dans les cellules principales de l'estomac de rat. La leptine est principalement sécrétée de façon exocrine via une voie régulée. Nous avons aussi démontré la présence de récepteurs à la leptine au niveau des granules de sécrétions des cellules principales pouvant suggérer la sécrétion de la leptine sous sa forme liée à son récepteur. La microscopie électronique nous a permis de localiser plus précisément le récepteur de la leptine au niveau de la membrane plasmique des microvillosités des entérocytes. La sécrétion exocrine de la leptine ainsi que la localisation luminale de son récepteur au niveau de l'intestin grêle suggère l'existence d'un axe gastro-intestinal par lequel la leptine pourrait influencer certaines fonctions du tractus digestif. Nous avons démontré par des évaluations quantitatives en immunocytochimie ainsi que par la méthode ELISA que la quantité de leptine retrouvée dans l'estomac des rats diabétiques n'est pas significativement différente de celle retrouvée chez les rats normaux. Toutefois, nos résultats suggèrent que la quantité de leptine gastrique retrouvée chez les rats fa/fa soit légèrement augmentée. Un taux de leptine gastrique augmenté chez les rats fa/fa est fortement compatible avec l'existence d'un mécanisme d'autorégulation via une voie autocrine.

Mots clés : diabète, estomac, leptine, obésité, récepteur à la leptine, voie de sécrétion

SUMMARY

Leptin is a hormone secreted by adipocytes and implicated in energetic homeostasis. In the last few years, leptin has been found in the rat and the human stomach. We have revealed by light and electron microscopy the secretory pathway of leptin in the chief cells of the stomach. Leptin is mainly secreted through a regulated exocrine pathway. We have shown that the leptin receptor is also present in the secretory granules of chief cells suggesting the possibility of receptor-bound leptin secretion in the stomach. Electron microscopy helped us to precisely identify leptin receptor at the plasma membrane of the intestinal cells at the level of the microvilli. Our description of exocrine leptin secretion as well as leptin receptor location in the intestinal microvilli strongly suggest the existence of a gastro-intestinal axis by which leptin could influence the function of the digestive tract. We have shown by quantitative evaluations in immunocytochemistry and by the ELISA method that leptin content is quite similar in the stomach of insulin-deficient diabetic rats and normal rats. Nevertheless, our results suggest that the quantity of leptin in the stomach of obese *fa/fa* rats is higher than that found in normal rats. Higher leptin contents may reflect the existence of an auto-regulation of leptin production by activation of the leptin receptor.

Key words : diabetes, leptin, leptin receptor, obesity, secretion pathway, stomach

TABLE DES MATIÈRES

	page
PAGE TITRE.....	i
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xv
INTRODUCTION.....	1
<i>Obésité et diabète</i>	2
<i>La leptine</i>	4
<i>Récepteur de la leptine</i>	8
<i>Voie de signalisation</i>	11
<i>Localisation du récepteur</i>	12

<i>Rôle de la leptine au niveau du SNC et du métabolisme énergétique</i>	13
<i>Les autres hormones impliquées dans le métabolisme énergétique</i>	17
<i>Rôle de la leptine au niveau de la satiété</i>	19
<i>Régulation de la production de la leptine</i>	20
<i>Autres rôles joués par la leptine</i>	23
<i>La leptine au niveau du tube digestif</i>	26
<i>La sécrétion gastrique de leptine</i>	27
<i>Le récepteur de la leptine au niveau intestinal</i>	30
<i>Rôle de la leptine au niveau gastrique et intestinal</i>	31
<i>Satiété</i>	31
<i>Cytoprotection</i>	32
<i>Absorption</i>	33
<i>Inflammation</i>	37
<i>Leptine gastrique et période périnatale</i>	38
<i>Leptine et obésité / diabète</i>	39
<i>Modèle animal fa/fa et streptozotocine</i>	39
<i>Diabète type 1 et type 2</i>	43
<i>Objet du présent travail</i>	45
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	47
<i>Généralités</i>	48
<i>Modèles animaux</i>	48
<i>Anticorps primaires</i>	49
<i>Immunohistochimie</i>	50
<i>Tissus utilisés</i>	50
<i>Immunodétection</i>	50

<i>Immunocytochimie</i>	51
<i>Tissus utilisés</i>	51
<i>Immunomarquage</i>	52
<i>Évaluation quantitative</i>	53
<i>Western Blot et ELISA</i>	55
<i>Tissus utilisés</i>	55
<i>Électrophorèse, transfert et marquage des protéines</i>	56
<i>Principe de l'ELISA</i>	58
<i>Technique de l'ELISA</i>	58
RÉSULTATS	61
<i>Sécrétion de la leptine gastrique chez le rat Sprague Dawley normal</i>	62
<i>Immunohistochimie</i>	62
<i>Immunocytochimie</i>	62
<i>Évaluation quantitative</i>	63
<i>Récepteur de la leptine au niveau gastrique et intestinal</i>	64
<i>Leptine gastrique chez le rat diabétique et chez le rat fa/fa</i>	66
<i>Immunohistochimie</i>	66
<i>Immunocytochimie</i>	67
<i>Évaluation quantitative</i>	67
<i>Western Blot</i>	68
<i>ELISA</i>	69
<i>Figures</i>	70
<i>Tableaux</i>	82
DISCUSSION	85

<i>Sécrétion de la leptine gastrique chez le rat normal</i>	87
<i>Sécrétion de la leptine liée à son récepteur</i>	90
<i>Étude du récepteur à la leptine dans l'intestin de rat</i>	92
<i>Étude de la leptine gastrique chez le rat diabétique et chez le rat fa/fa</i>	93
CONCLUSION	100
RÉFÉRENCES	103

LISTES DES TABLEAUX

	page
Tableau I : Évaluation quantitative de la densité de marquage à l'or colloïdal pour la leptine gastrique chez le rat normal	82
Tableau II : Évaluation quantitative de la densité de marquage à l'or colloïdal pour la leptine gastrique chez différents modèles animaux.....	83
Tableau III : Dosage de la leptine gastrique par la méthode ELISA chez différents modèles animaux.....	84

LISTE DES FIGURES

	page
Figure 1 : Liste des mutations pouvant causer une obésité monogénique chez la souris ainsi que le gène, la protéine et le phénotype associés à chaque mutation.....	5
Figure 2 : Schématisation du rôle de la leptine et de l'insuline dans le contrôle du métabolisme énergétique.....	17
Figure 3 : Localisation de la leptine dans la muqueuse gastrique de rat normal par immunohistochimie en microscopie optique.....	70
Figure 4 : Immunocytochimie à l'or colloïdal de la leptine dans les cellules principales de l'estomac de rat normal.....	72
Figure 5 : Localisation du récepteur à la leptine dans la muqueuse gastrique de rat normal par microscopie optique et électronique.....	74
Figure 6 : Immunocytochimie à l'or colloïdal du récepteur à la leptine dans les entérocytes.....	76
Figure 7 : Localisation de la leptine dans la muqueuse gastrique de rat normal, de rat diabétique et de rat fa/fa par immunohistochimie en microscopie optique.....	78
Figure 8 : Western blot de la leptine gastrique.....	80
Figure 9 : Axe gastro-entérique de la leptine.....	93

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ACTH	adrénocorticotropine (hormone corticotrope)
ADN	acide désoxyribonucléique
AgRP	agouti-related peptide
ApoA-I	apolipoprotéine AI
ApoA-IV	apolipoprotéine AIV
ApoB-100	apolipoprotéine B100
ApoB-48	apolipoprotéine B48
ApoE	apolipoprotéine E
ARNm	acide ribonucléique messenger
ASA	acide acétylsalicylique
<i>A^y</i>	<i>lethal yellow</i> (mutation avec surproduction de la protéine agouti)
BCA	acide bicinchoninic
CART	cocaine-and-amphetamine-regulated-transcript
CCK	cholecystokinine
CCK-8	cholecystokinine octapeptide (peptide biologiquement actif)
CD147	corécepteur appartenant à la superfamille des immunoglobulines
cellules CACO-2	human colon adenocarcinoma cell (développent plusieurs caractéristiques des entérocytes matures)
cNOS	constitutive nitric oxyde synthase
CRH	corticotropine-releasing hormone
Cys	cystéine
DAB	3,3'-diaminobenzidine
<i>db</i>	<i>diabetes</i> (mutation avec inhibition du récepteur à la leptine)
DTT	dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
<i>fat</i>	<i>fatty</i> (mutation avec inhibition du récepteur à la leptine)

G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor receptor
GH	growth hormone
GHS-receptor	growth hormone secretagogue receptor
Gln	glutamine
GLP-1	glucagon like peptide 1
GLUT2	glucose transporter in the intestinal basolateral membrane
GLUT5	fructose transporter in the intestinal brush border membrane
Gly	glycine
gp130	glycoprotéine 130
H. pylori	helicobacter pylori
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HDL	high-density lipoprotein
HUB219.1	human leptin receptor isoforme 1
HUB219.2	human leptin receptor isoforme 2
HUB219.3	human leptin receptor isoforme 3
HUOB-R	human leptin receptor long form
I-FABP, L-FABP	intestinal and liver fatty acid binding proteins
IgG	immunoglobuline de type G
IL-6	interleukine 6
IMC	indice de masse corporelle
iNOS	inducible nitric oxyde synthase
JAK	Janus kinase
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LDL	low-density lipoprotein
LHA	lateral hypothalamic area
LIF	leukemia inhibitory factor
MAPK	activated protein kinase
MC3 et MC4	melanocortin receptor 3 et 4
MCT-1	monocarboxylate transporter type 1
MSH	melanocortin stimulating hormone

NaCl	chlorure de sodium
NaIO ₄	métapériodate de sodium
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NO	oxyde nitrique
NPY	neuropeptide Y
<i>ob</i>	<i>obese</i> (mutation avec absence de production de leptine)
OB-R	récepteur à la leptine
Ob-Ra	isoforme a du récepteur à la leptine
Ob-Rb	isoforme b du récepteur à la leptine
Ob-Rc	isoforme c du récepteur à la leptine
Ob-Rd	isoforme d du récepteur à la leptine
Ob-Re	isoforme e du récepteur à la leptine
Ob-Rf	isoforme f du récepteur à la leptine
PBS	phosphate-buffered saline
PEG	polyéthylène glycole
PepT-1	peptide transporter (H ⁺ dépendant) in the intestinal brush border membrane
PFA	perifornical area
pH	concentration en ions hydrogène
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
POMC	proopiomelanocortine
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor
Pro	proline
PVN	paraventricular nucleus
RIA	radioimmune assay
RPM	rotation per minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulphate
Ser	serine
SGLT1	Na ⁺ /glucose transporter in the intestinal brush border membrane
SNC	système nerveux central

STAT	signal transducers and activators of transcription
Substitution A pour G	substitution adénine pour guanine
TBS	tris buffered saline
TGF α	transforming growth factor alpha
Thr	threonine
TMB	3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine
TNF- α	tumor necrosis factor
TRH	thyropropin-releasing hormone
Tris-HCl	aminomethane hydrochloride
<i>tub</i>	<i>tubby</i> (mutation avec perte de fonction de la protéine tubby)

REMERCIEMENTS

Quelle aventure d'entreprendre le programme MD-MSc. Beaucoup de détermination et de persévérance ont permis de rendre ce projet à terme. Je tiens à remercier Dr Moïse Bendayan qui a cru en moi et qui, tout au long de ce long travail n'a cessé de m'encourager et de veiller sur moi. Il a su faire preuve d'une compréhension et d'une souplesse exceptionnelle. Sans vous, je n'aurais jamais accompli tout ce que j'ai fait. Je tiens aussi à remercier Dr Edgard Delvin qui a tout de suite accepté de m'épauler dans ce projet d'envergure que plusieurs auraient jugé irréaliste. Entreprendre de faire en parallèle sa médecine et une maîtrise en sciences fondamentales n'est certainement pas un projet de tout repos. Les Drs Bendayan et Delvin ont su respecter mes tâches cliniques tout en m'offrant de m'épanouir dans leurs laboratoires respectifs. Grâce à leurs équipes des plus motivantes j'ai pris goût au défi que représente la recherche fondamentale. Ce goût de la recherche est sans aucun doute la plus belle récompense que je retire de cette expérience.

Si j'ai réussi à mettre le temps nécessaire afin de réaliser cette maîtrise, c'est en grande partie grâce à mon amour et complice de tous les jours, Virginie. Merci pour tout ce que tu fais pour moi. Tes encouragements me permettent de continuer et de me surpasser.

Merci aussi à Diane Gingras, mon mentor dans l'art de l'incubation... et bien plus encore!! C'est sûrement grâce à toi si j'arrivais au labo avec un sourire aux lèvres.

Ta bonne humeur, ta sincérité et ton dévouement font de toi un bijou pour le laboratoire du Dr Bendayan. Je ne te serai jamais assez reconnaissant!

Merci à toutes les autres personnes que j'ai pu rencontrer dans les quatre années où j'ai côtoyé les laboratoires du Dr Bendayan et du Dr Delvin. Je pense surtout à Irène Londono pour ta gentillesse incroyable, Elizabeth pour ton coup de main fort apprécié, ainsi que Saoussen, Gaetan et Simon-Philippe pour votre compagnie. Je pense aussi à Carole, Louise et à toute l'équipe du centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine. Merci à Philippe de continuer ce travail sur la leptine qui me tenait si à cœur.

Merci particulier à tous ceux qui m'ont soutenu... Lisette et Denis (des parents toujours présents), Ahmed et Anne-Sophie (des amis en or), tous mes autres amis ainsi que les autres membres de ma famille...

Finalement, merci au FRSQ (Fonds de recherche en santé du Québec) pour la bourse qui m'a permis de travailler sans me soucier de mes ressources financières.

INTRODUCTION

Obésité et diabète

L'obésité et le diabète représentent deux grands fléaux de la société nord-américaine du 21^e siècle. Les études épidémiologiques se multiplient par centaines de par le monde pour crier à l'unisson que l'obésité est une épidémie dévastatrice qui s'attaque tant aux adultes qu'aux enfants.

L'obésité, définie comme étant un IMC $> 30 \text{ kg/m}^2$, augmente directement le risque de décès prématuré secondaire à la maladie coronarienne, aux maladies thrombo-emboliques, au diabète de type 2, aux maladies de la vésicule biliaire et à différents types de cancer (Katzmarzyk et al, 2004). Il faut aussi ajouter la morbidité importante pouvant être causée par les maladies ostéoarticulaires tel que l'arthrose ou encore les complications pulmonaires directement liées à l'obésité tel que l'apnée du sommeil et le syndrome restrictif. Le bilan médical est lourd et pourtant, le taux d'obésité au Canada ne cesse d'augmenter. Les Canadiens ont effectué environ 1,6 million de consultations auprès de médecins pour des problèmes d'obésité au cours de la période de 12 mois qui s'est terminée en juin 2004 (IMS health, 2004). Le nombre de consultations pour des problèmes d'obésité a doublé depuis 1998. Le coût médical directement lié à l'obésité avait été estimé en 1997 à 1,8 million de dollars soit 2,4% des coûts médicaux totaux, il est donc facile d'évaluer les coûts engendré actuellement par la hausse fulgurante des consultations pour des problèmes d'obésité (Birmingham et al, 1999).

La prévalence de l'obésité n'a cessé d'augmenter au sein de la population canadienne. En fait, elle a plus que doublé au cours d'une période de 13 ans avec des taux de 5,6% en 1985, 9,2% en 1990, 13,4% en 1994 et 14,8% en 1998 (Katzmarzyk, 2002). Considérant que la population était de 22,2 million en 1998, la prévalence de l'obésité se chiffrait à 3,3 millions de Canadiens obèses. Par comparaison, la prévalence de l'obésité aux États-Unis était de 17,9% en 1998 et aurait augmenté à 19,8% en 2000 démontrant toujours la croissance effrénée de cette épidémie (Mokdad et al, 1999; Mokdad et al, 2001). Une autre équipe a même évalué à 30,6% la prévalence de l'obésité aux États-Unis dans la période entre 1999 et 2002 (Hedley et al, 2004).

Selon une étude récente publiée dans le Journal de l'Association médicale canadienne, la prévalence de l'obésité a triplé chez les enfants avec des taux de 5% chez les garçons et les filles en 1981 augmentant à 16,6% pour les garçons en 1996 et 14,6% pour les filles aussi en 1996 (Tremblay et Willms, 2000). L'impact de cette obésité pédiatrique sur notre société est encore inconnu.

L'obésité et par conséquent le diabète de type 2 qui lui aussi subit une augmentation marquée de sa prévalence sont deux maladies chroniques et sérieuses qui auront d'importantes conséquences sur notre système de santé dans les années à venir. Pourtant, la pathophysiologie de ces deux maladies demeure encore obscure. Beaucoup de recherches se sont faites dans le domaine de l'obésité et du diabète afin de mieux comprendre la physiologie normale ainsi que la pathophysiologie de l'homéostasie

énergétique. Des développements récents ont permis de découvrir des hormones impliquées dans le métabolisme énergétique et dont les rôles respectifs sont encore à définir. La leptine, l'objet du présent mémoire, est l'une de ces hormones.

La leptine

Dans l'inlassable recherche de la pathogenèse moléculaire de l'obésité, cinq mutations monogéniques ont été identifiées initialement et associées à un phénotype d'obésité sévère (figure 1). Il s'agit des mutations *Ay*, *db*, *fat*, *ob* et *tub* (Chagnon et Bouchard, 1996; Leibel et al, 1997; Chen et Garg, 1999; Barsh et al, 2000; Kahle et al, 1997). La première de ces mutations récessives a été identifiée en 1950, il s'agissait de la mutation *ob* (Ingalls et al, 1950). Cette mutation fut associée à un syndrome dont les majeures composantes sont une obésité importante et un diabète de type 2 (Friedman et al, 1991). Il y a longtemps, l'hypothèse de l'homéostasie métabolique via un facteur lipostatique provenant des graisses et agissant au cerveau avait été proposée (Kennedy, 1953). Ce n'est que quelques années plus tard que l'existence de ce facteur fut prouvé grâce à des expériences de circulation croisée, aussi appelées parasymbiose (Hervey, 1959). Effectivement, en croisant la circulation d'un rat rendu obèse suite à une lésion de l'hypothalamus ventromédial et d'un rat contrôle, Hervey (1959) démontra le décès du second rat par dénutrition suite à une sécrétion augmentée, chez le rat obèse, d'un facteur de satiété. Ainsi, dans la même optique, Coleman et Hummel (1969) reprirent les expériences de Hervey mais cette fois en croisant les circulations d'une souris *ob/ob*

<i>Mutation</i>	<i>Gène</i>	<i>Protéine</i>	<i>Animal</i>	<i>Phénotype</i>
<i>Ay (lethal yellow)</i>	<i>agouti</i>	Agouti signaling protein	souris	Couleur jaunâtre Hyperphagie Obésité Hyperinsulinémie Infertilité
<i>db (diabetes)</i>	<i>Lepr</i>	Récepteur à la leptine	souris	Obésité précoce Diabète Hyperphagie Hypothermie Hypercorticotéronémie Infertilité
<i>fat</i>	<i>Cpe</i>	Carboxypeptidase E	souris	Obésité tardive Infertilité Hyperproinsulinémie
<i>ob (obese)</i>	<i>Lep</i>	leptine	souris	Obésité précoce Diabète Hyperphagie Hypothermie Hypercorticotéronémie Infertilité
<i>tub</i>	<i>tubby</i>	Phosphodiesterase (tubby protein)	souris	Obésité tardive Absence de diabète Surdité Dégénérescence rétinienne

Figure 1 : Liste des mutations pouvant causer une obésité monogénique chez la souris ainsi que le gène, la protéine et le phénotype associés à chaque mutation.

et d'une souris contrôle. Les résultats suggèrent fortement que le gène *ob* code pour un facteur circulant de satiété capable aussi d'agir sur le métabolisme. Le même type d'expérience fut aussi réalisé avec les souris *db* (Coleman, 1973). La mutation *db* est l'une des cinq mutations qui avaient été identifiées initialement et pouvant causer une obésité monogénique. Contrairement aux expérimentations sur les souris *ob/ob* qui démontraient une perte de poids de la souris obèse, celles réalisées sur les souris *db/db* démontrèrent une perte de poids chez la souris contrôle suggérant un défaut dans le récepteur chez les souris *db/db* et une hyperproduction du facteur de satiété, causant

ainsi l'extrême amaigrissement de la souris contrôle. Ainsi furent établies les premières hypothèses concernant la nature des gènes *ob* et *db* qui allaient devenir une voie d'avenir dans le domaine de l'homéostasie métabolique.

Ce n'est que deux décennies plus tard que le clonage positionnel et le séquençage du gène *ob* chez la souris et chez l'homme fut rapporté pour la première fois (Zhang et al, 1994). En plus d'identifier le gène, l'équipe de Zhang a identifié une mutation nonsense C57BL/6J *ob*/*ob* qui produit une surproduction d'ARNm. Cette mutation est en fait une substitution Cys-Thr qui résulte en un codon stop à la position 105 produisant une protéine tronquée incapable de sortir de la cellule. Toujours la même équipe identifia aussi une altération génomique SM/Ckc-^{DAC}*ob*^{2j}/*ob*^{2j} qui est associée à une absence de production d'ARNm. Plus tard, cette altération génomique fut identifiée comme étant l'insertion d'un transposon au niveau du premier intron empêchant la synthèse de l'ARNm (Moon et Friedman, 1997). Ces deux mutations vinrent donc confirmer l'exactitude du séquençage exécuté par ces chercheurs. Zhang et al. (1994) démontrèrent finalement une importante homologie du gène *ob* entre les vertébrés, témoignant possiblement d'une fonction hautement conservée; la protéine murine étant 84% identique à la protéine humaine. Malgré cette homologie importante, très peu de mutations furent décrites chez l'humain. Effectivement les cas rapportés de mutation au niveau du gène *ob* furent très rares. La première mutation fut décrite au sein de deux enfants Pakistanais de parents consanguins (Montague et al, 1997). Cette mutation était en fait une délétion d'une guanine au niveau du codon 133 causant un frameshift et par conséquent une protéine tronquée (Rau et al, 1999). Une autre équipe identifia une

mutation nonsense identique à la mutation retrouvée chez les souris C57B1/6J ob/ob (Strobel et al, 1998). Effectivement trois membres d'une famille turque ont exprimé cette mutation avec évidemment un phénotype d'obésité sévère ainsi que de nombreuses autres atteintes.

Chez la souris, le gène est situé au niveau du chromosome 6 alors que chez l'humain il se trouve sur le chromosome 7q31.3 (Zhang et al, 1994; He et al, 1995; Isse et al, 1995). Le gène ob est formé de 650 kb et consiste en 3 exons séparés de deux introns. Ce sont les deux derniers exons qui codent spécifiquement pour la protéine. Le gène ob est transcrit en un ARNm de 4,5 kilobases qui se traduit par la suite en une protéine de 167 acides aminés. La protéine codée par le gène ob fut nommée leptine, du grec leptos qui signifie mince (Halaas et al, 1995). La synthèse et la sécrétion de la leptine se fait principalement au niveau des adipocytes situés dans la graisse blanche mais d'autres sites de synthèse et de sécrétion ont été rapporté et seront discutés plus tard (Maffei et al, 1995). La leptine est une protéine circulante avec une masse moléculaire de 16 kDa chez la souris et chez l'humain (Halaas et al, 1995). Cette protéine est sécrétée de façon constitutive par les adipocytes car elle ne semble pas s'accumuler au sein de vacuoles cellulaires (Bornstein et al, 2000). Après avoir réussi à isoler et à recombiner la leptine, plusieurs équipes ont tenté de l'administrer à des souris ob/ob, à des souris normales et même à des souris présentant une obésité induite par la nourriture (Halaas et al, 1995; Halaas et al, 1997, Pelleymounter et al, 1995; Campfield et al, 1995). Ces premières expérimentations présentaient des résultats plutôt

encourageants, mais les expérimentations humaines sur des patients obèses sans mutation au niveau du gène *ob* ne furent pas aussi concluantes (Heymsfield et al, 1999).

Récepteur de la leptine

C'est en 1995 que fut isolé pour la première fois le récepteur de la leptine (Tartaglia et al, 1995). Pour identifier les sites de liaison de haute affinité pour la leptine, ils utilisèrent des protéines de leptine fusionnée à la phosphatase alcaline ainsi que des molécules de leptine marquées à l'iode 125. Parmi les nombreux sites de liaison identifiés, l'un d'entre eux est situé au niveau des plexus choroïdes. Afin de caractériser davantage le récepteur, ils démontrèrent une ressemblance aux récepteurs des cytokines de classe 1. En effet, le récepteur de la leptine est très semblable à la protéine gp130, au récepteur du IL-6, au récepteur du G-CSF et du LIF (Tartaglia, 1997). Il a aussi été démontré que le gène du récepteur est situé au niveau du chromosome 4 dans la même région qui contient le locus du gène *db* (Tartaglia et al, 1995). Tel qu'il a été mentionné précédemment, le gène *db* était fortement soupçonné d'être une mutation du récepteur à la leptine le rendant ainsi non fonctionnel. L'équipe de Tartaglia avait centré leurs travaux sur le tissu cérébral puisque dans la même année, Campfield et al. (1995) et Stephens et al. (1995) avaient démontré que l'introduction de leptine en petite dose au niveau du troisième ventricule pouvait agir en réduisant le poids des souris. Le récepteur à la leptine est en fait une protéine transmembranaire de 894 acides aminés, codée par un gène de 5.1 kb retrouvé sur le chromosome 4 chez la souris (Tartaglia et al, 1995). De cette longue protéine, une région de 816 acides aminés forme la région

extracellulaire. En comparant le récepteur de la leptine chez l'humain à celui de la souris, on découvre que celui de l'humain a une plus longue région intracellulaire même si la ressemblance du reste de la protéine est très importante (Chen et al, 1996). Cette observation soulève alors la possibilité d'un épissage alternatif. En tentant de cloner le récepteur à la leptine chez la souris *db/db*, ils réalisèrent que la séquence était la même que la séquence du récepteur initialement isolé, ils firent donc la prédiction que la mutation *db* affectait soit un autre récepteur ou un isoforme du récepteur obtenu par épissage alternatif.

Effectivement, l'année suivante fut ponctuée par l'identification de la mutation *db* au sein du gène OB-R et la démonstration de l'épissage alternatif en démontrant les nombreux isoformes du récepteur (Lee et al, 1996). Ils ont aussi comparé le récepteur de forme longue venant de la souris, qu'ils venaient d'identifier, avec celui retrouvé chez l'humain par l'équipe de Chen (1996) et une ressemblance de 78% a été décrite. De plus, deux régions en particulier sont hautement conservées, il s'agit de deux motifs très importants dans l'interaction avec les protéines Janus kinase et STAT (Chen et al, 1996; Lee et al, 1996). Le récepteur contient aussi plusieurs sérines ce qui est une caractéristique souvent retrouvée dans les récepteurs de cytokines en raison de leur rôle dans le signallement intracellulaire. Après l'identification de ce nouvel isoforme long chez la souris contrôle, la comparaison fut faite avec l'isoforme long chez la souris *db/db* C57B1/Ks. Ils trouvèrent que le gène OB-R chez la souris *db/db* possédait une insertion de 106 nucléotides située exactement au point où l'isoforme court diverge de l'isoforme long (Chen et al, 1996; Lee et al, 1996). Cette mutation résulte donc chez la

souris db/db en une protéine tronquée manquant le long domaine intracellulaire et qui est en tout point identique à la forme courte du récepteur. Un total de six isoformes fut identifié. Les isoformes Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Rf possèdent tous le domaine transmembranaire leur permettant de se fixer à la paroi cellulaire alors que l'isoforme Ob-Re est une protéine circulante (Lee et al, 1996). Parmi tous ces isoformes seul le récepteur Ob-Rb possède les motifs intracellulaires nécessaires à l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT.

Chez le rat Zucker fa/fa, une mutation a aussi été identifiée au niveau du récepteur à la leptine (Chua et al, 1996). Cette mutation est en fait une substitution Gln par Pro à la position 269 dans le domaine extracellulaire (Chua et al, 1996). Les conséquences sont principalement une diminution du nombre de récepteurs sur la surface cellulaire ainsi qu'une diminution de la capacité du récepteur à activer la voie de signalisation (White et al, 1997; Crouse et al, 1998; Da Silva et al, 1998). Le rat Zucker fa/fa est donc un rat obèse qui a souvent été utilisé dans la recherche sur l'obésité alors que le rat Zucker Fa/Fa est un rat avec phénotype normal.

Chez l'humain, quatre isoformes ont été décrits dont un seul ressemble à la forme longue retrouvée chez la souris et le rat. Il s'agit des isoformes HUB219.1, HUB219.2, HUB219.3 et HUOB-R (Cioffi et al, 1996; Barr et al, 1999). Chez l'humain, le gène OB-R est situé sur le chromosome 1p32 (Cioffi et al, 1996). Les mutations du gène OB-R sont très rares chez l'humain. Une équipe a décrit un premier cas de mutation du gène OB-R chez trois sœurs consanguines (Clement et al, 1998). Une substitution A pour G

au sein de l'exon 16 engendre la traduction d'une protéine tronquée ne possédant ni le domaine transmembranaire ni le domaine intracellulaire. Cliniquement, ces patientes étaient hyperphagiques, obèses et souffraient d'hypogonadisme hypothalamique. Il semblerait que cette mutation ne soit pas associée comme chez la souris db/db à l'hyperglycémie, l'hypercorticisme et l'hypothermie.

Voie de signalisation

Le récepteur de la leptine, comme les membres de la superfamille des récepteurs de cytokines ne possède pas de motif enzymatique dans son domaine intracellulaire et doit par conséquent s'associer aux membres de la famille des Janus kinase. Cette famille de tyrosine kinase est activée lorsqu'un substrat se fixe au récepteur. Il résulte donc de cette activation une phosphorylation de plusieurs protéines cytoplasmiques qui sont des facteurs de transcription appelés STAT pour signal transducers and activators of transcription. Ces protéines STAT, une fois phosphorylées se dimérisent et transloquent à l'intérieur du noyau activant la transcription de gènes spécifiques (Horvath, 2000). Tel que mentionné précédemment, la forme courte du récepteur est incapable d'activer ces facteurs de transcription. La forme longue est capable d'activer la protéine Jak2 et par conséquent de phosphoryler les facteurs de transcription STAT-1, STAT-3, STAT-5 et STAT-6 qui iront à leur tour se fixer sur l'ADN en reconnaissant des sites bien précis (Chua et al, 1996; Vaisse et al, 1996; Ghilardi et al, 1996; Rosenblum et al, 1996; Bjorbaek et al, 1997; Briscoe et al, 2001; Hübschle et al, 2001).

Localisation du récepteur

Tel que mentionné précédemment, le récepteur de la leptine fut identifié sur plusieurs types de cellules. La présence de l'ARNm du récepteur a été identifié au niveau des plexus choroïdes mais aussi au niveau des poumons, des gonades, du foie et des reins de souris, pour ne nommer que les principaux organes (Tartaglia et al, 1995; Elmquist et al, 1997). En 1996, la localisation du récepteur de forme longue venait confirmer la présence du récepteur au niveau des poumons et des reins chez la souris alors que chez l'humain on démontrait la présence du récepteur principalement au niveau du cœur, du foie, des intestins, de la prostate et des ovaires (Chen et al, 1996; Cioffi et al, 1996). Une dernière analyse comparait la présence de la forme courte et de la forme longue chez la souris démontrant que la forme courte est présente dans presque tous les organes alors que la forme longue se retrouve surtout au niveau des ganglions et du cerveau avec une forte proportion au niveau de l'hypothalamus (Schwartz et al, 1996; Mercer et al, 1996). Effectivement il fut démontré à plusieurs reprises que le récepteur de forme longue était bien présent au niveau de certaines régions de l'hypothalamus et qu'il est coexprimé avec la protéine STAT-3 et d'autres neuropeptides tels que le neuropeptide Y et la proopiomelanocortine (Baskin et al, 1999; Hakansson et Meister, 1998).

Rôle de la leptine au niveau du SNC et du métabolisme énergétique

La découverte de la leptine comme signal hormonal régulant la prise alimentaire représente une étape importante dans la compréhension de l'homéostasie énergétique. Les lésions situées au niveau de la région ventrobasale de l'hypothalamus produisent des anomalies de la balance énergétique semblables à celles retrouvées chez les souris ob/ob et les souris db/db (Hetherington et Ranson, 1940). Effectivement, toutes ces conditions sont caractérisées par une hyperphagie, une diminution de la dépense énergétique et une obésité morbide. Ainsi, le rôle précis de la leptine au niveau du système nerveux central se devait d'être éclairci. Tout comme pour l'insuline, on démontra qu'une administration intra-ventriculaire de leptine produit une diminution de la prise alimentaire et qu'un déficit en leptine augmente la prise alimentaire (Woods et al, 1979; Zhang et al, 1994; Weigle et al, 1995; Campfield et al, 1995; Sipols et al, 1995). Ainsi fut identifié le rôle de l'insuline et de la leptine au niveau de la régulation de la balance énergétique. Effectivement, ces deux hormones circulent en quantités proportionnelles avec la masse de graisse corporelle et se retrouvent dans le SNC en proportion des concentrations plasmatiques (Bagdade et al, 1967; Considine et al, 1996; Baura et al, 1993; Schwartz et al, 1996). Leurs récepteurs respectifs sont exprimés sur les neurones régulant la balance énergétique (Baskin et al, 1988; Baskin et al, 1999; Cheung et al, 1997). Toutefois, la concentration d'insuline et de leptine proportionnelle à la graisse corporelle ne s'expliquent pas par le même mécanisme (Porte et al, 1998). La hausse d'insuline dans le plasma s'explique par une augmentation de la résistance des cellules secondaire au gain pondéral (Schwartz et al, 1997). Ainsi, avec toute augmentation de

poinds se produit une augmentation de la sécrétion d'insuline afin de maintenir une glycémie normale (Kahn et al, 1993; Polonsky et al, 1988). La concentration de leptine s'explique davantage par une augmentation de sa sécrétion par les adipocytes hypertrophiques. La sécrétion de leptine serait en partie régulée par l'utilisation du glucose stimulée par l'insuline au sein des adipocytes (Mueller et al, 1998). La leptine en circulation est liée partiellement aux protéines plasmatiques (Houseknecht et al, 1996; Sinha et al, 1996b). La leptine pénètre le tissu nerveux fort probablement par transcytose au travers des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Banks et al, 1996; Pardridge et al, 1986; Schwartz et al, 1992). Il existerait possiblement des récepteurs sur les cellules endothéliales facilitant ce mécanisme de transport (Bjorbaek et al, 1998; Golden et al, 1997). Une fois présentes au cerveau, la leptine et l'insuline activent des voies hypothalamiques nécessitant la présence de plusieurs autres neuropeptides (figure 2).

Effectivement, le récepteur de forme longue de la leptine (Ob-Rb) est coexprimé avec le neuropeptide Y et agouti-related peptide (AgRP) sur certains neurones situés dans le noyau arqué médial alors que le même récepteur Ob-Rb est coexprimé avec la proopiomelanocortine (POMC) et la cocaine-and-amphetamine-regulated-transcript (CART) sur certains neurones situés dans le noyau arqué latéral (Flier et al, 1998). Une administration intracérébrale de NPY stimule l'appétit et diminue la dépense énergétique alors qu'une injection intracérébrale de MSH, un produit du POMC, ou de CART inhibe l'appétit (Seeley et al, 1997). L'AgRP tout comme le NPY a un effet orexigénique, mais cette fois par inhibition de l'action du MSH sur son récepteur MC4 (Fan et al, 1997).

Tel que mentionné précédemment, le NPY est un neurotransmetteur important dans la voie anabolique. En plus d'augmenter l'appétit et de diminuer la dépense énergétique, il induit les enzymes lipogéniques au niveau hépatique et des graisses blanches (Stanley et al, 1986; Zarjevski et al, 1993). Donc, son administration répétée peut conduire à l'obésité (Billington et al, 1991). L'expression du NPY est par conséquent augmentée dans les cas de jeûne important mais aussi lorsque la leptine et l'insuline sont en faibles concentrations dans le plasma (Karla et al, 1991; White et Kershaw, 1989; Wilding et al, 1993). La leptine inhibe les neurones qui expriment le NPY au niveau du noyau arqué (Schwartz et al, 1996; Stephens et al, 1995). Il a aussi été démontré qu'en supprimant l'expression du NPY chez les souris ob/ob on réussit à diminuer l'hyperphagie et l'obésité chez ces dernières (Erickson et al, 1996). Toutefois, il faut mentionner que les effets du NPY ne sont pas encore tous bien compris car les souris qui expriment un déficit congénital en NPY ont une réponse alimentaire tout à fait adéquate (Erickson et al, 1996). La possibilité d'une compensation par un autre facteur anabolique chez les souris avec un knockout du NPY pourrait expliquer cette réponse inattendue (Schwartz et al, 2000).

Parmi les nombreux facteurs cataboliques, nous avons déjà mentionné la voie des mélanocortines qui implique principalement la α -MSH (Cone et al, 1996). Cette voie est fortement stimulée au niveau du noyau arqué par la leptine et l'insuline qui jouent le rôle de signal adipocitaire. Il est établi que les récepteurs aux mélanocortines situés au niveau du cerveau jouent un rôle dans la régulation de l'appétit (Mountjoy et al, 1994). En stimulant les récepteurs MC3 et MC4, on réussit à inhiber la prise alimentaire alors

qu'en bloquant ces récepteurs l'effet inverse se produit (Fan et al, 1997). D'ailleurs, les souris knockout pour le récepteur MC4 présentent une obésité importante (Huszar et al, 1997). Finalement, c'est par un mécanisme d'inhibition du récepteur MC4 que l'AgRP, un peptide aussi présent au niveau de l'hypothalamus et exprimé en parallèle avec le NPY, produirait son effet orexigénique (Shutter et al, 1997; Ollmann et al, 1997; Hahn et al, 1998; Broberger et al, 1998).

Il est donc suggéré que le noyau arqué de l'hypothalamus soit un centre où le signal fourni par la leptine serait converti en influx nerveux afin d'exercer son effet sur le reste du corps. Ainsi la leptine agirait à la fois en inhibant les neurones qui expriment NPY/AgRP et en stimulant les neurones qui expriment POMC (Schwartz et al, 1996; Stephens et al, 1995; Hahn et al, 1998; Broberger et al, 1998; Schwartz et al, 1997; Thornton et al, 1997). Ces neurones que l'on considère de premier ordre, projettent vers d'autres noyaux de l'hypothalamus où se situent des neurones de deuxième ordre. Le noyau paraventriculaire est une zone de forte concentration en peptides anorexigéniques alors que la région hypothalamique latérale et périfornicale est une zone à prédominance orexigénique (Elmqvist et al, 1998; Elmqvist et al, 1999). Effectivement, certains peptides anorexigéniques tels que la TRH et la CRH ont été identifiés au niveau du PVN alors que d'autres peptides orexigéniques tels que les orexines et le MCH ont été localisés au niveau du PFA et du LHA (Bray et al, 1990; Kow et Pfaff, 1991; de Lecea et al, 1998; Sakurai et al, 1998; Qu et al, 1996).

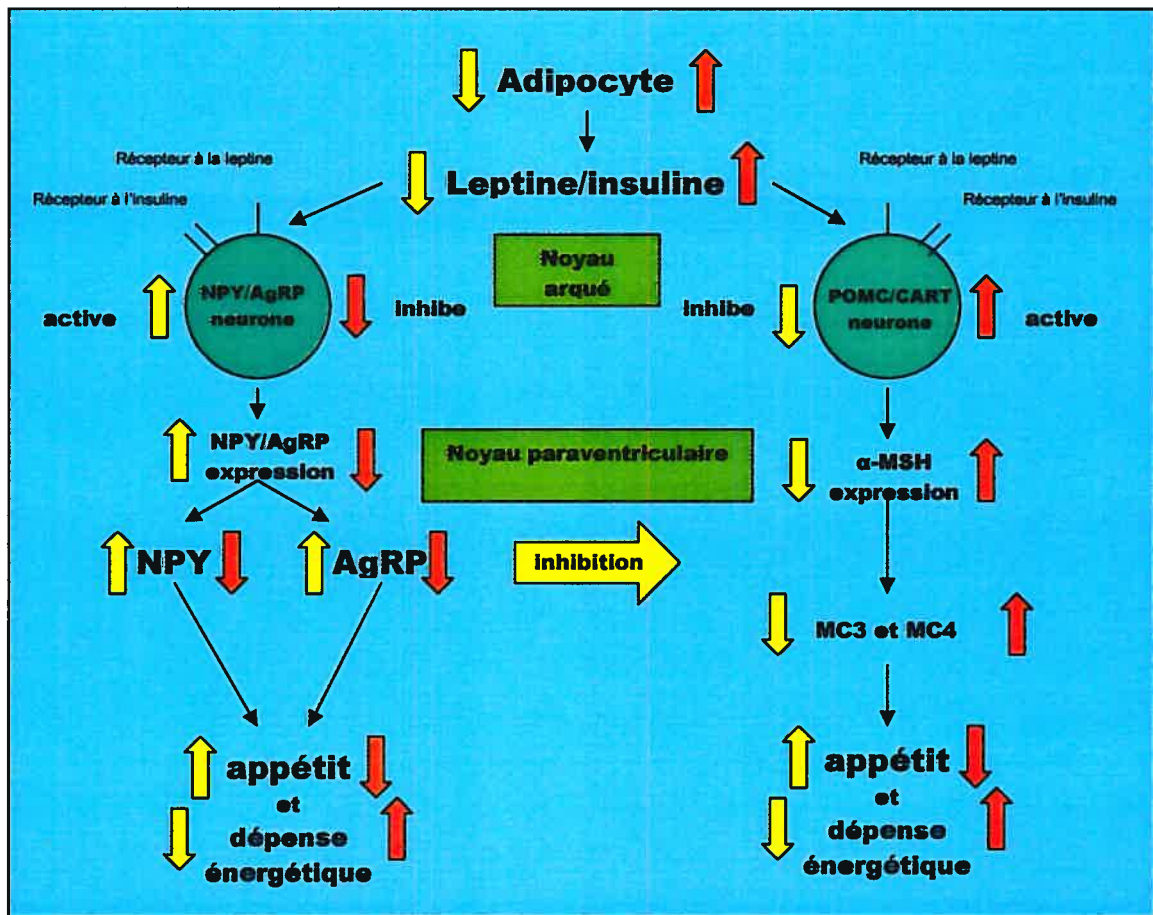


Figure 2 : Schématisation du rôle de la leptine et de l'insuline dans le contrôle du métabolisme énergétique.

Les autres hormones impliquées dans le métabolisme énergétique

Dernièrement, d'autres hormones ont été impliquées dans la régulation endocrine du métabolisme énergétique. Effectivement, la ghreline, l'adiponectine et la résistine sont des hormones qui ont maintenant leur place dans la physiologie de la balance énergétique (Meier et Gressner, 2004). La ghreline fut initialement reconnue comme étant une hormone capable de stimuler la production de GH (Kojima et al, 1999). Par la suite, on remarqua le lien qui unit la ghreline à la balance énergétique (Tschöp et al,

2000). L'administration exogène de ghreline produit une augmentation de la masse de tissus adipeux en stimulant l'appétit et en diminuant l'oxydation des graisses. La ghreline sécrétée par l'estomac, se rend au niveau de l'hypothalamus afin d'agir sur le même réseau de neurones que la leptine (Meier et Gressner, 2004). On démontra aussi que la ghreline agit de façon complètement antagoniste à la leptine (Ukkola et Poykko, 2002). Des récepteurs à la ghreline (GHS-receptor) sont aussi présents sur les neurones produisant le NPY et le AgRP stimulant leur production et par conséquent la prise alimentaire. La ghreline agit aussi au niveau de la motilité gastrique en stimulant la vidange gastrique via un mécanisme paracrine ou central (Wang et al, 2002).

L'adiponectine est une protéine sécrétée de façon spécifique par les adipocytes et impliquée dans l'homéostasie du glucose et des lipides (Meier et Gressner, 2004). L'adiponectine peut diminuer la glycémie plasmatique lorsque injectée à des souris diabétiques non obèses en stimulant la sensibilité à l'insuline (Berg et al, 2001). Il a d'ailleurs été remarqué que les patients souffrant de diabète de type 2 ou d'hyperinsulinémie avaient des taux très bas d'adiponectine (Hellstrom et al, 2004). L'adiponectine agit au niveau du foie pour diminuer la synthèse de lipide et de glucose et ainsi diminuer leur concentration plasmatique respective (Meier et Gressner, 2004). Dans la même optique, l'adiponectine diminue les triglycérides, augmente l'oxydation des graisses et augmente la dépense énergétique au niveau musculaire (Meier et Gressner, 2004).

Finalement, la résistine est une hormone aussi produite par les adipocytes et impliquée dans la résistance à l'insuline (Shuldiner et al, 2001). Son injection chez des souris diminue la tolérance au glucose et diminue l'effet de l'insuline (Rajala et al, 2003). Toutefois, le rôle physiologique de cette hormone reste encore très obscure.

Rôle de la leptine au niveau de la satiété

Bien sûr, tout ce mécanisme complexe de régulation de la balance énergétique permet de contrôler à long terme la masse corporelle en influençant à la fois les apports et la dépense énergétiques. Or, la leptine est aussi impliquée possiblement dans la régulation à court terme de la prise alimentaire (Pico et al, 2003). En effet, le mécanisme de la satiété, phénomène par lequel nous mettons fin au repas, semble être contrôlé par d'autres afférences que celles qui contrôlent le mécanisme de la balance énergétique. Alors que l'initiation d'un repas peut être influencée par plusieurs stimuli externes et internes comme les émotions, l'environnement ou le moment de la journée, la terminaison d'un repas est régulée de façon beaucoup plus biologique. Tout comme la balance énergétique, la satiété serait en partie régulée par le signal adipocytaire, principalement la leptine. Par exemple, un animal traité avec la leptine prendrait le même nombre de repas mais de plus petites tailles (Flynn et al, 1998). L'inverse est aussi vrai avec un animal traité avec du NPY (Leibowitz et Alexander, 1991). Cette observation pourrait s'expliquer par la présence d'afférences qui relie l'hypothalamus et le centre de satiété qui serait situé au niveau du tronc cérébral (Schwartz et al, 2000). Ce centre de la satiété reçoit principalement des afférences venant du tractus digestif par

l'entremise du nerf vague et aussi des voies spino-cérébrales (Ritter et al, 1994). En fait, toutes ces afférences convergent au niveau du noyau solitaire, où se fait l'intégration des informations sensibles provenant du tractus digestif (Travers et Norgren, 1987). Ce qui induit initialement ces signaux de satiété sont des stimuli mécaniques au niveau de l'estomac ainsi que des stimuli chimiques provenant en partie de l'estomac, mais aussi des intestins. Il est aussi important de mentionner les stimuli neuronaux provenant du métabolisme énergétique au niveau du foie et les stimuli humoraux tels que la GLP-1, le peptide YY 3-36 et évidemment la cholecystokinine qui est sécrétée par les cellules neuroendocrines situées le long des parois intestinales (Friedman et al, 1999; Moran et Schwartz, 1994; De Graaf et al, 2004). Tous ces signaux de satiété fonctionnent indépendamment de l'hypothalamus, or il est suggéré que les afférences provenant de ce dernier puissent influencer la réponse du noyau solitaire aux afférences provenant du nerf vague (Schwartz et al, 2000). Il a d'ailleurs été démontré que la leptine peut potentialiser l'effet de la CCK afin de moduler la réponse du noyau solitaire face aux inputs de satiété (Wang et al, 2000). Le rôle de la leptine dans le mécanisme de la satiété sera à nouveau abordé dans les sections subséquentes.

Régulation de la production de la leptine

Les connaissances actuelles ont permis de mieux comprendre le rôle de la leptine, mais la sécrétion de cette hormone par les adipocytes demeure encore un mécanisme un peu obscur. Une analyse de la sécrétion de la leptine a révélé que la leptine est synthétisée par les adipocytes matures de la graisse blanche. Effectivement,

la leptine est présente dans le cytoplasme de préadipocytes en culture. Il a même été décrit qu'elle se retrouve le long de la membrane plasmique à l'intérieure de petite vacuoles de même grosseur au sein des adipocytes (Bornstein et al, 2000). Ces observations nous indiquent que la sécrétion de leptine est probablement constitutive au sein des adipocytes. Plusieurs études ont démontré *in vivo* et *in vitro* le parallèle entre la relâche de leptine en circulation et la transcription du gène (Maffei et al, 1995).

Tout le monde s'entend pour dire que le déterminant primaire de la production de leptine demeure la masse adipeuse (Frederich et al, 1995; Considine et al, 1996). De plus, non seulement le nombre d'adipocytes influence la production de leptine mais aussi le volume de chaque adipocyte (Hamilton et al, 1995). Plus l'adipocyte est gros plus la production de leptine est importante. Il a aussi été démontré que le taux de leptine est plus élevé chez la femme que chez l'homme de masse égale (Considine, 2001). Cette différence s'explique par la distribution des graisses puisque les graisses sous-cutanées produisent plus de leptine que les graisses abdominales (Rosenbaum et Leibel, 1999). Toutefois, un second facteur pourrait expliquer cette différence entre les sexes, il s'agit des hormones sexuelles. Effectivement, les androgènes ont un effet inhibiteur sur la production de leptine alors que l'œstrogène a un effet stimulateur (Considine, 2001). La production de la leptine est aussi influencée par l'apport calorique indépendamment des changements survenant au niveau de la masse adipeuse. Effectivement, la leptine sérique diminue après un jeûne de 24h et remonte rapidement 4 à 5 heures après la prise alimentaire. Puisqu'il est possible de prévenir cette baisse de leptine en maintenant l'animal euglycémique, il est suggéré que l'insuline ou le glucose

puisse être un signal reconnu par les adipocytes pour stimuler la synthèse de leptine (Kolaczynski et al, 1996; Boden et al, 1996). Plusieurs autres études sont venues confirmer un rôle pour le glucose et l'insuline dans la synthèse de la leptine mais le mécanisme demeure encore incertain. Il est démontré que la leptine adipocytaire est sécrétée de façon diurne avec un pic plasmatique vers 2h00 du matin (Sinha et al, 1996a). Ce profile diurne n'est pas le résultat d'un rythme circadien, mais plutôt secondaire à la prise alimentaire (Schoeller et al, 1997). Effectivement, le profile diurne ne se remarque pas lorsque les animaux sont à jeun (Boden et al, 1996). De plus, en repoussant les repas de 6,5 heures sans modifier la lumière ni le sommeil, nous obtenons un pic de leptine repoussé de 5 à 7 heures plus tard (Schoeller et al, 1997). Cette observation peut représenter une réponse post-prandiale retardée ce qui est tout à fait compatible avec le rôle joué par le glucose et l'insuline dans la régulation de la synthèse de la leptine (Considine, 2001). Le système nerveux sympathique agit aussi sur la production de la leptine en l'inhibant. L'hypothèse d'une boucle de rétroaction négative déclenchée par l'hypothalamus vers la masse adipeuse en réponse à la leptine circulante a été proposée et cette affirmation est en accord avec l'inhibition produite par les catécholamines sur la production de leptine (Considine, 2001). Finalement d'autres facteurs pourraient influencer la synthèse de leptine. Parmi ces dernier mentionnons l'effet inhibiteur des thiazolidinediones par l'entremise du récepteur PPAR γ ainsi que l'effet stimulateur des glucocorticoides et de certaines cytokines telles que TNF- α et l'interleukine-1 (Considine et Caro, 1997; Murakami et al, 1995; Slieker et al, 1996; De Vos et al, 1995; Grunfeld et al, 1996; Sarraf et al, 1997).

Autres rôles joués par la leptine

En plus d'agir sur la régulation de la balance énergétique ainsi que sur l'appétit, la leptine exerce plusieurs effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. D'ailleurs, la présence du récepteur à la leptine a été démontré au niveau de l'hypophyse (Jin et al, 2000; Sone et al, 2001). Nous savions aussi depuis longtemps suite à des observations sur des souris ob/ob et db/db que la leptine est impliquée dans plusieurs fonctions endocriniennes. Les souris ob/ob démontrent effectivement, en plus de leur importante obésité, un hypogonadisme hypothalamique, un hypercorticisme, une hyperinsulinémie, une hyperglycémie, une hypothermie et possiblement une altération des fonctions thyroïdiennes (Ahima et Flier, 2000). Les anomalies retrouvées chez l'humain déficient en leptine sont semblables mais pas complètement identiques (Montague et al, 1997; Strobel et al, 1998). Le phénotype de la souris db/db s'est révélé complètement superposable à celui de la souris ob/ob confirmant le rôle de la leptine pour toutes ces fonctions (Halaas et al, 1995; Campfield et al, 1995). Par la suite, la leptine fut démontrée être essentielle à la maturation de l'axe reproducteur en rétablissant la puberté et la fertilité lorsque administrée aux souris ob/ob (Chehab et al, 1996; Chehab et al, 1997; Ahima et al, 1997; Wade et al, 1997). Par différents mécanismes, la leptine pourrait aussi agir à titre d'indicateur des réserves énergétiques pour fin de reproduction. Effectivement, plusieurs récepteurs à la leptine ont été identifiés à la surface des cellules de la granulosa, de la thèque, des cellules interstitielles et des cellules de Leydig (Baratta, 2002). L'effet de la leptine sur ces cellules semble plutôt une inhibition de la stéroïdogénèse. Or, on n'a toujours pas expliqué pourquoi la leptine exerce un effet

positif sur la reproduction des souris ob/ob alors qu'elle semble exercer un effet inhibiteur sur les cellules ovariennes *in vitro*. De plus, la leptine inhibe la synthèse et la sécrétion des glucocorticoïdes induites par l'ACTH chez les cellules du cortex surrénalien de la souris (Heiman et al, 1997; Bornstein et al, 1997; Pralong et al, 1998). Tel que mentionné précédemment, certains phénotypes ne se retrouvent pas chez l'humain déficient en leptine et cette action sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en est l'un d'entre eux.

La leptine semble aussi jouer un rôle au niveau du métabolisme des glucides et des lipides indépendamment de son rôle dans le contrôle de l'équilibre énergétique. Effectivement, la leptine peut diminuer la glycémie et le taux d'insuline chez la souris ob/ob avant la perte de poids (Ahima et al, 1998). La présence du récepteur à la leptine sur les cellules à insuline au niveau des îlots de Langerhans pourrait médier l'effet inhibiteur de la leptine sur la sécrétion d'insuline (Emilsson et al, 1997). La leptine joue aussi différents rôles dans le métabolisme des lipides. Les souris ob/ob et db/db se sont montrées hypercholestérolémiques et hypertriglycéridémiques (Leibel et al, 1997). Un traitement à la leptine institué chez une souris ob/ob a démontré une baisse substantielle des lipides plasmatiques (Halaas et al, 1995). Une étude chez des souris transgéniques qui surexpriment la leptine démontre que l'activité de la lipoprotéine lipase plasmatique est augmentée de 1,4 fois en comparaison avec les souris normales (Matsuoka et al, 2001). De plus, la leptine semble aussi diminuer le taux de HDL (Matsuoka et al, 2001). De façon générale, la leptine augmente le métabolisme lipidique, causant une diminution des triglycérides.

La production de leptine a été documentée dans plusieurs tissus autres que chez les adipocytes. Le placenta chez la femme enceinte participe en parti à la hausse de leptine observée pendant la grossesse (Hardie et al, 1997; Masuzaki et al, 1997; Senaris et al, 1997). La leptine placentaire est produite à partir du même gène que la leptine adipocytaire. Le rôle exacte de la leptine placentaire demeure à élucider. Certains avancent qu'elle pourrait servir à maintenir l'axe hypothalamo-hypophysaire pendant la grossesse advenant le cas où la nourriture serait moins disponible et la masse adipeuse réduite. Plusieurs évidences soutiennent aussi un rôle dans le développement du fœtus. Entre autres, la présence de leptine dans le liquide amniotique et le plasma fœtal dès la 18^e semaine de grossesse (Lepercq et al, 2002). La leptine est synthétisée dans les cellules cyto- et syncytiotrophoblastiques qui sont situées sur la face maternelle du placenta expliquant pourquoi la leptine est libérée principalement dans la circulation maternelle. Mais, la présence de leptine a également été détectée au niveau des cellules endothéliales des capillaires fœtaux qui sont en contact direct avec le sang fœtal et contribuant ainsi au faible taux fœtal de leptine circulante (Ashworth et al, 2000). De plus, il a été démontré que chez le nouveau-né, les concentrations ombilicales de leptine sont positivement corrélées au poids de naissance (Schubring et al, 1997; Laml et al, 2000). Finalement, la leptine peut aussi stimuler la prolifération de cellules embryonnaires de souris en provoquant une élévation de l'activité MAPK (Takahashi et al, 1997).

La leptine a aussi été retrouvée dans le lait maternel, suggérant une possible implication dans la maturation du tube digestif ou dans la régulation de la satiété du

nouveau-né (Casabiell et al, 1997; Wolinski et al, 2003). La leptine est présente également dans les cellules mammaires normales et dans les cellules du cancer du sein suggérant la possibilité d'un rôle dans la lactation et dans la carcinogenèse mammaire (O'Brien et al, 1999).

Il est important aussi de souligner la production de leptine au niveau de la moelle osseuse par les adipocytes. Les récepteurs à la leptine sont présents sur plusieurs cellules hématopoïétiques dont les blastes, les promyélocytes, les promonocytes, les macrophages et bien d'autres (Baratta, 2002). Il a été démontré que la leptine prévient la réduction immunitaire causée par le jeûne et qu'elle stimule la prolifération des lymphocytes T mémoire. La leptine provenant de la moelle osseuse pourrait donc jouer un rôle tant au niveau de l'hématopoïèse que du système immunitaire (Baratta, 2002). Finalement, la production de la leptine a aussi été identifiée au sein du tissu gastrique (Bado et al, 1998). C'est d'ailleurs de cette sécrétion de leptine gastrique qu'il sera question dans les pages subséquentes.

La leptine au niveau du tube digestif

C'est en 1998 qu'André Bado et son équipe démontrent pour la première fois la production de leptine par l'épithélium gastrique. Effectivement, ils ont prouvé par la méthode de RT-PCR la présence d'ARNm de leptine dans l'épithélium fundic de rats Wistar. De plus, ils ont confirmé leurs résultats en effectuant un Western blot d'un homogénat de muqueuse fundique. Sur le Western blot, deux bandes identifiables sont

localisées à 16kDa et à 19kDa. Cette observation est interprétée comme étant la présence de leptine et de son précurseur, la pro-leptine.

La même équipe a aussi démontré par immunohistochimie que les cellules productrices de leptine sont situées principalement au fond des glandes gastriques. La présence de leptine n'a pu être retracée dans les tissus du petit intestin, du côlon, du rectum et du pancréas. L'équipe de Bado a aussi observé la production de leptine par l'estomac des rats Wistar maigres et des rats Zucker fa/fa obèses pour constater qu'il y avait peu de différence entre les deux muqueuses, l'estomac du rat maigre contenant légèrement moins de leptine que celui du rat obèse. Finalement, ils ont aussi souligné que l'administration de CCK-8 ou de nourriture induit une diminution importante de l'immunoréactivité des glandes ainsi qu'une baisse de leptine contenue dans la muqueuse. Parallèlement, cette observation est associée avec une élévation de la leptine plasmatique. Ainsi, il a été suggéré que la sécrétion de leptine gastrique soit essentiellement endocrine même si l'immunoréactivité semblait se localiser au site correspondant à l'emplacement des cellules principales sécrétrices de pepsinogène.

La sécrétion gastrique de leptine

Après la découverte de leptine dans la muqueuse gastrique, la sécrétion de cette protéine fut davantage étudiée chez l'humain (Braidert et al, 1999; Mix et al, 2000; Sobhani et al, 2000; Cinti et al, 2000). La leptine est présente dans la muqueuse gastrique humaine et principalement située dans le fond des glandes gastriques dans les

régions du corps de l'estomac et du fundus tel que visualisé par immunohistochimie . La présence de leptine fut aussi démontrée par RT-PCR dans des biopsies gastriques, dans des cellules épithéliales gastriques en culture et dans des cellules tumorales gastriques en culture (Mix et al, 2000). De plus, il semble que la quantité de leptine contenue dans la muqueuse du corps gastrique soit significativement supérieure chez le patient atteint d'une gastrite à *H. pylori* ,un état inflammatoire important de la muqueuse gastrique (Braidert et al, 1999; Azuma et al, 2001). Afin de confirmer quel type de cellules gastriques contient de la leptine, des marquages pour la pepsinogène ont été effectués sur des coupes sériées adjacentes (Mix et al, 2000). Ainsi, une comparaison de l'immunoréactivité pour la leptine et pour la pepsinogène a démontré hors de tout doute qu'il s'agissait des mêmes cellules. Il semble toutefois que certaines cellules ressemblant aux cellules pariétales pourraient aussi contenir de la leptine. Il a été démontré que non seulement la leptine est présente dans le jus gastrique mais que suite a une infusion de sécrétine et de pentagastrine chez l'humain, la quantité de leptine augmente dans le jus gastrique ainsi que dans le plasma (Sobhani et al, 2000). De plus, la leptine gastrique n'est pas dégradée par les conditions du milieu gastrique, elle peut tolérer des pH allant jusqu'à 2 (Guilmeau et al, 2003).

Toujours chez l'humain, la présence du récepteur pour la leptine a été démontré dans la muqueuse gastrique par immunohistochimie aussi bien que par RT-PCR et western blot (Braidert et al, 1999; Mix et al, 2000; Sobhani et al, 2000). Les échantillons de muqueuse gastrique humaine contiennent de l'ARNm des trois isoformes courts du récepteur à la leptine (HUB219.1, HUB219.2, HUB219.3) ainsi que de

l'ARNm de l'isoforme long HUOB-R. Un double marquage du pepsinogène et du récepteur de la leptine par immunofluorescence a identifié que les récepteurs se trouvent principalement sur les cellules principales (Mix et al, 2000). De plus, les récepteurs sont situés surtout dans le fond des glandes gastriques et au niveau des membranes basolatérales des cellules glandulaires. La découverte de ces récepteurs a fortement suggéré un rôle paracrine à la leptine gastrique.

Toujours la même année, une autre équipe a démontré par microscopie électronique la présence de leptine dans les cellules à pepsinogène des muqueuses gastriques humaines (Cinti et al, 2000). Les cellules situées dans la moitié inférieure des glandes gastriques étant immunoréactives pour la leptine, une confirmation par immunocytochimie a été réalisée. Cette dernière a démontré la présence de leptine dans les granules des cellules à pepsinogène, mais aussi dans les granules d'une cellule endocrine située tout au fond de la glande. Ainsi, on prouvait que la leptine devait être sécrétée de façon prépondérante exocrine mais aussi endocrine.

La présence de leptine au niveau de l'estomac chez différents vertébrés mammifères et non mammifères a été documentée. La leptine est présente au sein des cellules à pepsinogène dans l'estomac de chien. De plus, la synthèse et la sécrétion de cette leptine gastrique sont régulées en parti par la cholecystokinine (Tsunoda et al, 2003). Une autre équipe a démontré la présence de leptine chez des spécimens de poissons et de reptiles. Le marquage était principalement situé au niveau des cellules principales chez la grenouille, le serpent et le lézard. Toutefois, chez la truite et le

lézard, le marquage se retrouve dans certaines cellules présentant les caractéristiques de cellules endocrines. Finalement, le marquage a aussi été retrouvé au niveau du système nerveux entérique de la truite, de la grenouille et surtout du serpent (Muruzabal et al, 2002).

Le récepteur de la leptine au niveau intestinal

La présence de l'ARNm des différents isoformes du récepteur de la leptine a été démontrée par RT-PCR dans les différentes sections du petit et du gros intestins (Morton et al, 1998). L'isoforme long du récepteur semble être présent en plus grandes quantités dans le jéjunum contrairement aux autres sections de l'intestin. De plus, l'isoforme Ob-Rb est aussi présent sur les cellules CACO-2, dérivées de l'adénocarcinome du colon humain, qui développent plusieurs caractéristiques des entérocytes matures. L'isoforme Ob-Ra a été retrouvé par western-blot dans plusieurs sections du tube digestif et aussi chez les cellules CACO-2. Des western-blot démontrent la présence de protéines de la famille STAT au niveau des entérocytes suite à l'administration de leptine chez des souris ob/ob et +/+. Cette réponse suggère l'activation de la voie de signalisation au sein des entérocytes et des cellules CACO-2 (Morton et al, 1998). Les mêmes mesures ont été tentées chez les souris db/db qui ne possèdent pas l'isoforme long du récepteur et la présence des protéines STAT n'a pu être démontré (Morton et al, 1998). Ainsi, on venait de prouver que le récepteur est présent et qu'en plus il engendre une réponse cellulaire suite à l'administration de leptine. Une analyse immunohistochimique détaillée avec plusieurs méthodes de fixation et de marquage démontra la présence du

récepteur de forme longue au niveau du cytoplasme, de la membrane basolatérale et de la bordure en brosse dans des cellules duodénales humaines, ainsi que de rats et de souris (Barrenetxe et al, 2002). On confirma ces données en effectuant un RT-PCR pour le récepteur de forme longue au niveau du duodénum humain.

Rôle de la leptine au niveau gastrique et intestinal

Satiété

Tel que mentionné déjà, la leptine se trouve dans les cellules à pepsinogène et les cellules endocrines de l'estomac. La relâche de leptine est stimulée par les hormones sécrétagogues telles que la CCK, la gastrine et la sécrétine ainsi que par l'ingestion d'aliments (Bado et al, 1998; Sobhani et al, 1998; Tsunoda et al, 2003). La sécrétion, à la fois exocrine et endocrine, se produit à l'intérieur de quelques minutes suite au stimulus. Précédemment, il a été souligné que la satiété était principalement régulée par des signaux adipocytaires tel que la leptine, des signaux mécaniques venant du tube digestif, des signaux neurohumoraux venant du tube digestif (ghrelina, orexine, CCK, GLP-1, PYY3-36,) et venant du pancréas (insuline), des signaux neuronaux provenant du métabolisme énergétique au niveau du foie (Schwartz et al, 2000). Ainsi, il est généralement accepté que la leptine puisse modifier l'état de satiété à long terme via le signal adipocytaire or, on considère de plus en plus que la leptine gastrique pourrait être impliquée dans un mécanisme de satiété à plus court terme (Pico et al, 2003). Effectivement, on pense que la leptine pourrait agir de façon synergique avec la CCK pour activer les neurones du noyau du tractus solitaire via le nerf vague. Les récepteurs à

la leptine sont présents au niveau du ganglion plexiforme contenant les corps cellulaires des neurones afférents viscéro-sensitifs du nerf vague chez le rat et l'humain (Buyse et al, 2001; Burdyga et al, 2002). Il a été aussi démontré que la leptine augmente la sécrétion de CCK lorsque administrée dans la lumière duodénale (Guilmeau et al, 2003). Ainsi, il existerait une boucle entre la leptine gastrique et la CCK pour autopotentialiser l'effet anorexigène.

Cytoprotection

La leptine joue un rôle de cytoprotecteur au niveau de la muqueuse gastrique (Konturek et al, 2001). À quelques reprises, il a été démontré que le taux de leptine gastrique est augmenté lors de l'infection à *H. Pylori* (Braidert et al, 1999; Azuma et al, 2001). Suite à l'application topique d'éthanol 75% ou d'ASA, l'expression d'ARNm de leptine s'accroît significativement. De plus, l'administration intra-péritonéale de leptine exogène améliore l'étendu de la lésion induite par l'éthanol ou l'ASA alors que l'administration de CCK n'a aucun effet voir possiblement une augmentation de la lésion à certaines doses (Konturek et al, 1999). Finalement, l'administration de leptine ou de CCK en dose unique avant un stress ultime permet de diminuer le nombre de lésions gastriques. Cet effet cytoprotecteur produit par la leptine exogène ou endogène, relâchée suite à l'administration de CCK, de gastrine ou d'un repas, dépend de l'activité vagale et d'une microcirculation gastrique augmentée via le NO (Brzozowski et al, 1999). L'équipe de Konturek a aussi démontré que la leptine administrée intra-péritonéale peut accélérer la guérison d'un ulcère gastrique avec une augmentation de l'expression de $TGF\alpha$ et de cNOS et iNOS aux marges de l'ulcère (Konturek et al,

2001). Le mécanisme par lequel la leptine module l'inflammation au niveau de la muqueuse gastrique est incompris à différents niveaux.

Absorption

Depuis la découverte du récepteur à la leptine au niveau de l'intestin, on tente de mettre en évidence le rôle de la leptine au niveau de la muqueuse intestinale (Lostao et al, 1998). Une première équipe a effectué des expériences sur l'absorption du galactose en immergeant des anneaux de jéjunum de rat dans une solution de galactose avec ou sans leptine (Lostao et al, 1998) . En comparant l'anneau contrôle avec celui ayant trempé dans la leptine, on constate que la leptine diminue l'absorption de galactose à 5 et surtout 30 minutes. Quelques années plus tard, une autre équipe démontre que la leptine peut agir comme facteur de croissance sur la muqueuse intestinale normale et suite à une chirurgie réductrice au niveau du petit intestin (Pearson et al, 2001). Ils ont effectivement démontré via une expérimentation de recirculation fermée in vivo qu'en injectant la leptine en périphérie pendant deux semaines, il est possible d'augmenter significativement la masse d'ADN de la muqueuse et d'augmenter l'absorption de glycine et de galactose. Cette augmentation de l'absorption de galactose pourrait reposer sur une augmentation de la transcription de GLUT5 un transporteur de glucose et de galactose.

Jusqu'à maintenant, la leptine gastrique exocrine n'a été impliquée que dans le contrôle de l'absorption des protéines au niveau du petit intestin. L'absorption des petits peptides est médiée par un transporteur dépendant des protons, la protéine PepT-1. Ce

transporteur décrit depuis 1994 est exprimé dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Fei et al, 1994). Évidemment, il est retrouvé en plus grandes quantités au niveau du jéjunum où il est situé dans la bordure en brosse des entérocytes. L'équipe de Buyse a démontré que l'administration de leptine dans la lumière jéjunale augmente l'absorption des di- et tripeptides par l'entremise de PepT-1 (Buyse et al, 2001). Ils ont aussi confirmé ces résultats en administrant la leptine sur la face apicale de cellules CACO-2 augmentant encore une fois l'absorption des peptides (Gly-Ser et la céphalexin). Cette augmentation de l'absorption est principalement due à la mobilisation des transporteurs cytoplasmiques vers la membrane plasmique.

D'autres équipes ont observé l'effet de la leptine sur l'absorption des graisses. Il est maintenant reconnu que l'administration de lipides permet d'augmenter le taux plasmatique et la synthèse d'ApoA-IV une protéine impliquée dans l'absorption des triglycérides au niveau du jéjunum (Kalogeris et al, 2001). Or, il a été démontré que la leptine administrée par voie veineuse peut diminuer la quantité d'ARNm de ApoA-IV au niveau du jéjunum de souris après un bolus de lipides suggérant fortement un rôle de régulateur de la sécrétion des triglycérides (Morton et al, 1998). L'injection de leptine après un bolus de lipides diminue aussi le marquage de l'ApoA-IV par immunohistochimie de 50% au niveau du jéjunum et de 35% au niveau de l'iléon en comparaison avec une souris qui reçoit un bolus de lipide sans recevoir de leptine (Doi et al, 2001). Du même coup, l'injection de leptine diminue la hausse d'ApoA-IV plasmatique.

Cependant, une autre étude a observé les taux de leptine et d'ApoA-IV lors de l'administration chronique de bolus lipidiques et n'a pu démontrer de différence entre les taux de leptine chez les animaux recevant les lipides et ceux recevant le contrôle salin (Kalogeris et al, 2001). Lors de l'augmentation de synthèse d'ApoA-IV observée avec l'administration initiale de bolus lipidique, aucune baisse de leptine n'a pu être observée. Lors de la diminution de synthèse d'ApoA-IV observée avec l'administration chronique de lipides, une hausse non significative de leptine a été notée. Cette différence de corrélation pourrait s'expliquer par des concentrations plasmatiques de leptine différentes entre les premières expériences où la leptine était exogène en comparaison avec les taux endogènes retrouvés dans la dernière expérience. Par conséquent, il est toujours possible de soupçonner la leptine d'être impliquée dans l'absorption des triglycérides par l'entremise de l'ApoA-IV. L'effet de la leptine sur la biogenèse des apolipoprotéines, sur la synthèse lipidique et sur la sécrétion des lipoprotéines a aussi été étudié sur les cellules CACO-2 (Stan et al, 2001). La leptine inhibe donc la sécrétion de triglycérides, la biosynthèse des ApoB-100 et ApoB-48 ainsi que la sortie de chylomicrons et de LDL. Ces observations laissent supposer que la leptine agit sur le processus d'assemblage des lipoprotéines. Cependant, une contradiction a été observée dans la synthèse d'ApoA-IV qui semble augmentée par la leptine chez les cellules CACO-2 alors qu'elle était diminuée dans les études in vivo tel que mentionné précédemment. En plus de l'augmentation d'ApoA-IV, les ApoA-I et ApoE sont aussi augmentées par la leptine dans la cellule CACO-2. Pour l'instant, cette divergence de résultats est expliquée par la différence de procédure expérimentale et de modèle. Somme toute, la leptine semble avoir un effet inhibiteur sur l'absorption des

graisses au niveau du jejunum et des cellules CACO-2. La leptine est aussi impliquée dans l'absorption des lipides par l'entremise des fatty-acid-binding-protein (FABP). En ajoutant la leptine au milieu de culture de cellules CACO-2, une augmentation de I-FABP, mais non de L-FABP est observée par western-blot impliquant encore la leptine dans le mécanisme de l'absorption des lipides au niveau des entérocytes (Dubé et al, 2001). L'absorption du cholestérol est aussi modifiée par la leptine circulante (Igel et al, 2002). Effectivement, l'absorption du cholestérol est nettement plus élevée chez la souris ob/ob que chez la souris sauvage. De plus, l'administration de leptine aux souris ob/ob ainsi qu'aux souris sauvages permet de diminuer significativement l'absorption de cholestérol.

L'effet de la leptine au niveau des colonocytes et de leur absorption de butyrate a aussi été étudié (Buyse et al, 2002). Le butyrate constitue en fait le principal apport énergétique pour les colonocytes. Pour la première fois l'équipe de Buyse a démontré la régulation de cette absorption par l'entremise d'une hormone, la leptine. Effectivement, la leptine luminale augmente significativement l'absorption de butyrate médiée par MCT-1/CD147 (un transporteur membranaire et son chaperon moléculaire) chez la cellule CACO-2BBE. L'analyse des cellules CACO-2BBE par western-blot après une incubation luminale de leptine pendant 24h démontre une augmentation de l'expression de MCT-1 mais pas de CD147. Cette observation est confirmée par des résultats de northern-blot qui démontre l'augmentation d'ARNm de MCT-1. De plus, l'exposition luminale à la leptine augmente la translocation apicale de CD147 et MCT-1 favorisant l'absorption du butyrate. L'implication de la leptine dans l'absorption du butyrate au

niveau des colonocytes pourrait aussi jouer un rôle dans la physiopathologie des maladies inflammatoires intestinales.

Inflammation

La leptine peut être impliquée dans la régulation de l'inflammation intestinale (Buyse et al, 2004). Effectivement, les souris ob/ob déficientes en leptine ainsi que les souris db/db déficientes en récepteur sont résistantes à l'induction d'une colite expérimentale. La muqueuse normale du côlon exprime le récepteur à la leptine mais n'exprime pas de leptine. La muqueuse inflammée quant à elle exprime la leptine au sommet des colonocytes suggérant fortement l'évidence d'une sécrétion à ce niveau. L'équipe de Sitaraman a démontré que des lavages coliques exécutés chez des patients avec colites ulcéreuses légère à sévère contiennent la leptine en concentration 15 fois supérieure à la concentration retrouvée chez les sujets sains (Sitaraman et al, 2002; Sitaraman et al, 2004). Ils soulèvent donc la possibilité d'une sécrétion colique de leptine qui pourrait par la suite interagir avec le récepteur présent sur les colonocytes pour réguler une réaction inflammatoire. Les cellules CACO-2 expriment le récepteurs à la leptine, mais n'expriment pas la leptine. L'interféron γ , fortement impliqué dans les maladies inflammatoires intestinales, induit l'expression et la sécrétion de la leptine chez les cellules CACO-2 conformément à l'hypothèse émise par Sitaraman. De plus, la leptine, lorsque administrée à des cellules CACO-2, augmente l'association des protéines intranucléaires au gène NF- κ B suggérant un lien direct dans la pathogenèse de l'inflammation. D'ailleurs, l'administration intrarectale de leptine chez les souris cause des dommages à la muqueuse dont une exfoliation de l'épithélium. Finalement, on a

démontré l'implication possible des lymphocytes T dans la pathogenèse de l'inflammation intestinale par l'entremise de leurs récepteurs à la leptine (Siegmund et al, 2004).

Leptine gastrique et période périnatale

En 2002, l'équipe d'Oliver sont les premiers à étudier la leptine gastrique en période périnatale (Oliver et al, 2002). Ils démontrent par RT-PCR, ELISA et immunohistochimie que la leptine est exprimée en très faibles doses en période prénatale et qu'elle augmente dans les heures suivant la naissance chez les rats allaités contrairement aux rats à jeun. Par la suite, l'expression de leptine augmente au cours du premier mois de vie suivie d'une augmentation parallèle des taux de leptine. Les études immunohistochimiques ont démontré que les sites de marquage de la leptine varient au cours du développement. En effet, lors de la période prénatale et néonatale, la leptine est principalement située à la surface de l'épithélium suggérant plutôt une origine maternelle via le liquide amniotique ou l'allaitement. Au début de la diète solide vers le 15^e jour, la leptine n'est plus présente au niveau de l'épithélium et se retrouve principalement dans la moitié basale des glandes gastriques suggérant maintenant une production endogène. Le contenu en leptine du lait maternel humain et de rat avait déjà été démontré en 1997 et les mêmes auteurs avaient démontré que la leptine était absorbée dans sa forme intacte pour se retrouver en circulation par la suite (Casabiell et al, 1997). L'année suivante, on prouva la présence de leptine dans les cellules glandulaires mammaires suggérant une production et sécrétion locale au niveau des glandes mammaires (Smith-Kirwin et al, 1998). En 1999, une autre équipe démontra la

production et la sécrétion de leptine par les glandes mammaires (Silva et al, 1999). Quelques études ont tenté d'établir un lien entre l'obésité et le lait maternel mais aucun résultat ne fut convaincant. Cependant, l'équipe de Wolinski a tenté d'expliquer l'effet de la leptine exogène contenue dans le lait maternel sur le développement de l'intestin chez le porc (Wolinski et al, 2003). Ils ont démontré que l'allaitement avec les formules de lait ralentit la maturation de l'intestin mais que ce phénomène est réversible par l'administration de leptine à doses physiologiques. La leptine augmente la longueur de l'intestin, diminue la longueur des villosités, augmente l'index mitotique, diminue le pourcentage d'entérocytes avec vacuoles et finalement diminue l'activité des protéases et lactases retrouvées dans la bordure en brosse du jéjunum. Tous ces changements observés dans la muqueuse intestinale prouvent donc le rôle de la leptine dans la maturation et le développement de l'intestin chez le nouveau-né.

Leptine et obésité / diabète

Modèle animal fa/fa et streptozotocine

Dès 1996, alors que la leptine venait tout juste d'être clonée, on découvrait que l'expression du gène ob est augmentée chez le rat fa/fa et ce aussi tôt que trois semaines après la naissance. L'expression de leptine est aussi élevée chez la souris db/db. On avait aussi noté une augmentation lente et graduelle de l'expression de leptine chez le rat Zucker normal, et une plus rapide chez le rat Sprague Dawley, parallèlement avec la prise de poids et le taux d'insuline (Igel et al, 1996). Chez les rats fa/fa, l'augmentation de l'expression est liée en partie à l'obésité et aux adipocytes hypertrophiques qui

sécrètent plus de leptine. Mais cette augmentation est surtout liée à la mutation *fa* qui affecte le récepteur à la leptine. Deux observations pour appuyer ces faits sont décrites (Turban et al, 2002). La sécrétion de leptine est augmentée dans les cellules adipeuses provenant de rats maigres de génotype hétérozygote *Fa/fa* en les comparant avec la sécrétion de leptine dans les cellules adipeuses de rats maigres homozygotes *Fa/Fa*. De plus, les cellules adipeuses hypertrophiques de rats *Fa/Fa* nourris avec une diète riche en graisse pendant 15 jours n'expriment pas la leptine de façon augmentée minimisant ainsi l'impact de l'hypertrophie des adipocytes. En prouvant la sécrétion augmentée de leptine directement liée à la mutation *fa* touchant le récepteur à la leptine on met directement en évidence l'existence d'une boucle rétroactive dont les composantes ne sont pas encore complètement identifiées. En 1998, l'équipe de Bado a étudié l'expression de la leptine dans l'estomac des rats *fa/fa*. Ils ont comparé la concentration de leptine dans la muqueuse gastrique de rats Zucker maigres et de rats *fa/fa*. Les différences de concentration observées au niveau de la muqueuse gastrique ne sont pas significatives avec des concentrations de 3.8 ± 0.81 ng/g chez le rat maigre et de 4.1 ± 0.83 ng/g chez le rat *fa/fa* contrairement aux différences marquées obtenues au niveau des cellules adipocytaires. Ils ont conclu que la leptine est surexprimée de façon spécifique au niveau des adipocytes des rats *fa/fa* tel qu'observé précédemment avec d'autres protéines. En 2002, une autre équipe a étudié l'expression et la concentration de leptine dans la muqueuse de rats *fa/fa* (Pico et al, 2002). Ils ont obtenu des résultats différents de ceux décrits par l'équipe de Bado. Ils ont comparé l'expression et la concentration de leptine par RT-PCR et ELISA dans la muqueuse gastrique et dans les cellules adipeuses de rats Zucker maigres et des rats *fa/fa*. Ils ont obtenu des taux de leptine circulante

augmentés chez le rat fa/fa tel que décrit auparavant. Ils ont cependant observé que le taux de leptine chez le rat fa/fa ne varie pas en fonction de l'état de jeûne ou post-prandial comme chez le rat maigre. Après 14 heures de jeûne chez le rat maigre, le taux de leptine chute à 9.3% du taux retrouvé chez le rat maigre nourri. La réalimentation pendant 20 minutes permet de réaugmenter partiellement les taux de leptine circulantes chez les rats maigres. En ce qui concerne la leptine gastrique, ils ont observé une augmentation de l'expression et de la concentration de la leptine chez le rat fa/fa en comparaison avec le rat maigre. Le taux de leptine est 2.6 fois supérieure et l'expression ARNm 1.8 fois supérieure chez le rat fa/fa nourri. Le contenu de leptine gastrique est affecté chez le rat maigre et le rat fa/fa par l'état de jeûne et post-prandial. Après 14 heures de jeûne, la leptine gastrique est diminuée chez les rats maigres (40% de moins que le rat maigre nourri ad libitum) et fa/fa (25% de moins que le rat obèse nourri ad libitum). Une période de réalimentation de 20 minutes conduit à une chute de leptine gastrique 45 minutes après le stimulus alimentaire chez les rats maigres (64% de moins que le rat maigre à jeun) et fa/fa (38% de moins que le rat fa/fa à jeun). L'expression de l'ARNm varie chez les rats maigres en fonction de l'état de jeûne mais pas chez les rats fa/fa. Ainsi, l'équipe de Pico suggère une régulation anormale de l'expression de la leptine au niveau de l'estomac et des cellules adipeuses possiblement secondaire à la fonction anormale du récepteur (Pico et al, 2002).

La leptine a aussi été étudiée chez un autre modèle animal de diabète mais cette fois, un modèle de diabète insulino-dépendant induit par la streptozotocine. En 1996, on avançait que l'expression de leptine est réduite de 50% chez le rat Sprague Dawley

ayant une hyperglycémie induite par la streptozotocine (Igel et al, 1996). Plusieurs études ont démontré que l'expression du gène *ob* augmente après l'administration d'insuline ou de glucose et diminue chez les animaux diabétiques insulino-dépendant. Havel et son équipe ont déterminé la concentration de leptine circulante chez le rat après l'induction d'un diabète et ont ensuite traité l'animal à l'insuline pour observer la réponse de la leptine (Havel et al, 1998). La leptine diminue de $43\pm 4\%$ 24 heures après la première injection de streptozotocine, puis elle diminue de $63\pm 3\%$ après 48 heures et une deuxième injection de streptozotocine. Après 72 heures, le taux de leptine avait diminué de $73\pm 2\%$ puis demeure à ce taux pour les deux semaines subséquentes. On note que les rats diabétiques deviennent hyperphagiques après le quatrième jour et augmentent graduellement leur apports alimentaires. Chez certains de ces rats, des injections d'insuline ont été administrées. Après 2 jours d'insuline, la glycémie a diminué de 60%, la concentration plasmatique de leptine a augmenté de 500% et l'apport alimentaire diminue graduellement. Suite à cette observation, plusieurs ont suggéré que l'hypoleptinémie, possiblement avec l'hypoinsulinémie, pouvait jouer un rôle dans l'hyperphagie chez le rat diabétique via une augmentation du NPY et du AgRP hypothalamiques (Havel et al, 1998). Par la suite, une équipe a administré de la leptine à des rats diabétiques hypoinsulinémiques, hypoleptinémiques et hyperphages (Sindelar et al, 1999). Ils ont observé que l'administration de leptine diminue les apports alimentaires malgré une persistance de l'hypoinsulinémie suggérant que l'hypoinsulinémie seule ne soit pas suffisante pour induire l'hyperphagie chez le rat diabétique. Plusieurs équipes ont toutefois démontré que l'hyperphagie se corrigeait après administration d'insuline. De plus, la ghreline a aussi été impliquée dans le

mécanisme de l'hyperphagie puisqu'une équipe a démontré une augmentation du taux plasmatique chez le rat diabétique en plus d'une augmentation non significative de l'expression du gène au niveau de la muqueuse gastrique (Ishii et al, 2002).

En plus d'être impliquée dans le mécanisme de l'hyperphagie chez le rat diabétique, la leptine joue aussi un rôle important dans le contrôle de la glycémie en régulant la néoglucogenèse hépatique, la consommation périphérique de glucose et la dépense énergétique (Chinookoswong et al, 1999). La leptine semble jouer certains de ces rôles en augmentant la sensibilité à l'insuline par un mécanisme impliquant le système nerveux central. Effectivement, une équipe a administré de la leptine au niveau des ventricules intracérébraux pendant deux semaines et ont observé une baisse marquée de la résistance à l'insuline ainsi qu'une correction de la glycémie à l'intérieur de quatre jours (Hidaka et al, 2002).

Diabète type 1 et type 2

Le rôle de la leptine dans la pathogenèse du diabète et de l'obésité a été étudié tant chez le modèle animal que chez l'humain. Plusieurs observations ont été faites chez l'humain, mais beaucoup de controverses demeurent. De façon générale, la leptine est considérée augmentée dans les états d'hyperinsulinémie tel que le diabète de type 2. Toutefois, en comparant un groupe de patients diabétiques avec un groupe de patients non-diabétiques de même poids et âge, le taux de leptine semble être inférieur chez les diabétiques lorsque les deux sexes sont combinés (Tatti et al, 2001). Il n'y a donc pas encore de consensus certain concernant le taux de leptine chez le patient diabétique de

type 2 contrôlé pour l'obésité. Cependant, il est clairement établi que la leptine plasmatique est diminuée chez les enfants diabétiques de type 1 et augmentée chez les enfants obèses (Kirel et al, 2000). En dosant la leptine chez des enfants avec acidocétose diabétique, avec diabète de type 1 contrôlé et chez des enfants en bonne santé, on note une baisse significative chez les enfants en acidocétose (4,9 +/- 1,2 ng/ml, 9,0 +/- 1,8 ng/ml et 11,2 +/- 2,1 ng/ml respectivement). En traitant l'acidocétose avec une perfusion d'insuline et de liquide on note une augmentation progressive de la leptine plasmatique jusqu'à des taux similaires à ceux d'enfants diabétiques bien contrôlés (Hathout et al, 1999). Ainsi, le rôle de la leptine chez le patient diabétique n'est pas aussi clair que chez le modèle animal et les résultats obtenus jusqu'à maintenant sont souvent divergents ou influencés par plusieurs facteurs confondants. Il reste donc beaucoup à faire pour éclaircir le rôle de la leptine dans la pathophysiologie du diabète de type 1 et 2.

Objet du présent travail

La leptine est une hormone bien particulière puisqu'en plus d'être sécrétée dans le sang comme toutes les autres hormones, elle est aussi sécrétée de façon exocrine au niveau de l'estomac. Le mécanisme de sécrétion de la leptine tant au niveau des adipocytes qu'au niveau de la muqueuse gastrique n'est pas encore complètement éclairci. La leptine gastrique est sécrétée principalement par les cellules à pepsinogène tel qu'observé par immunohistochimie et immunocytochimie. Toutefois, le processus de synthèse et de maturation auquel sont soumis les protéines au cours de leur passage dans le réticulum endoplasmique rugueux puis dans l'appareil de Golgi n'a jamais été décrit pour la leptine. De plus, la sécrétion exocrine de la leptine soutend qu'il y a forcément un site d'action situé au niveau de la paroi luminale du tube digestif. La technique d'immunocytochimie à l'or colloïdal par microscopie électronique permet de localiser avec une extrême précision une molécule au niveau de la membrane plasmique et des organelles intracellulaires. Le présent travail a donc pour but d'étudier par morphologie, en employant l'immunohistochimie et l'immunocytochimie, le processus de sécrétion de la leptine au sein des cellules à pepsinogène de l'estomac de rat en plus d'identifier la localisation précise du récepteur de la leptine au niveau de l'intestin de rat. La présence de leptine au niveau de la muqueuse gastrique a aussi été analysée par la méthode de western-blot.

La leptine gastrique a rarement été étudié chez des modèles animaux présentant certaines pathologies tel que l'obésité et le diabète. Il est universellement reconnu qu'en

étudiant les modèles animaux présentant des pathologies, il est souvent plus facile de comprendre les différents processus physiologiques. Jusqu'à maintenant, deux études démontrent des résultats divergents à l'égard de la leptine gastrique chez le rat fa/fa obèse et aucune étude n'a encore étudié la leptine gastrique chez les rats diabétiques insulino-dépendants. Nous avons donc comparé par différentes méthodes semi-quantitatives et quantitatives la présence de leptine dans la muqueuse gastrique de rats Sprague Dawley contrôles, de rats Sprague Dawley diabétiques et de rats Zucker fa/fa obèses. Cette étude apportera des nouveaux éléments dans la compréhension du rôle de la leptine gastrique et dans les mécanismes régulant sa sécrétion exocrine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Généralités

Modèles animaux

Les animaux que nous utilisons proviennent tous de chez Charles River Canada. Le diabète expérimental est induit chez des rats Sprague-Dawley mâles d'environ 100g par l'injection intrapéritonéale de 70mg/kg de streptozotocine diluée dans du citrate de sodium 10mM (pH4,5). La streptozotocine est une drogue cytotoxique qui détruit de façon spécifique les cellules bêta des îlots de Langerhans au niveau du pancréas. Cette destruction est irréversible et provoque une diminution importante des taux circulants d'insuline. Ainsi, 48 heures après l'injection, les rats présentent un hyperglycémie importante tel que rencontré dans le diabète insulino-dépendant de type 1. Notons que les rats sont sacrifiés 9 mois après l'induction du diabète par la streptozotocine.

Les rats Zucker fa/fa présentent la mutation fatty découverte en 1961 (Zucker et al, 1961). La mutation est autosomique et récessive et détermine une obésité avec hyperphagie et hyperinsulinémie, mais un taux de glucose normal. Cette mutation est en fait une substitution Gln par Pro à la position 269 dans le domaine extracellulaire du récepteur à la leptine le rendant moins fonctionnel (Chua et al, 1996). Les rats utilisés pour l'expérimentation ont dix semaines de vie au moment du sacrifice.

Les animaux sont gardés dans des conditions similaires avant le prélèvement des tissus. Ils sont tous nourris ad libitum et sacrifiés au même moment de la journée suite à une anesthésie à l'uréthane. Les tissus sont prélevés, nettoyés avec du liquide

physiologique et préparés selon les différentes méthodes pour la microscopie optique, la microscopie électronique, le western blot et l'ELISA.

Anticorps primaires

Les anticorps primaires utilisés pour révéler la leptine ainsi que pour le western blot sont des anticorps polyclonaux développés chez le lapin contre un peptide correspondant aux acides aminés 137-156 (COOH terminaux) de la protéine leptine d'origine humaine (A-20; Santa Cruz Biotechnology, CA). L'anticorps Ob (A-20) réagit avec la leptine de souris, de rat et humaine. Il n'y a pas de réaction croisée avec d'autres protéines connues.

Les anticorps primaires utilisés pour révéler le récepteur à leptine sont des anticorps polyclonaux développés chez le lapin contre une séquence de 18 acides aminés situés près de l'extrémité C-terminal du récepteur Ob-Rb de la souris (OBR-A; BIOTREND, Germany). Cette séquence est unique à l'isoforme Ob-Rb. Les anticorps ne détecteront par conséquent que les récepteurs de forme longue. La séquence est conservée à 94% chez le rat et 88% chez l'humain. La séquence n'a aucune homologie avec la gp130, une protéine avec une haute similitude, et les anticorps n'ont aucune réaction croisée avec d'autres protéines connues.

Immunohistochimie

Tissus utilisés

Les tissus gastriques (antre et fundus) de 3 rats Sprague Dawley contrôles, de 4 rats Sprague Dawley diabétiques et de 2 rats Zucker fa/fa ont été fixés dans le Bouin, déshydratés puis enrobés dans la paraffine, alors que les tissus intestinaux (duodénum) de rats Sprague Dawley contrôles seulement ont été fixés dans la paraformaldéhyde 4%, déshydratés avec de l'éthanol puis enrobés dans la paraffine. Des tranches minces de 4µm d'épaisseur ont été montées sur lame.

Immunodétection

Les coupes de tissus sont tout d'abord déparaffinées dans du xylène deux fois pendant 5 minutes puis réhydratées dans des bains d'alcool successifs de moins en moins concentrés (100%, 95%, 70% 50% et 30%) pour terminer avec deux bains de PBS de 5 minutes chacun. Ensuite, les tissus sont immergés pendant 20 minutes à la température de la pièce dans une solution de H₂O₂ 0,3% dans le méthanol afin d'éliminer la peroxydase endogène. Après trois lavages de 5 minutes dans du PBS, les tissus sont incubés pendant 20 minutes à la température de la pièce avec une solution d'ovalbumine 1% dans du PBS. Les tissus sont à nouveau lavés dans le PBS et incubés pendant 24 heures, dans une chambre humide, à 4°C avec l'anti-leptine à une concentration 1:20 dans le PBS ou avec l'anti-ObRb à concentration 1:20 dans le PBS. Par la suite, les tissus sont lavés dans le PBS et incubés pendant 1 heure, dans une chambre humide, à la température de la pièce avec l'anticorps secondaire, un anticorps anti-IgG de lapin

conjugué à la biotine à une concentration 1:200. Finalement, les tissus sont incubés pendant 30 minutes à la température de la pièce avec la solution ABC (Vectastain ABC kit, Vector). La méthode ABC, pour Avidine : Biotine Complexe, consiste à mettre l'anticorps conjugué à la biotine en contact avec l'avidine, une molécule qui se lie de façon presque irréversible à la biotine, et une enzyme, la peroxydase, elle aussi conjuguée à la biotine. Cette réaction permet la formation de complexes macromoléculaires plus facilement identifiables augmentant la sensibilité de la détection moléculaire. La réaction de la peroxydase est développée pendant 5 minutes à l'aide de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 0,05% dans le PBS auquel est ajouté 1 µl de H₂O₂ 30% par ml de DAB. Des lames témoins sont aussi montées en même temps que les lames expérimentales. Pour ces lames témoins, toutes les étapes à suivre sont les mêmes à l'exception de l'incubation avec l'anticorps primaire qui est remplacée par une incubation de même durée avec du PBS.

Immunocytochimie

Tissus utilisés

Pour la microscopie électronique, les tissus gastriques (fundus) et intestinaux (duodénum, jéjunum et iléon) prélevés chez 3 rats Sprague Dawley contrôles, 4 rats Sprague Dawley diabétiques et 2 rats Zucker fa/fa obèse ont été fixés à la glutaraldehyde 1% dans un tampon phosphate à 0,1 M (pH7,4) pendant 24h, déshydratés avec de l'éthanol et enrobés dans le Lowicryl K4M à -30°C (Bendayan, 1995). Les tissus préparés pour la microscopie électronique sont tranchés en coupes fines de 80 à

100 nm qui sont apposées sur des grilles de nickel enduites de films de Parlodion et de carbone (Bendayan, 1995).

Immunomarquage

Tout d'abord, pour les tissus gastriques, les grilles sont déposées sur une goutte (environ 10 μ l) de solution aqueuse saturée de métapériodate de sodium (NaIO₄) pendant 10 minutes à la température de la pièce. Après avoir été lavées avec de l'eau millipore, en flottant dans des petits bassins de porcelaine, les grilles sont incubées pendant 5 minutes à la température de la pièce sur une goutte d'ovalbumine 1% dans du PBS. Ensuite, les grilles sont transférées sans être lavées sur une goutte d'anti-leptine à une concentration 1:200 ou une goutte d'anti-ObRb à une concentration 1:20 et incubées pendant 24 heures à 4°C. Une fois l'incubation terminée, les grilles sont lavées en les faisant flotter dans 5 bassins successifs contenant du PBS pendant 5 minutes chacun et en les faisant tourner grâce à une plaque magnétique. Les grilles sont alors à nouveau incubées pendant 5 minutes à la température de la pièce sur une goutte d'ovalbumine 1% dans PBS puis transférées pendant 30 minutes, toujours à la température de la pièce, sur une goutte d'un complexe protéine A-or (taille des particules d'or de 10 nm) dilué dans PBS/PEG (0,02%) pour obtenir une densité d'absorbance de 0,5 à $\lambda_{\max} = 525$ nm tel que décrit par Bendayan (1995). Après cette dernière incubation, les grilles sont lavées et rincées avec un jet de PBS puis un jet d'eau. Les grilles sont mises à sécher sur un papier filtre avant d'être colorées pendant 10 minutes à la température de la pièce sur une goutte d'acétate d'uranyl 13%. Une grille contrôle est réalisée en effectuant les mêmes étapes à l'exception de l'incubation avec l'anticorps primaire qui est remplacée par une

incubation de même durée avec une solution préparée 24 heures à l'avance qui consiste à mettre l'anticorps primaire en présence de son antigène (leptine) en excès.

Les tissus intestinaux sont tranchés et déposés sur les grilles tout comme les tissus gastriques. Toutefois, les étapes subséquentes diffèrent légèrement. Les grilles sont incubées 10 minutes avec le métapériodate puis lavées en flottant sur plusieurs bains successifs d'eau. Ensuite, elles sont incubées 20 minutes sur une goutte de glycine, puis 20 minutes sur une goutte d'ovalbumine 1% dans le PBS et finalement 2 heures à la température de la pièce sur une goutte d'anti-ObRb à une concentration de 1:50 dans PBS. Par la suite, les grilles sont lavées et incubées avec le complexe protéine A-or de la même façon que les tissus gastriques (Bendayan, 1995).

Toutes les grilles sont observées à l'aide d'un microscope électronique Philips 410.

Évaluation quantitative

L'immunomarquage par méthode de post-enrobage est avantageuse pour les études quantitatives puisque les marqueurs n'ont pas à diffuser dans la cellule, ils n'ont qu'à se déposer à la surface de la coupe. Seuls les sites antigéniques exposés par la coupe du tissu et situés à la surface peuvent interagir avec les anticorps et être révélés par les particules d'or. Ainsi, peu importe la localisation du site antigénique au niveau extracellulaire ou intracellulaire, tous les sites antigéniques ont la même probabilité d'être marqué. Il n'y a donc pas de limitation tel que l'épaisseur de la coupe, la grosseur du bloc de tissu, la localisation du site antigénique ou des facteurs de diffusion qui

pourraient interférer dans le marquage des antigènes. Puisque les particules d'or ne peuvent pénétrer dans le tissu, la surface de marquage est fiable. Il est donc possible d'exprimer un marquage par le nombre de particules par unité de surface. Lorsque les conditions d'expérimentation sont identiques au niveau de la préparation des tissus et de l'immunomarquage, il est possible de comparer les densités de marquage entre deux spécimens.

Une évaluation quantitative du marquage des cellules principales à pepsinogène de la muqueuse gastrique, est faite par planimétrie en employant le système Videoplan-2 (Carl Zeiss; Don Mills, Ontario, Canada). Initialement, nous choisissons de façon aléatoire 17 champs d'exposition par animal, à un agrandissement de 16 900x, démontrant du réticulum endoplasmique rugueux, l'appareil de Golgi, des granules de sécrétion et des mitochondries dans le tissu gastrique de rats Sprague Dawley normaux incubé avec l'anticorps primaire contre la leptine. Nous choisissons aussi 7 champs d'exposition par animal, à un agrandissement de 16 900x, de chacune des composantes cellulaires mentionnées précédemment dans le tissu gastrique de rat Sprague Dawley normal incubé avec la solution d'anticorps absorbés avec la leptine purifiée utilisée comme contrôle. La densité de marquage des régions d'intérêts est évaluée en nombre de particule d'or par micromètre carré (μm^2). Lors d'une première étape, la surface occupée par les compartiments cellulaires est évaluée directement par planimétrie et ensuite, le nombre de particules d'or présentes sur ces mêmes compartiments est compté. Le rapport de ces valeurs nous fourni la densité de marquage pour chacun des compartiments.

Pour l'étude comparative du contenu de leptine chez les rats Sprague Dawley contrôles (3 animaux), Sprague Dawley diabétiques (4 animaux) et Zucker fa/fa (2 animaux), nous choisissons de façon aléatoire 45 champs d'exposition, pour chacun des modèles animaux, démontrant des granules de sécrétion dans le tissu gastrique marqué pour la leptine. Une analyse statistique est faite grâce à l'analyse du t de Student exécutée par le système Videoplan-2 (Carl Zeiss; Don Mills, Ontario, Canada).

Western Blot et ELISA

Tissus utilisés

Les tissus utilisés pour les études de Western Blot et pour l'ELISA sont préparés de la même façon. Le Western Blot n'est réalisé que sur les tissus de rat Sprague Dawley normal alors que le dosage par ELISA est réalisé sur les tissus d'un rat Sprague Dawley normal, d'un rat Sprague Dawley diabétique et de 3 rats Zucker fa/fa. Les animaux qui servent aux études par ELISA ne sont pas les mêmes qui ont servi aux études morphologiques par microscopie optique et électronique. Immédiatement après le prélèvement, les tissus sont lavés avec du salin puis plongés dans l'azote liquide. Par la suite, les tissus sont coupés en morceau de 0,2g chacun et déposés dans des éprouvettes avec 2ml de réactif d'extraction Bicine 25mM, NaCl 150mM (pH7,6) (T-Per, Pierce, IL). On fait un premier broyage aux ciseaux. On ajoute aux échantillons 80 μ l de Triton, 80 μ l de PMSF, 40 μ l de leupeptine et 10 μ l de trasylol dilué. Nous mélangeons ensuite les échantillons avant l'homogénéisation avec le polytron. Il est important de toujours

garder les tissus sur la glace afin de ne pas dénaturer les protéines. Une fois l'homogénat obtenu, nous centrifugeons les échantillons à 10 000RPM, à 4°C pendant 5 minutes. On retire le surnageant avec une pipette en évitant de prendre ni le culot, ni la graisse. Finalement, on pèse le surnageant et on procède au dosage des protéines. Pour ce faire, nous utilisons une méthode colorimétrique (BCA Protein Assay Kit, Pierce, IL). L'homogénat de tissu est mis en contact avec un réactif contenant du Cu^{+2} dans un milieu alcalin et une réaction de réduction se fait entre les protéines et le cuivre. Le cation Cu^{+1} résultant de cette réaction se lie à 2 molécules d'acide Bicinchoninic (BCA) et produit ainsi un complexe de couleur violette ayant une forte absorption à 562nm. Cette absorption augmente de façon linéaire en fonction de la concentration de protéines dans l'homogénat. Les échantillons sont conservés à -80°C.

Électrophorèse, transfert et marquage des protéines

Initialement, nous préparons le gel de séparation 15% et le gel de concentration 4% à base d'acrylamide. Ensuite, nous préparons les échantillons avec des quantités adéquates de protéines provenant des homogénats (25 μg de protéine par puits). Nous utilisons un contrôle de poids moléculaires (Rainbow, Amersham pharmacia biotech, NJ) qui suite à l'électrophorèse présente des bandes de différentes couleurs dont les poids varient de 14,3K à 220K. Nous utilisons aussi un échantillon de contrôle positif contenant 0,05 μg de leptine recombinante humaine pure (Leptine, Sigma Aldrich, Oakville, ONT). Le tampon rose (colorant rose; 0,3 M Tris-HCl, pH6,8; SDS 5%; Glycerol 50%; DTT 100nM) est ajouté et les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes sauf pour le contrôle de poids moléculaire qui lui n'est chauffé que 2 minutes.

Les échantillons sont centrifugés puis versés dans les puits. Nous remplissons la chambre d'électrophorèse avec le tampon d'électrophorèse contenant 3g de Tris, 14,4g de glycine et 1g de SDS dans un volume total de 1litre complété avec de l'eau stérile. L'électrophorèse dure 45 minutes à 175 volts puis 5 minutes à 200 volts. Nous trempions les gels pendant 15 minutes dans le tampon de transfert contenant 1,93g de tris et 9g de glycine dans un volume total de 1litre complété avec de l'eau distillée. Nous procédons ensuite au transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose pendant 1heure et 30 minutes à 100 volts. Les membranes sont ensuite rincées pendant 10 minutes dans le TBS et bloquées pendant 24 heures dans 15 ml d'une solution de lait 5% à 4°C.

Le marquage se fait en deux étapes. Il faut initialement incuber la membrane avec l'anticorps primaire développé chez le lapin contre la leptine. Cette incubation dure 1heure et 30 minutes et se fait dans une solution d'anticorps 1/200 diluée dans le lait 1%. Par la suite, il y a deux rinçages de 10 minutes chacun dans une solution de TBS-Tween 0,05% puis deux autres rinçages de 10 minutes aussi dans le lait 0,5%. La deuxième incubation se fait avec l'anticorps secondaire polyclonal développé chez le mouton contre les anticorps de lapin et conjugué avec la peroxydase de raifort. Cette incubation dure 45 minutes et se fait dans une solution d'anticorps de 40 mU/ml dans le lait 1%. Il faut ensuite rincer la membrane dans 4 bains successifs de TBS-Tween 0,05% d'une durée chacun de 15 minutes. Les membranes sont finalement incubées pendant 5 minutes avec la solution réactionnelle (Lumi-light plus, Roche Molecular Biochemicals, Germany). Les membranes sont placées entre deux plastiques

transparents et nous procédons à l'exposition des films dans le noir pour ensuite les développer selon la méthode standard.

Principe de l'ELISA

Pour effectuer les dosages de leptine par la méthode ELISA, nous utilisons une trousse de détection de la leptine de souris qui a une réaction croisée de 90% avec la leptine de rat et 10% avec la leptine humaine (Mouse Leptin ELISA Kit cat90030, Crystalchem, IL). Le principe de la réaction est simple. Les puits de la microplaque sont recouverts d'anticorps de lapin contre la leptine de souris. Nous déposons dans chacun des puits les homogénats de tissus et un antiserum de cochon d'inde contenant des IgG contre la leptine de souris. Par conséquent, la leptine de souris reste en sandwich, entre l'anticorps de lapin et l'anticorps de cochon d'Inde, fixée à la microplaque. Par la suite, le complexe fixé à la microplaque est mis en contact avec un anticorps secondaire anti-cochon d'inde conjugué à la peroxydase de raifort. Par la suite le substrat (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) est ajouté et la réaction enzymatique permet de détecter le marquage. L'absorption est mesurée et corrélée avec la concentration correspondante de leptine dans l'échantillon.

Technique de l'ELISA

Nous débutons par la préparation du standard. Il faut pipeter 50 μ l de tampon de dilution et 50 μ l de solution de leptine de souris 25 600 pg/ml dans un microtube et bien mélanger. Par la suite, il faut pipeter 50 μ l de tampon de dilution dans 6 autres microtubes qui serviront à effectuer les dilutions suivantes. Nous pipetons donc 50 μ l de

la première dilution dans le deuxième microtube et nous mélangeons. Et nous effectuons les mêmes étapes avec les tubes suivants pour obtenir au total 7 microtubes avec des dilutions de 12 800pg/ml, 6 400pg/ml, 3 200pg/ml, 1 600pg/ml, 800pg/ml, 400pg/ml et 200pg/ml. Un huitième microtube est ajouté avec seulement 50 μ l de tampon de dilution.

Ensuite, il faut rincer la microplaque à deux reprises avec 300 μ l de tampon de rinçage dans chaque puits et bien aspirer le tampon par la suite afin qu'il ne reste plus de liquide dans les puits. Dans chaque puits nous pipetons 45 μ l de tampon de dilution, 50 μ l de l'antisérum de cochon d'inde anti-leptine de souris et 5 μ l de l'homogénat de tissu. Nous recouvrons la plaque et incubons pour 16 à 20 heures à 4°C. Il faut aspirer de nouveau le contenu des puits afin de bien les vider et rincer la microplaque à 5 reprises avec 300 μ l de tampon de rinçage à chaque fois. Nous ajoutons 100 μ l de la solution d'IgG, contre les anticorps de cochon d'inde, conjugués à la peroxydase et nous incubons pour 3 heures à 4°C. Nous vidons le contenu des puits et rinçons à 7 reprises avec 300 μ l de tampon de rinçage dans chaque puits. Il faut finalement ajouter 100 μ l de substrat (TMB) et laisser la réaction se faire pendant 30 minute à la température de la pièce et à l'abris de la lumière. Nous arrêtons ensuite la réaction avec une solution d'arrêt et nous mesurons l'absorption à 450nm avec une référence de 620nm en mode lin/log à l'aide d'un spectrophotomètre à filtre LP400. Nous traçons la courbe standard et la concentration des échantillons est déterminée à l'aide de cette courbe standard. La précision intra-assay de la trousse de détection de la leptine utilisée (Mouse Leptin ELISA Kit cat90030, Crystalchem, IL) est C.V. = 5,4% et la précision inter-assay est

C.V. = 6,9%. La trousse a aussi une sensibilité pouvant détecter une quantité de leptine aussi petite que 1pg/puits. La réactivité indétectable à plusieurs substances autres que la leptine nous démontre la présence d'une certaine spécificité.

RÉSULTATS

Sécrétion de la leptine gastrique chez le rat Sprague Dawley normal

Immunohistochimie

L'immunomarquage observé en microscopie optique démontre la présence de leptine au niveau de la muqueuse gastrique de rat. Le marquage est effectivement présent à la base des longues glandes tubulaires dont les sécrétions se vident dans les cryptes de l'estomac (figure 3a). Toutes les glandes gastriques possèdent de façon uniforme un certain nombre de cellules marquées. Les glandes possèdent à leur base plusieurs cellules marquées et quelques cellules qui ne le sont pas. Dans le haut des glandes gastriques, il y a plusieurs cellules qui ne sont pas marquées et quelques cellules marquées. Les cellules muqueuses et le tissu conjonctif ne contiennent aucune trace de leptine. Les cellules qui sont marquées ressemblent aux cellules principales par leur morphologie et leur localisation. Sur la coupe transversale des glandes, il est possible d'identifier la lumière des glandes gastriques et de voir que le signal se trouve clairement au niveau apical des cellules (figure 3b). Le marquage retrouvé sur les coupes incubées avec l'anticorps primaire anti-leptine ne se retrouve pas sur les coupes incubées avec le PBS et traitées de la même façon pour tout le reste du protocole (contrôle négatif) ce qui valide la spécificité des résultats.

Immunocytochimie

En utilisant l'immunocytochimie par microscopie électronique, les sites antigéniques de la leptine ont été mis en évidence par des particules d'or colloïdal au niveau des cellules principales sécrétrices de pepsinogène. Le réticulum endoplasmique rugueux, l'appareil de Golgi ainsi que les nombreux granules de sécrétion présentent un

marquage important (figures 4a et 4b). Effectivement, les granules de sécrétion marqués par des particules d'or sont situés dans la portion apicale des cellules principales. Une absence pratiquement totale de particules d'or est observée dans les cellules pariétales sécrétrices d'acide chloridrique, les cellules endocrines et les cellules muqueuses. Une absence de particules d'or dans les mitochondries et au niveau du noyau confirme la spécificité du marquage au sein des organelles cellulaires. Une expérience de marquage utilisant une solution d'anticorps contre la leptine mélangée à une quantité 10 fois plus grande de leptine ne montre pas de particule d'or déposée de façon spécifique, confirmant la liaison de notre anticorps à son antigène (contrôle de spécificité). Il faut aussi mentionner que les cellules principales ne démontrent pas toutes la même intensité de marquage, particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique (figure 4c). Certaines cellules ont un réticulum endoplasmique entièrement marqué de façon spécifique alors que dans d'autres cellules le réticulum est marqué que par quelques particules d'or.

Évaluation quantitative

Tel que mentionné précédemment, nous avons procédé à une évaluation quantitative de la leptine au sein des différents compartiments cellulaires. Le tableau 1 rapporte donc les densités de marquage obtenues dans les diverses organelles impliquées dans la voie de sécrétion. Ces chiffres permettent de confirmer dans un plus grand échantillon, les résultats montrés dans le nombre restreint de figures présentées dans ce mémoire. Nous remarquons donc dans ce tableau que la densité de marquage obtenue dans le tissu gastrique incubé avec l'anticorps primaire anti-leptine augmente le long des

compartiments de la voie de sécrétion. C'est à dire que les plus faibles densités de marquage ont été obtenues pour le réticulum endoplasmique rugueux, qu'elles augmentent au niveau de l'appareil de Golgi et qu'elles augmentent encore davantage au niveau des granules de sécrétion. Ceci reflète la condensation, la concentration et la maturation de la protéine tout au long de son parcours à travers les éléments de la voie de sécrétion régulée.

Nous avons mesuré la densité de marquage au sein des mitochondries en guise de contrôle. Nous avons aussi effectué des contrôles de spécificité en effectuant une évaluation quantitative sur des spécimens incubés avec une solution d'anticorps anti-leptine absorbés avec la leptine recombinée à concentration dix fois plus élevée. Ces contrôles ont démontré des marquages de très faibles densités suggérant fortement que le site de liaison de l'anticorps se lie effectivement à la bonne protéine. Ces résultats figurent aussi dans le tableau 1 (page 79) en tant que contrôle de spécificité. Nous avons finalement effectué dans le laboratoire le marquage de la leptine dans l'estomac d'une souris ob/ob déficiente en leptine. Encore une fois, la densité de marquage retrouvée est très faible appuyant davantage la spécificité de l'anticorps utilisé et de nos résultats.

Récepteur de la leptine au niveau gastrique et intestinal

En microscopie optique, le marquage pour le récepteur de la leptine Ob-Rb au niveau de la muqueuse gastrique est sensiblement le même que le marquage pour la leptine (figure 5a). Effectivement, plusieurs cellules sont marquées dans la moitié

inférieure des glandes tubulaires. Nous avons toutefois l'impression que le marquage est un peu moins intense et qu'il se retrouve sur un plus petit nombre de cellules. Les cellules qui sont marquées pour le récepteur à la leptine nous semblent être aussi les cellules principales en raison de leur morphologie telle que décrite précédemment.

En microscopie électronique, le marquage pour le récepteur de la leptine Ob-Rb ressemble aussi à celui de la leptine. Certaines cellules principales démontrent un réticulum endoplasmique rugueux marqué de façon très précise par les particules d'or. Nous retrouvons aussi le marquage pour le récepteur Ob-Rb au niveau de l'appareil de Golgi et surtout au niveau des granules de sécrétion (figure 5b). Aucune évaluation quantitative n'a été effectuée, mais le marquage est très spécifique pour les compartiments cellulaires impliqués dans la voie de sécrétion. Il n'y a pratiquement aucun marquage au niveau des mitochondries et des noyaux cellulaires ce qui précise le niveau de spécificité.

Nous avons tenté de marquer le récepteur de la leptine de forme longue Ob-Rb au niveau de la muqueuse intestinale (duodénum, jéjunum et iléon) par immunohistochimie, mais les résultats obtenus étaient difficilement interprétables étant donné le peu de différence entre le tissu incubé avec l'anticorps primaire et le tissu incubé avec le PBS en guise de contrôle. Nous avons donc marqué le récepteur à la leptine par immunocytochimie, afin de mieux voir les structures cellulaires au microscope électronique. Au niveau de la bordure en brosse, sur la membrane plasmique des microvillosités, nous observons un marquage spécifique et relativement

dense pour le récepteur à la leptine (figure 6a). La coupe transverse des microvillosités nous permet davantage d'apprécier la localisation membranaire des récepteurs (figure 6b). Le récepteur n'a pas été retrouvé sur les cellules muqueuses intestinales ni sur les cellules endocrines situées le long de l'intestin. Il semble que le récepteur soit aussi présent au niveau de la membrane basolatérale mais le marquage est moins important que sur les microvillosités.

Leptine gastrique chez le rat diabétique et chez le rat fa/fa

Immunohistochimie

Nous avons observé en microscopie optique des tissus prélevés chez le rat Sprague Dawley diabétique et chez le rat Zucker fa/fa obèse après l'immunodétection de la leptine. Chez les deux modèles animaux, nous observons la présence de leptine au niveau de la muqueuse gastrique, principalement localisée dans la moitié inférieure des glandes tout comme pour le rat normal. De plus, l'intensité du marquage ne nous semble pas très différente tant chez le rat diabétique que chez le rat fa/fa (figure 7). Cependant, il faut noter que l'intensité du marquage pouvait varier en fonction des coupes observées chez le même animal. Nous ne notons aucune variété histologique liée à l'une ou l'autre des pathologies et il est difficile de juger du nombre de cellules marquées à l'intérieur de la coupe puisque nous avons noté que l'angulation de la coupe pouvait fausser le comptage. Ainsi, nous retenons qu'il n'y a aucune différence détectable par microscopie optique entre le contenu de leptine gastrique entre le rat Sprague Dawley normal, le rat Sprague Dawley diabétique et le rat Zucker fa/fa.

Immunocytochimie

Nous avons ensuite observé les mêmes tissus par microscopie électronique après immunomarquage à l'or colloïdal de la leptine dans chacun des tissus. Nous n'avons observé aucune modification au niveau de la morphologie cellulaire chez les modèles pathologiques. Comme pour le rat normal, nous avons détecté la présence de leptine au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, de l'appareil de Golgi et des granules de sécrétions des cellules à pepsinogène. Ainsi, nous n'avons pas noté de différence dans la voie de sécrétion de la leptine. Sans effectuer d'évaluation quantitative, nous avons remarqué qu'il n'y avait pas de différence majeure dans le nombre de granules de sécrétion au sein des cellules à pepsinogène, ni dans la grosseur des granules. Nous n'avons pas trouvé de cellules endocrines marquées pour la leptine tout comme chez le rat normal. La seule différence notée subjectivement en observant en microscopie électronique est la possibilité d'une densité de marquage légèrement augmentée dans les granules de sécrétion de rat Zucker fa/fa. Cette observation nous a fortement incité à effectuer une évaluation quantitative afin de comparer les densités de marquage des granules de sécrétion entre les rats normaux et les modèles pathologiques.

Évaluation quantitative

Nous avons procédé à une évaluation quantitative chez 3 rats Sprague Dawley contrôle, 4 rats Sprague Dawley diabétiques et 2 rats Zucker fa/fa. Nous avons observé une coupe de tissu provenant de chaque animal du groupe contrôle et du groupe diabétique. Pour les rats fa/fa, nous avons observé 3 coupes de tissu provenant de chaque animal.

Nous avons rapporté dans le tableau 2 (page 80) les densités de marquage au niveau des granules de sécrétion pour chacun des modèles animaux. Nous avons spécifié les valeurs maximales et minimales obtenues dans les animaux de chacun des modèles. Nous avons aussi identifié l'étendue des résultats entre les animaux d'un même groupe et finalement la densité moyenne de chacun des modèles animaux. La très grande étendue des résultats obtenus entre animaux du même groupe représente une forte variabilité entre les spécimens.

Le test de student effectué entre la densité moyenne des rats diabétiques en comparaison avec les rats normaux donne une valeur $p = 0,25$ alors que celui effectué entre la densité moyenne des rats fa/fa en comparaison avec les rats normaux donne une valeur $p \leq 0,05$.

Western Blot

Le résultat du western blot (figure 7) vient nous confirmer que les marquages observés en immunohistochimie et immunocytochimie correspondent bien au marquage de la leptine puisqu'il nous permet de déterminer la masse moléculaire de la protéine marquée par l'anticorps. Effectivement, sur le gel démontrant le résultat du western blot, il est possible d'identifier le masse moléculaire d'une bande située à 16 kDa. Cette bande est conforme à la masse moléculaire de la leptine décrite dans la littérature (Halaas et al, 1995). De plus, la leptine recombinante humaine, en guise de contrôle positif, a été insérée dans le puits adjacent démontrant aussi la bande située à 16 kDa confirmant doublement la présence de leptine au niveau de la muqueuse gastrique. Il est

aussi important de mentionner la présence d'une bande située juste au-dessus de la bande de 16 kDa. Cette bande située à 19 kDa approximativement correspond à ce qui a été décrit dans la littérature comme étant probablement une proprotéine (Bado et al, 1998). Fait intéressant à remarquer, cette bande ne se retrouve pas sur le contrôle positif contenant de la leptine pure (figure 7). Il faut finalement mentionner la présence d'une bande très réactive située approximativement à 60 kDa. Cette bande de poids moléculaire supérieur à celui de la leptine a été retrouvée de façon constante dans les différents essais.

ELISA

Les dosages de leptine gastrique par la méthode ELISA ont été obtenus en pg/ml puis reconvertis en ng/g de tissu gastrique afin de pouvoir comparer les tissus entre eux de façon plus précise, tenant compte de la masse de tissu utilisé pour la préparation de l'homogénat. Les résultats rapportés dans le tableau 3 (page 81) démontrent que le contenu de leptine est nettement supérieur dans la muqueuse gastrique de rats obèses fa/fa en comparaison avec le rat normal et le rat diabétique. La moyenne des trois rats obèses fa/fa est de 8,93 ng/g de tissu et l'étendue des résultats chez les trois même animaux est de 1,5 ng/g de tissu. La faible étendue des résultats chez les rats obèses fa/fa montre une certaine constance entre les dosages effectués chez les trois animaux.

Figure 3 : Localisation de la leptine dans la muqueuse gastrique de rat normal par immunohistochimie en microscopie optique.

- (a) Coupe longitudinale des glandes tubulaires gastriques démontrant que le marquage est principalement situé dans la moitié inférieure, juste au-dessus de la muscularis mucosae (mm). La lumière gastrique est aussi identifiée (L).
- (b) Coupe transversale des glandes tubulaires gastriques démontrant la localisation apicale du marquage.

Agrandissement : **a** X1250 ; **b** X3000

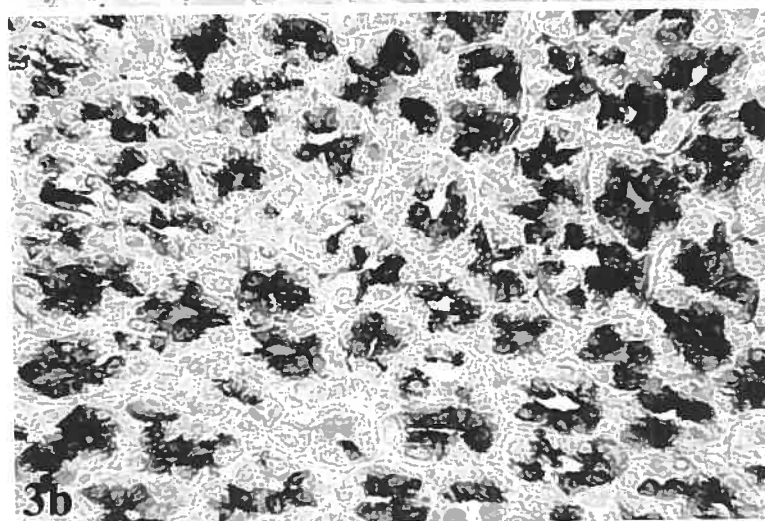
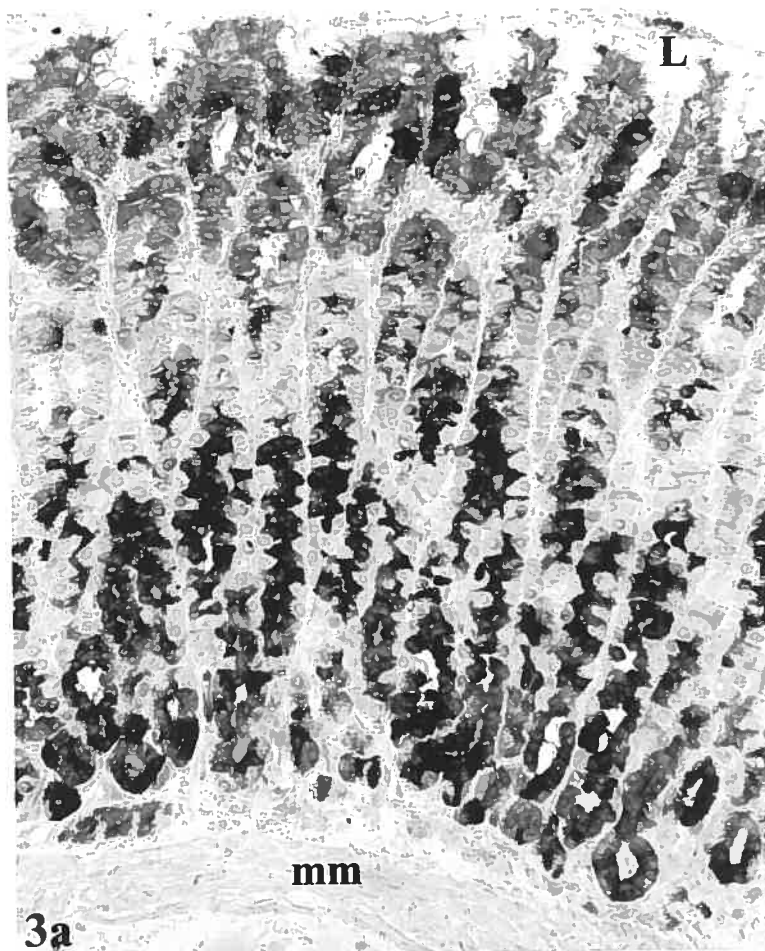


Figure 4 : Immunocytochimie à l'or colloïdal de la leptine dans les cellules principales de l'estomac de rat normal.

- (a) Image d'une cellule principale contenant plusieurs granules de sécrétion (g) ayant une forte densité de particules d'or. Le marquage est aussi présent dans l'appareil de Golgi (G) et dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER). Le marquage est toutefois absent dans la lumière gastrique (L), dans les mitochondries (M) et dans le noyau (N).
- (b) Image démontrant à fort agrandissement le marquage dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER), l'appareil de Golgi (G) et un granule de sécrétion immature (g) d'une cellule principale.
- (c) Image démontrant trois cellules de la muqueuse gastrique. La première cellule à gauche (A) est une cellule pariétale ne montrant pas de marquage, la cellule du centre (B) est une cellule principale montrant une forte densité de particules d'or dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) suggérant un état de synthèse important, la cellule à droite (C) est une autre cellule principale montrant une faible densité de particule d'or dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) suggérant un état de synthèse plus faible.

Agrandissement : a X29 500 ; b X47 500 ; c X35 000

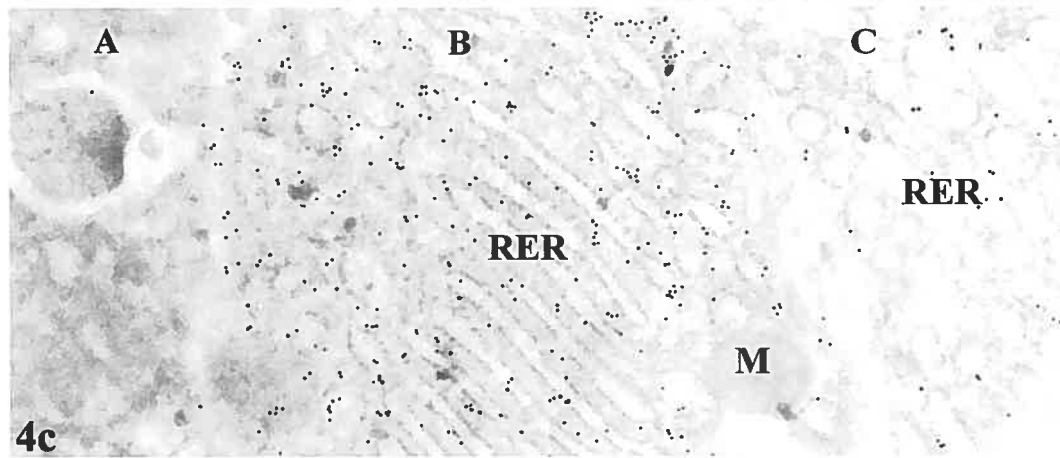
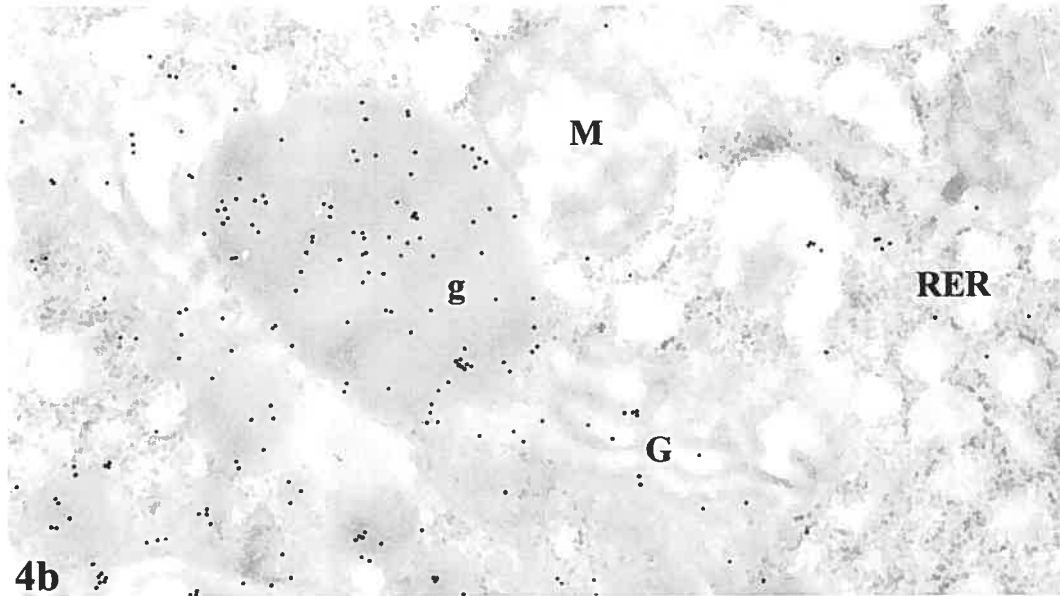
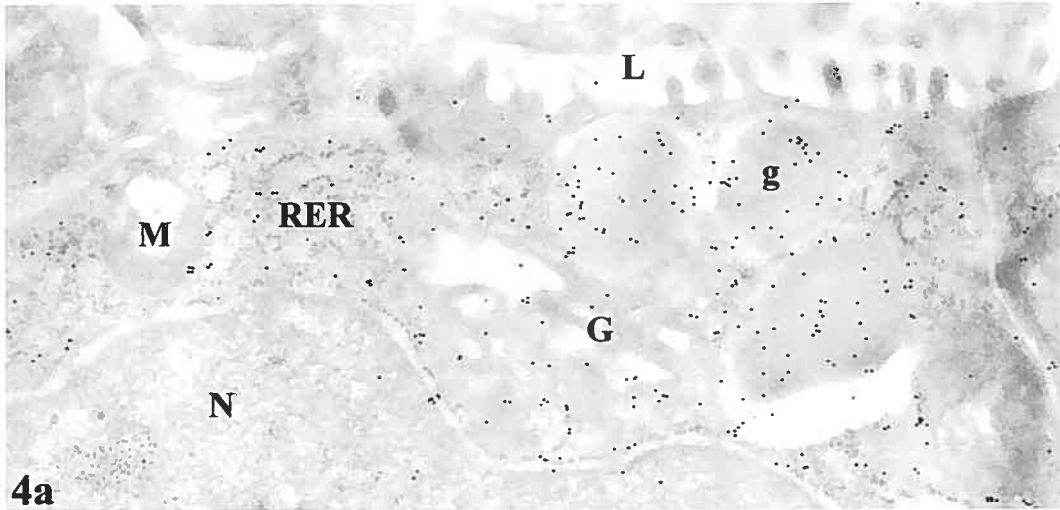


Figure 5 : Localisation du récepteur à la leptine dans la muqueuse gastrique de rat normal par microscopie optique et électronique.

- (a) Coupe longitudinale des glandes tubulaires gastriques démontrant que le marquage est principalement situé dans la moitié inférieure. La muscularis mucosae (mm) et la lumière gastrique (L) sont identifiées sur l'image.
- (b) Le marquage à l'or colloïdal est présent au niveau des granules de sécrétion (g) et pratiquement absent au niveau du noyau (N). Le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et la lumière gastrique (L) sont aussi identifiés sur l'image.

Agrandissement : **a** X1750 ; **b** X14 000

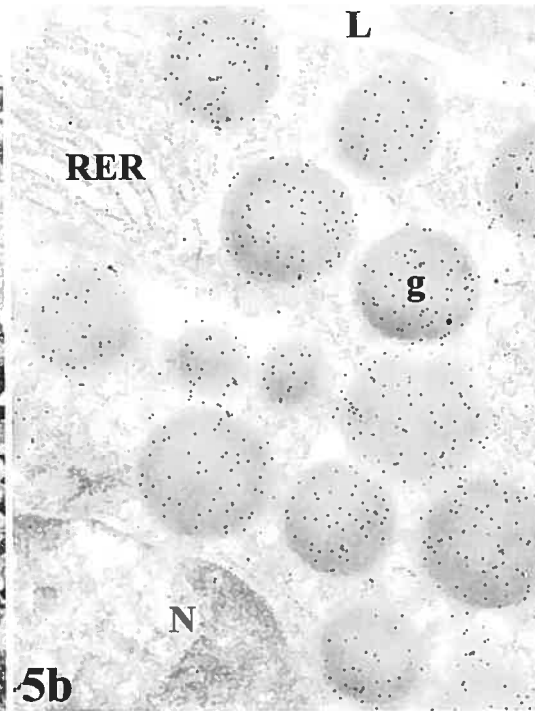


Figure 6 : Immunocytochimie à l'or colloïdal du récepteur à la leptine dans les Entérocytes au niveau duodénal.

- (a) Coupe longitudinale d'un entérocyte démontrant la présence de particules d'or colloïdal au niveau des microvillosités (mv). Le marquage est pratiquement absent de la lumière intestinale (L).
- (b) Coupe transversale au niveau des microvillosités d'un entérocyte démontrant la présence de particules d'or colloïdal associées de la membrane plasmique des microvillosités.

Agrandissement : **a** X21 000 ; **b** X31 000

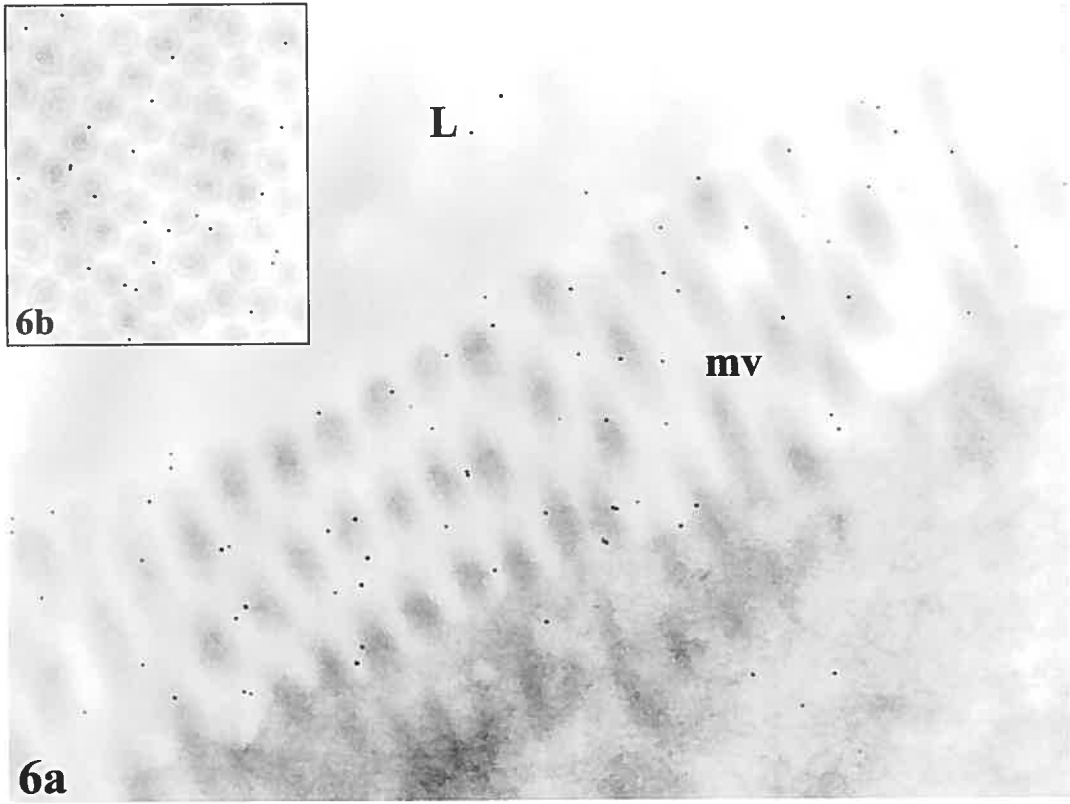


Figure 7: Localisation de la leptine dans la muqueuse gastrique de rat normal **(a)**, de rat diabétique **(b)** et de rat fa/fa **(c)** par immunohistochimie en microscopie optique. Dans les trois conditions (a, b et c) la leptine se trouve dans la moitié inférieure des glandes tubulaires et les densités de marquage sont sensiblement les mêmes. L'image **(d)** représente la muqueuse de rat normal incubée seulement avec du PBS en guise de contrôle négatif.

Agrandissement : **a** X600 ; **b** X600 ; **c** X600 ; **d** X600

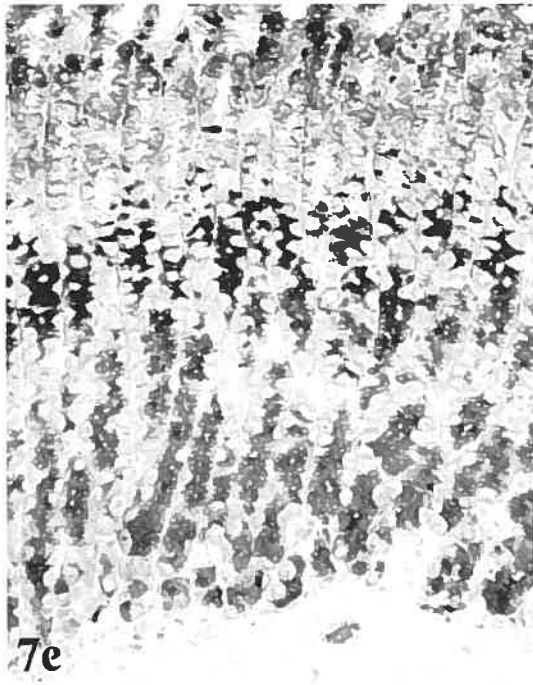


Figure 8 : Western blot de la leptine gastrique dans un échantillon d'estomac complet de rat en parallèle avec un échantillon de leptine recombinante humaine en guise de contrôle.

- (1) Dans l'échantillon de leptine recombinante, on note la présence d'une bande à 16 kDa et d'une deuxième bande à 30 kDa.
- (2) Dans l'échantillon d'estomac de rat, on note la présence de plusieurs bandes dont une à 16 kDa, une à 19 kDa, deux entre 30 et 35 kDa et une à 60 kDa.

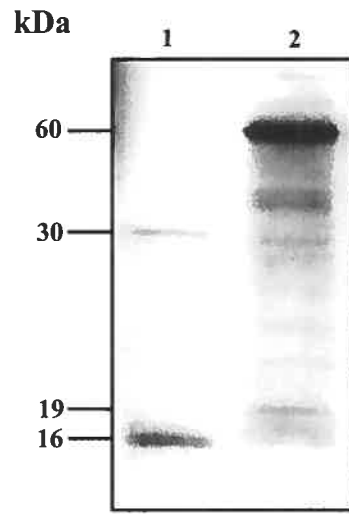


Tableau I

**ÉVALUATION QUANTITATIVE DE LA DENSITÉ DE
MARQUAGE À L'OR COLLOÏDAL POUR LA LEPTINE
GASTRIQUE CHEZ LE RAT NORMAL**

Compartiments cellulaires des cellules principales	Densité de marquage moyenne (particules d'or/ μm^2)	
	Rat Sprague Dawley normal	Contrôle de spécificité
Réticulum endoplasmique	17,21 \pm 3,59	0,38 \pm 0,17
Appareil de Golgi	27,95 \pm 3,36	1,36 \pm 0,41
Granule de sécrétion	69,64 \pm 5,70	2,59 \pm 0,18
Mitochondrie	3,93 \pm 1,42	0,40 \pm 0,28

Tableau II

**ÉVALUATION QUANTITATIVE DE LA DENSITÉ DE
MARQUAGE À L'OR COLLOÏDAL POUR LA LEPTINE
GASTRIQUE CHEZ DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX**

Données	Densité de marquage au niveau des granules de sécrétion des cellules principales (particules d'or /μm^2)		
	Rat Sprague Dawley normal	Rat Sprague Dawley diabétique	Rat Zucker fa/fa
Valeur maximale	99,25	91,95	95,12
Valeur minimale	53,79	56,49	76,18
Étendue des valeurs	45,46	35,46	18,94
Moyenne des valeurs (+/- ESM)	73,83 \pm 3,83	71,85 \pm 3,82 p = 0,25	85,65 \pm 3,85 p \leq 0,05

Tableau III**DOSAGE DE LA LEPTINE GASTRIQUE PAR LA MÉTHODE
ELISA CHEZ DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX**

	Rat normal	Rat diabétique	Rat fa/fa#1	Rat fa/fa#2	Rat fa/fa#3
Dosage de leptine gastrique (ng/g de tissu)	5,04	5,70	8,00	9,50	9,30

DISCUSSION

Depuis 1998, nous savons que l'estomac de rat sécrète de la leptine (Bado et al, 1998). Plusieurs équipes ont par la suite confirmé l'existence de cette hormone au niveau de l'estomac chez l'humain en microscopie optique (Breidert et al, 1999; Sobhani et al, 2000; Mix et al, 2000) et électronique (Cinti et al, 2000). Certaines de ces équipes ont tenté d'établir le rôle de cette leptine gastrique. Rapidement, on a recherché un rôle relié à la satiété (Bado et al, 1998). Plusieurs équipes ont alors travaillé sur les interactions entre la leptine et la cholecystokinine. Ce n'est que par la suite qu'on s'intéressa à l'intestin et au rôle que pouvait jouer la leptine dans l'absorption intestinale. Toutefois, les premières études sur l'intestin ont été réalisées en injectant la leptine par la voie intra-péritonéale. Initialement, il était difficile d'admettre qu'une hormone peut être sécrétée de façon exocrine dans la lumière gastrique. Peu à peu, les preuves se sont accumulées. On démontra la présence de leptine dans les granules de sécrétion des cellules principales, puis on prouva que la leptine est présente dans le jus gastrique et qu'elle n'est pas dégradée par l'acidité de l'estomac. On savait grâce aux analyses biochimiques que le récepteur de forme longue est présent au niveau de l'intestin, mais on ignorait sa localisation jusqu'à ce que sa présence soit démontrée au niveau de la bordure en brosse et au niveau de la membrane basolatérale par microscopie optique et par la suite par microscopie électronique. Ces dernières observations nous ont convaincus hors de tout doute de l'existence d'un axe gastro-entérique impliquant la leptine, une protéine de signalisation endocrine bien connue depuis 1995, comme signal exocrine.

Sécrétion de la leptine gastrique chez le rat normal

Nous avons démontré par microscopie électronique la présence de leptine dans le réticulum endoplasmique, dans l'appareil de Golgi et dans les granules de sécrétion, les mêmes qui contiennent le pepsinogène. Une étude par double marquage utilisant des particules d'or de deux diamètres différents et exécutée selon la méthode de Bendayan (Bendayan, 1995) fut réalisée dans notre laboratoire avec des résultats qui viennent confirmer ceux déjà obtenus par microscopie optique démontrant une correspondance entre les cellules principales sécrétant la leptine et le pepsinogène (Bendayan et al, 2004; Mix et al, 2000). La présence de particules d'or dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi suggère l'existence d'une activité de synthèse. De plus, nous pouvons nous appuyer sur les évaluations quantitatives faites par immunocytochimie pour affirmer que la leptine subit un processus de concentration du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. En effet, nous avons noté une augmentation de la densité de marquage entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Nous croyons aussi que la leptine subit un processus de maturation. Nous avons effectivement confirmé la présence d'une protéine de 19 kDa dans la paroi gastrique qui pourrait correspondre à une forme de proleptine, tel que suggéré par d'autres équipes (Bado et al, 1998). Venant toujours appuyer cette même hypothèse, nous avons observé une augmentation de la densité dans les granules de sécrétion par rapport à l'appareil de Golgi. Cette augmentation de la densité pourrait s'expliquer en parti par une concentration de la protéine tel que mentionné précédemment, mais aussi par une reconnaissance plus spécifique à la protéine mature. L'anticorps primaire anti-leptine fut

développé à partir de la protéine mature, il est donc possible que le marquage plus dense au sein des granules de sécrétion s'explique par une meilleure reconnaissance de l'antigène suite au processus de maturation. Toujours à partir de nos évaluations quantitatives, nous avons identifié deux densités de marquage différentes dans le réticulum endoplasmique dépendamment des cellules. Nous croyons qu'il pourrait s'agir de deux états cellulaires différents que nous pourrions identifier comme un état de synthèse et un état de repos (figure 4c).

Nous avons donc décrit tout un processus de sécrétion régulée au niveau de la cellule principale de l'estomac, par lequel la cellule est capable d'accumuler la leptine à l'intérieur de granule de sécrétion et de la relâcher lorsque les stimuli adéquats sont présents. Certaines équipes ont déjà décrit l'alimentation, la cholecystokinine, la sécrétine et la gastrine parmi ces stimuli. La sécrétion de la leptine a été décrite auparavant dans d'autres types de cellules. Curieusement, les mécanismes de sécrétion de la leptine différent dépendamment du type de cellule qui la sécrète.

Effectivement, la sécrétion de la leptine par les cellules adipocytaires a déjà été étudiée par microscopie électronique (Bornstein et al, 2000). Contrairement à ce que nous avons démontré dans la cellule principale de l'estomac, la leptine ne semble pas subir les processus décrits de concentration et maturation dans les adipocytes. Les particules d'or ont été retrouvées principalement dans le mince anneau de cytoplasme qui entoure le noyau de l'adipocyte, fixées aux membranes plasmiques. Aucun granule de sécrétion n'a été observé, mais de petites vésicules de grosseur uniforme (40-80 nm

de diamètre) contenant quelques particules d'or ont été identifiées aussi accolées à la membrane plasmique des adipocytes. Ces observations sont conformes avec ce qui avait été décrit concernant le fait que la leptine était synthétisée et rapidement sécrétée (McGregor et al, 1996). Ce type de sécrétion est décrit comme étant constitutive. Toutefois, une autre équipe a démontré que l'insuline pouvait stimuler la sécrétion de leptine en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique dans les adipocytes de rat isolés (Bradley et al, 1999). Cette observation suggère la présence d'un pool intracellulaire de leptine dans les adipocytes pouvant être relâché suite à la stimulation induite par l'insuline. Les petites vésicules décrites par Bornstein pourraient jouer ce rôle de pooling intracellulaire.

Il est aussi intéressant de mentionner que la sécrétion régulée de la leptine avait déjà été décrite dans d'autres types de cellules. Effectivement, une étude morphologique exécutée par microscopie électronique sur la glande adénohypophysaire a démontré la présence de leptine dans plusieurs cellules endocrines (Vidal et al, 2000). La leptine est présente à l'intérieur de granules de sécrétion tout comme les autres hormones qui sont produites au niveau de l'adénohypophyse. Cependant, la leptine n'est pas présente dans tous les granules, elle se retrouve dans 5 à 25% de ces derniers laissant imaginer l'existence de stimuli pouvant réguler de façon spécifique l'exocytose des différents granules.

Sécrétion de la leptine liée à son récepteur

Dans le sang, la leptine circule sous forme libre et sous forme liée à des protéines, dont la forme soluble du récepteur à la leptine (Shina et al, 1996; Bornstein et al, 2000; Lalhoul et al, 2000). Cette forme soluble du récepteur ne possède pas le domaine transmembranaire hydrophobe et par conséquent peut circuler sous forme libre ou liée à la leptine (Houseknecht et al, 1996; Liu et al 1997). La leptine liée au récepteur pourrait être un marqueur de la dépense énergétique au repos alors que la leptine libre représenterait les réserves corporelles de graisse (Brabant et al, 2000; Ockenga et al, 2000; Brabant et al, 2000). Il existe d'autres cytokines, dont Il-6, pour lesquelles une fonction différente a été observée pour la forme circulante liée au récepteur et pour la forme libre (Maione et al, 1998). Puisqu'il était établi que les adipocytes expriment non seulement la leptine mais aussi son récepteur (Masuzaki et al, 1995; Muller et al, 1997; Ranganathan et al, 1998; Couillard et al, 2000; Bornstein et al, 2000) l'équipe de Brabant a démontré par immunohistochimie la sécrétion par les adipocytes de la leptine directement dans sa forme liée. Ils ont donc utilisé des anticorps spécifiques contre la forme libre de leptine et d'autres contre la forme liée au récepteur. La leptine est présente dans les adipocytes sous sa forme libre mais aussi sous sa forme liée au récepteur suggérant une sécrétion directe de la forme liée en plus de la possibilité d'une liaison extra-cellulaire entre la leptine et son récepteur soluble (Brabant et al, 2002).

Ainsi se pose la question suivante, est-ce que la leptine pourrait aussi être sécrétée sous la forme liée au récepteur dans les cellules principales de l'estomac. La sécrétion exocrine de leptine sous sa forme liée pourrait permettre une meilleure résistance aux conditions gastriques ou encore modifier la conformation de la protéine et permettre de résister aux protéases pancréatiques. De plus, le changement de conformation de la protéine peut permettre la liaison à d'autres récepteurs et altérer l'effet que la protéine peut avoir sur l'entérocyte ou encore modifier sa propre absorption si celle-ci est médiée par un récepteur. Nous avons deux évidences qui peuvent nous orienter en direction d'une sécrétion de la leptine sous forme liée. Le marquage du récepteur à la leptine au niveau de la muqueuse gastrique a démontré la présence du récepteur dans le réticulum endoplasmique, dans l'appareil de Golgi et dans les granules de sécrétion des cellules principales, les mêmes cellules qui sécrètent la leptine. Ainsi, il est probable que la leptine soit déjà liée à son récepteur à l'intérieur même des granules, avant d'être sécrétée dans la lumière gastrique. Or, l'anticorps anti-ObR que nous avons utilisé était dirigé contre le segment intracellulaire du récepteur Ob-Rb, le récepteur de forme longue. Il s'agit donc d'un anticorps qui ne marque pas les autres récepteurs de forme courte ni le récepteur soluble. Il est donc difficile de comprendre pourquoi la leptine serait liée à l'intérieur des granules de sécrétion à son récepteur de forme longue, le seul à activer la voie de signalisation intra-cellulaire. Afin de confirmer ce résultat, il faudrait exécuter des contrôles de spécificité. Ainsi nous pourrions confirmer si la protéine marquée par l'anticorps est réellement le récepteur forme longue ou une autre protéine qui possède les mêmes épitopes. Pour effectuer ces contrôles, il faudrait utiliser un autre anticorps anti-ObR qui soit dirigé contre d'autres

épitopes pour observer si le marquage est le même. La deuxième évidence compatible avec la sécrétion de la leptine liée à une protéine est le résultat obtenu par le western blot. Effectivement, nous avons retrouvé la présence de faibles bandes à 16 kDa et à 19 kDa compatibles avec la présence de leptine et de sa proprotéine, mais nous avons aussi retrouvé d'autres bandes dont une très intense autour de 60 kDa. Ce poids moléculaire est trop petit pour représenter la leptine liée à son récepteur, mais il peut s'agir de la leptine liée à une autre protéine ou à une partie du récepteur. Nous n'écartons pas la possibilité qu'il s'agisse d'une polymérisation de la leptine ou encore d'un marquage non spécifique pour une autre protéine. Il faudrait exécuter un western blot afin de détecter la présence du récepteur dans le jus gastrique ou encore exécuter une fragmentation cellulaire afin d'isoler les granules de sécrétion et en extraire le récepteur par western blot. Il serait aussi intéressant de comparer ces résultats avec ceux d'une fragmentation cellulaire isolant les membranes plasmiques.

Étude du récepteur à la leptine dans l'intestin de rat

Tel que mentionné précédemment, nous avons démontré pour la première fois la présence des récepteurs à la leptine au niveau des microvillosités intestinales par microscopie électronique. Cette technique nous permet d'identifier avec précision la localisation membranaire du récepteur. D'ailleurs, cette observation appuie fortement l'existence d'un axe gastro-entérique par l'entremise duquel la leptine exocrine pourrait exercer un rôle direct sur la muqueuse intestinale (figure 9). Nous avons aussi observé la

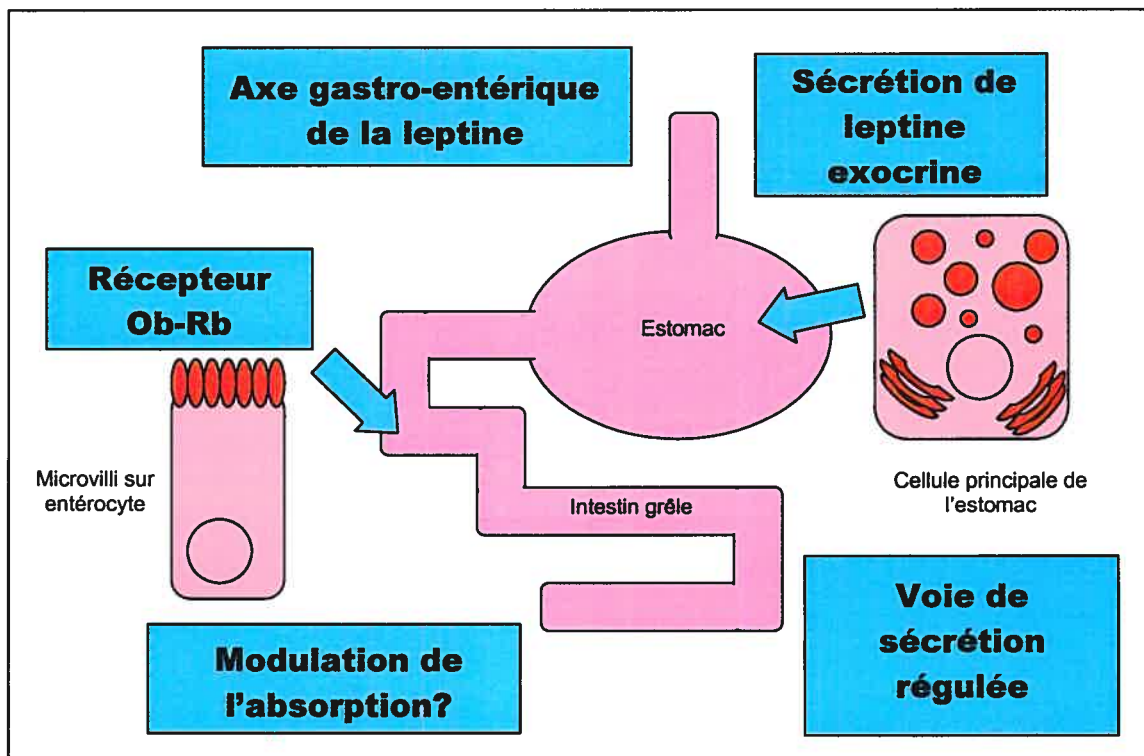


Figure 9 : Axe gastro-entérique de la leptine. La leptine est sécrétée par une voie régulée au niveau des cellules principales de l'estomac. Elle se fixe ensuite à son récepteur au niveau des entérocytes pour agir sur différentes fonctions dont probablement l'absorption des nutriments.

présence du récepteur dans les différents segments du petit intestin chez le rat normal soit le jéjunum et l'iléon. Nous n'avons pas effectué d'évaluation quantitative mais il semble y avoir très peu de différence entre le duodénum et le jéjunum, cependant l'iléon présente un marquage légèrement moins dense. Une densité de marquage pour le récepteur à la leptine plus élevée au niveau du duodénum et du jéjunum contrairement à l'iléon est compatible avec un rôle dans l'absorption des nutriments. La présence du récepteur de forme longue suggère fortement l'activation d'une voie de signalisation au niveau des entérocytes afin d'influencer l'expression de certaines protéines qui pourraient être impliquées entre autre dans l'absorption des nutriments tel que SGLT1

pour l'absorption du glucose. Le récepteur de forme courte a aussi été retrouvé dans la muqueuse intestinale. Il pourrait jouer un rôle de compétition afin de réguler l'action de la leptine au niveau des récepteurs capables d'activer la voie de signalisation. Il pourrait aussi être impliqué dans l'absorption intestinale de la leptine, puisqu'une équipe a déjà démontré que la leptine pouvait être absorbée au niveau intestinal (Casabiell et al, 1997). Nous avons tenté de voir si le nombre de récepteurs à la leptine variait chez le rat diabétique et le rat fa/fa. Aucune modification n'a été observée chez le rat diabétique et chez le rat fa/fa. Ainsi, malgré la présence d'une mutation dans le gène du récepteur chez le rat fa/fa, il y a présence de la protéine dans la membrane plasmique. Ceci est compatible avec une mutation créant une anomalie de fonctionnement plutôt qu'une protéine tronquée ou absente.

Étude de la leptine gastrique chez le rat diabétique et le rat fa/fa

Nous croyions que dans les états pathologiques, tel que le diabète et l'obésité, le rôle joué par la leptine exocrine pourrait être fortement débalancé tout comme le rôle joué par la leptine endocrine. Connaissant l'implication de l'insuline dans la stimulation de la sécrétion de leptine endocrine et l'état d'hypoleptinémie rencontré chez le modèle diabétique insulino-dépendant, nous voulions voir si la leptine exocrine était aussi diminuée. Est-ce que l'insuline joue un rôle dans la synthèse de leptine gastrique exocrine? Si la leptine diminue réellement l'absorption des glucides et qu'elle est diminuée chez les diabétiques, il en résulterait une augmentation de l'absorption des glucides contribuant à l'hyperglycémie. D'ailleurs, il est connu que l'absorption des

glucides et des lipides est augmentée chez les rats diabétiques et que des injections d'insuline ou une transplantation d'îlots de Langerhans peuvent rétablir l'absorption à la normale (Thomson et Wild, 1997). Cette augmentation de l'absorption du glucose est causée entre autre par une hypertrophie des villosités intestinales au niveau du grêle proximal (Schedl et al, 1971), mais surtout par une augmentation du flux de glucose sur une base cellulaire pouvant expliquer 50 à 70% de l'augmentation d'absorption de glucose (Fedorak et al, 1987; Debnam et al, 1990). D'autres études ont expliqué cette augmentation de flux de glucose par une augmentation du transporteur SGLT1 au niveau de la bordure en brosse et de GLUT2 au niveau de la membrane baso-latérale (Burant et al, 1994). Toutefois, le mécanisme stimulant la synthèse de ses transporteurs n'est pas encore bien connu, mais ce qui est véhiculé pour l'instant c'est qu'il s'agit probablement d'un mécanisme d'adaptation en réponse à une perception erronée de déprivation tissulaire en glucose. Une équipe a démontré qu'il est possible de modifier l'absorption de glucose rapidement par l'entremise d'une diminution de SGLT1 au niveau de la bordure en brosse en administrant de la cholecystokinine (Hirsh & Cheeseman, 1998). Nous croyons aussi qu'une diminution de leptine endocrine mais aussi de leptine exocrine pourrait jouer un rôle dans l'hyperphagie rencontrée chez les rats diabétiques puisqu'il a été démontré que la leptine pouvait aussi agir sur la régulation de la satiété à court terme par l'entremise du nerf vague. Pour toutes ces raisons, il était important pour nous de voir le rôle que pourrait jouer la leptine gastrique exocrine chez le rat diabétique.

Nous avons aussi observé la leptine gastrique chez les rats fa/fa. Effectivement, une augmentation de leptine gastrique chez les rats fa/fa pourrait refléter la présence d'un effet autocrine sur les cellules principales. En diminuant le signal de la leptine par l'entremise d'un récepteur non fonctionnel, nous pourrions noter une augmentation de la production de leptine. Ainsi, toutes ses observations ont pour but de mieux comprendre le mécanisme et la régulation de la sécrétion de leptine gastrique ainsi que d'observer des pistes pouvant nous permettre de mieux comprendre le rôle que peut jouer cette protéine au niveau gastrique.

Nos résultats ont démontré que la quantité de leptine gastrique est pratiquement inchangée chez le rat diabétique et possiblement augmentée chez le rat obèse fa/fa. Certainement, nos études biochimiques ainsi que nos observations réalisées par microscopie optique et électronique auraient nécessité un plus grand nombre d'animaux. Cette affirmation repose principalement sur la grande variabilité des résultats obtenus lors de l'évaluation quantitative qui démontre des étendues de valeurs très grandes pour les densités de marquage entre les différents spécimens d'un même groupe. Toutefois, peu importe le nombre d'animaux observés, les résultats que nous avons obtenus démontrent qu'il n'y a pas de différence marquée entre les contenus de leptine dans différents modèles pathologiques. Nous croyions que la leptine gastrique serait diminuée chez le rat diabétique pour les raisons exposées précédemment, mais nous n'avons pas réussi à démontrer de différence significative. Il faut donc supposer pour l'instant que les atteintes décrites au niveau de l'absorption des nutriments ne sont pas liées à une diminution de leptine gastrique chez le rat diabétique. Toutefois, la

diminution de leptine plasmatique a très bien été décrite et peut continuer d'expliquer en parti ces altérations métaboliques par son effet endocrine. D'autres études devront être réalisées afin de mieux établir le rôle de la leptine exocrine dans l'absorption des nutriments, particulièrement les glucides et les lipides.

Les rats fa/fa ont démontré tel qu'attendu une légère augmentation de la leptine au niveau gastrique. Les résultats obtenus lors du dosage de leptine gastrique par méthode ELISA viennent confirmer les résultats observés en microscopie électronique. Nous croyons donc qu'il existe bel et bien une augmentation de leptine gastrique chez le rat fa/fa obèse mettant en évidence un mécanisme d'autorégulation au niveau des cellules principales de l'estomac. Est-ce que l'augmentation de leptine dans la muqueuse gastrique peut jouer un rôle dans le phénotype du rat fa/fa? Possiblement, mais il est difficile d'évaluer l'impact d'une augmentation de leptine gastrique puisque les récepteurs à la leptine sont considérés comme non fonctionnels. Ainsi, le phénotype de l'animal ressemble davantage à un état de déficience en leptine tant au niveau plasmatique que digestif. De plus, en considérant les rôles possiblement joués par la leptine au niveau de l'absorption des nutriments, le rat fa/fa démontre effectivement un état d'absorption compatible avec une baisse de leptine. Il existe chez le rat fa/fa, tout comme chez le rat diabétique induit par la streptozotocine, une hyperlipidémie postprandiale (Fujinami et al, 2001). Cet état chez le rat fa/fa pourrait s'expliquer en partie par la présence de récepteurs non fonctionnels à la leptine entraînant une augmentation de l'absorption des lipides. Une autre équipe a démontré que le rat fa/fa a un Vmax augmenté pour l'absorption du glucose au niveau des entérocytes, mais que

l'absorption *in vivo* est diminuée (Garcia-Martinez et al, 1993). Le V_{max} augmenté pourrait peut-être s'expliquer par la baisse de leptine qui entraîne une augmentation du nombre de SGLT1 au niveau de la bordure en brosse. Toutefois, l'absorption *in vivo* diminuée ne correspond pas à l'action décrite de la leptine et devrait s'expliquer par un autre mécanisme. Encore un fois, le rôle de la leptine exocrine en comparaison avec la leptine endocrine est difficilement identifiable puisque chez le rat *fa/fa* le récepteur est non fonctionnel. Il est néanmoins possible de mentionner que la leptine gastrique, sécrétée de façon exocrine, exerce bel et bien une action autocrine sur les cellules principales compte tenu de son augmentation dans la muqueuse gastrique de rat *fa/fa*.

Il faut tenir compte que toutes nos observations morphologiques et biochimiques ont été réalisées chez des animaux nourris *ad libitum*. Quelques études ont noté des variations du taux de leptine gastrique dans différents états nutritionnels. Il est difficile de savoir quel état nutritionnel est le meilleur afin de comparer les animaux entre eux. Nous avons l'impression que l'état de jeûne peut procurer un meilleur contrôle des éléments externes, or les taux de leptine gastriques sont diminuées après 14 heures de jeûne rendant la comparaison plus difficile. Nous avons donc choisi l'alimentation *ad libitum* puisqu'elle procure les taux de leptine les plus élevés dans l'estomac et à notre avis les plus physiologiques. Une autre source d'erreur importante à considérer est l'espèce des rats utilisés. Effectivement, nous avons comparé nos deux modèles pathologiques à des rats contrôles Sprague Dawley. Ce contrôle est tout approprié pour nos rats diabétiques, mais peut être source d'erreur pour la comparaison avec les rats Zucker *fa/fa*. Les autres équipes qui ont comparé la leptine gastrique du rat obèse *fa/fa*

ont utilisé comme contrôle des rats Zucker maigres de génotype +/? (Pico et al, 2002). Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus sont compatibles avec ce qui était déjà suggéré par les travaux précédents.

CONCLUSION

Démystifier l'obésité, le diabète de type 2 et l'homéostasie de la balance énergétique constitue l'un des plus grands défis du XXI^e siècle. Face à la croissance effrénée de la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2, nous devons investir tous nos efforts dans la compréhension de ce terrible fléau. La découverte de la leptine en 1995 fut sans aucun doute un premier pas vers la bonne direction. Depuis ce temps, nous ne cessons d'étudier cette hormone qui nous révèle peu à peu ses nombreux secrets.

Nous avons élucidé le processus de sécrétion de la leptine au niveau de la muqueuse gastrique afin de mieux comprendre le rôle physiologique qu'elle peut jouer ainsi que son implication dans la pathophysiologie de l'obésité et du diabète de type 2. La leptine est présente dans les cellules principales de l'estomac et ce tout au long de la voie de sécrétion. Elle est accumulée dans des granules de sécrétion avec le pepsinogène et sécrétée de façon régulée par différents stimuli. Il est possible aussi que la leptine soit sécrétée sous sa forme liée au récepteur puisque nous avons démontré que les granules de sécrétions contiennent aussi le récepteur.

Il ne fait plus de doute maintenant que la leptine sécrétée de façon exocrine exerce différentes fonctions au niveau de l'intestin. Nous avons d'ailleurs démontré la situation membranaire de ces récepteurs au niveau des microvillosités intestinales par microscopie électronique.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre le contenu en leptine de l'estomac de rats normaux et celui de rats diabétiques. Toutefois, nos résultats

suggèrent une légère augmentation de leptine gastrique chez les rats obèses fa/fa allant en faveur avec existence d'un processus d'autorégulation via probablement la voie autocrine.

Il reste encore plusieurs éléments à découvrir afin de bien définir l'axe gastro-intestinal de la leptine exocrine. Les prochaines années nous dirons probablement si la leptine se lie à une protéine de plus haut poids moléculaire dans l'estomac, de quelle façon elle est absorbée au niveau des entérocytes et quel rôle exact elle peut jouer tant au niveau de l'absorption que de la régulation de l'appétit.

RÉFÉRENCES

- Ahima, R. S., Dushay, J., Flier, S. N., Prabakaran, D., & Flier, J. S.** (1997). Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest*, *99*, 391–395.
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., & Flier, J. S.** (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding: implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest*, *101*, 1020–1027.
- Ashworth, C. J., Hoggard, N., Thomas, L., Mercer, J. G., Wallace, J. M., & Lea, R. G.** (2000). Placental leptin. *Rev Reprod*, *5*, 18-24.
- Azuma, T., Suto, H., Ito, Y., Ohtani, M., Dojo, M., Kuriyama, M., et al.** (2001). Gastric leptin and *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, *49*, 324-329.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermogant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, et al.** (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature*, *394*, 790-793.
- Bagdade, J. D., Bierman, E. L., & Porte, D. Jr.** (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest*, *46*, 1549-1557.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Huang, W., Jaspan, J. B., & Maness, L. M.** (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, *17*, 305-311.
- Baratta, M.** (2002). Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit*, *8*, 282-292.
- Barr, V. A., Lane, K., & Taylor, S. I.** (1999). Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem*, *274*, 21416-21424.
- Barrenetxe, J., Sainz, N., Barber, A., & Lostao, M. P.** (2004). Involvement of PKC and PKA in the inhibitory effect of leptin on intestinal galactose absorption. *Biochem Biophys Res Commun*, *317*, 717-721.
- Barrenetxe, J., Villaro, A. C., Guembe, L., Pascual, I., Munoz-Navas, M., Barber, A., et al.** (2002). Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane and cytoplasm of enterocytes. *Gut*, *50*, 797-802.
- Barsh, G. S., Farooqi, I. S., & O'Rahilly, S.** (2000) Genetics of body-weight regulation. *Nature*, *404*, 644-651.
- Baskin, D. G., Breininger, J. F., & Schwartz, M. W.** (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*, *48*, 828–833.

Baskin, D. G., Wilcox, B. J., Figlewicz, D. P., & Dorsa, D. M. (1988). Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci*, *11*, 107-111.

Baura, G. D., Foster, D. M., Porte, D. Jr, Kahn, S. E., Bergman, R. N., Cobelli, C., et al. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo: a mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest*, *92*, 1824-1830.

Bendayan, M. (1995). Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem*, *29*(4), 1-163.

Bendayan, M., Renaud, C., Gingras, D., Delvin E., & Levy, E. (2004). A gastro-enteric axis for the exocrine secretion of gastric leptin. *Obesity*, *12*, A178.

Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., & Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, *7*, 947-953.

Billington, C. J., Briggs, J. E., Grace, M., & Levine, A. S. (1991). Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol*, *260*, 321-327.

Birmingham, C. L., Muller, J. L., Palepu, A., Spinelli, J. J., & Anis, A. H. (1999). The cost of obesity in Canada. *CMAJ*, *160*, 483-488.

Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Michl, P., Ahima, R. S., van Bueren, A., McCall, A. L., et al. (1998). Expression of leptin receptor isoforms in brain microvessels. *Endocrinology*, *139*, 3485-3491.

Bjorbaek, C., Uotani, S., Da Silva, B., & Flier, J. S. (1997). Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, *272*, 32686-32695.

Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M., & Ryan, I. (1996). Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, *81*, 3419-3423.

Bornstein, S. R., Abu-Asab, M., Glasow, A., Path, G., Hauner, H., Tsokos, M., et al. (2000). Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes*, *49*, 532-538.

Bornstein, S. R., Uhlmann, K., Haidan, A., Ehrhart-Bornstein, M., & Scherbaum, W. A. (1997). Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: Leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes*, *46*, 235-238.

Brabant G., Schmidt, M., Ockenga, J., Horn, R., von zur Muhlen, A., Schafer, J., et al. (2000a). Patients with lamin mutations in familial partial lipodystrophy have low free but high bound leptin. *Diabetologia*, 43,(Suppl 1), A174.

Brabant, G., Horn, R., von zur Muhlen, A., Mayr, B., Wurster, U., Heidenreich, F., et al. (2000b). Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia*, 43, 438–442.

Brabant, G., Nave, H., Mayr, B., Behrend, M., VanHarmelen, V., & Arner, P. (2002). Secretion of free and protein-bound leptin from subcutaneous adipose tissue of lean and obese women. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 3966-3970.

Bradley, R. I., & Cheatham, B. (1999). Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes*, 48, 272-278.

Bray, G. A., Fisler, J., & York, D. A. (1990). Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front Neuroendocrinol*, 11, 128-181.

Breidert, M., Miehke, S., Glasow, A., Orban, Z., Stolte, M., Ehninger, G., et al. (1999). Leptin and its receptor in normal human gastric mucosa and in helicobacter pylori-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol*, 10, 954-961.

Briscoe, C. P., Hanif, S., Arch, J. R., & Tadayyon, M. (2001). Leptin receptor long-form signalling in a human liver cell line. *Cytokine*, 14, 225-229.

Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., & Hokfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 15043-15048.

Brzozowski, T., Konturek, P. C., Konturek, S. J., Pajdo, R., Duda, A., Pierzchalski, P., et al. (1999). Leptin in gastro-protection induced by cholecystokinin or by a meal. Role of vagal and sensory nerves and nitric oxide. *Eur J Pharmacol*, 374, 263-276.

Burant, C. F., Flink, S., De Paoli, A. M., Chen, J., Lee, W. S., Hediger, M. A., et al. (1994). Small intestine hexose transport in experimental diabetes. *J Clin Invest*, 93, 578-585.

Burdyga, G., Spiller, D., Morris, R., Lal, S., Thompson, D. G., Saeed, S., et al. (2002). Expression of the leptin receptor in rat and human nodose ganglion neurons. *Neuroscience*, 109, 339-347.

Buyse, M., Aparicio, T., Guilmeau, S., Goïot, H., Sobhani, I., & Bado, A. (2004). Effets paracrines de la leptine produite par l'estomac. *Médecine/Sciences*, 20, 183-188.

- Buyse, M., Berlioz, F., Guilmeau, S., Tsocas, A., Voisin, T., Péranski, G., et al.** (2001a). PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest*, *108*, 1483-1494.
- Buyse, M., Ovesjo, M. L., Goiot, H., Guilmeau, S., Peranzi, G., Moizo, L., et al.** (2001b). Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *Eur J Neurosci*, *14*, 64-72.
- Buyse, M., Sitaraman, S. V., Liu, X., Bado, A., & Merlin, D.** (2002). Luminal leptin enhances CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE. *J Biol Chem*, *277*, 28182-28190.
- Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, J., Devos, R., & Burn, P.** (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, *269*, 546-549.
- Casabiell, X., Pineiro, V., Tome, M. A., Peino, R., Dieguez, C., & Casanueva, F. F.** (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab*, *82*, 4270-4273.
- Chagnon, Y. C., & Bouchard, C.** (1996). Genetics of obesity : advances from rodent studies. *Trends Genet*, *12*, 441-444.
- Chehab, F. F., Lim, M., & Lu, R.** (1996). Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*, *12*, 318-320.
- Chehab, F. F., Mounzih, K., Lu, R., & Lim, M. E.** (1997). Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*, *275*, 88-90.
- Chen, D., & Garg, A.** (1999). Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. *J Lipid Res*, *40*, 1735-1743.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., et al.** (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, *84*, 491-495.
- Cheung, C., Clifton, D., & Steiner, R.** (1997). Proopimelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, *138*, 4489-4492.
- Chinookoswong, N., Wang, J. L., & Shi, Z. Q.** (1999). Leptin restores euglycemia and normalizes glucose turnover in insulin-deficient diabetes in the rat. *Diabetes*, *48*, 1-6.

Chua, S. C., Chung, W. K., & Wu-Peng, X. S. (1996a). Phenotypes of mouse *diabetes* and rat *fatty* due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, *271*, 994–996.

Chua, S. C., White, D. W., Wu-Peng, X. S., Liu, S. M., Okada, N., Kershaw, E. E., et al. (1996b). Phenotype of *fatty* due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes*, *45*, 1141-1143.

Cinti, S., De Matteis, R., Picó, C., Ceresi, E., Obrador, A., Maffei, C., et al. (2000). Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach contain leptin. *International Journal of Obesity*, *24*, 789-793.

Cioffi, J. A., Shafer, A. W., Zupancic, T. J., Smith-Gbur, J., Mikhail, A., Platika, D., et al. (1996). Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med*, *2*, 585-589.

Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabroll, S., Pelloux, V., Cassuto, D., et al. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, *392*, 398–401.

Coleman, D. L. (1973). Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, *9*, 294–298.

Coleman, D. L., & Hummel, K. P. (1969). Parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol*, *217*, 1298–1304.

Cone, R.D., Lu, D., Koppula, S., Vage, D. I., Klungland, H., Boston, B., et al. (1996). The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Rec Prog Horm Res*, *51*, 287-318.

Considine, R. V. (2001). Regulation of leptin production. *Rev Endocr Metab Disord*, *2*, 357-63.

Considine, R. V., & Caro, J. F. (1997). Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol*, *29*, 1255-1272.

Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New Eng J Med*, *334*, 292-295.

Couillard, C., Mauriege, P., Imbeault, P., Prud'homme, D., Nadeau, A., Tremblay, A., et al. (2000). Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *24*, 782–788.

Crouse, J. A., Elliott, G. E., Burgess, T. L., Chiu, L., Bennett, L., Moore, J., et al.

- (1998). Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation. *J Biol Chem*, 273, 18365-18373.
- Da Silva, B. A., Bjorbaek, C., Uotani, S., & Flier, J. S.** (1998). Functional properties of leptin receptor isoforms containing the gln-pro extracellular domain mutation of the fatty rat. *Endocrinology*, 139, 3681-3690.
- De Graaf, C., Blom, W. A., Smeets, P. A., Stafleu, A., & Hendriks, H. F.** (2004). Biomarkers of satiation and satiety. *Am J Clin Nutr*, 79, 946-961.
- De Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P.E., et al.** (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 322-327.
- De Vos, P., Saladin, R., Auwerx, J., & Staels, B.** (1995). Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*, 270, 15958-15961.
- Debnam, E. S., Ebrahim, H. Y., & Swaine, D. J.** (1990). Diabetes mellitus and sugar transport across the brush-border and basolateral membranes of the rat jejunal enterocytes. *J physiol (Lond)*, 424, 13-25.
- Doi, T., Liu, M., Seeley, R. J., Woods, S. C., & Tso, P.** (2001). Effect of leptin on intestinal apolipoprotein AIV in response to lipid feeding. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 281, 753-759.
- Dubé, N., Delvin, E., Yotov, W., Garafalo, C., Bendayan, M., Veerkamp, J. H., et al.** (2001). Modulation of intestinal and liver fatty acid-binding proteins in Caco-2 cells by lipids, hormones and cytokines. *J Cell Biochem*, 81, 613-620.
- Elmquist, J., Bjorbaek, C., Ahima, R. S., & Flier, J. S.** (1998a). Distributions of leptin receptor isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*, 395, 535-547.
- Elmquist, J., Elias, C., & Saper, C.** (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 22, 221-232.
- Elmquist, J., Maratos-Flier, E., Saper, C., & Flier, J.** (1998b). Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nature Neurosci*, 1, 445-450. *Endocrinology*, 138, 3548-3554.
- Emilsson, V., Liu, Y. L., Cawthorne, M. A., Morton, N. M., & Davenport, M.** (1997). Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes*, 46, 313-316.

- Erickson, J. C., Clegg, K. E., & Palmiter, R. D.** (1996a). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature*, *381*, 415-418.
- Erickson, J. C., Hollopeter, G., & Palmiter, R. D.** (1996b). Attenuation of the obesity syndrome of *ob/ob* mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*, *274*, 1704-1707.
- Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J., & Cone, R. D.** (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, *385*, 165-168.
- Fedorak, R. N., Chang, E. B., Madara, J. L., & Field, M.** (1987). Intestinal adaptation to diabetes. *J Clin Invest*, *79*, 1571-1578.
- Fei, Y. J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F. H., Romero, M. F., et al.** (1994). Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*, *368*, 563-566.
- Flier, J. S., & Maratos-Flier, E.** (1998). Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell*, *92*, 437-440.
- Flynn, M., Scott, T., Pritchard, T., & Plata-Salaman, C.** (1998). Mode of action of OB protein (leptin) on feeding. *Am J Physiol*, *275*, 174-179.
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., & Lollman, B.** (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*, *1*, 1311-1314.
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L.** (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, *395*, 763-770.
- Friedman, J. M., Leibel, R. L., Siegel, D. S., Walsh, J., & Bahary, N.** (1991). Molecular mapping of the mouse *ob* mutation. *Genomics*, *11*, 1054-1062.
- Friedman, M., Harris, R., Ji, H., Ramirez, I., & Tordoff, M.** (1999). Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. *Am J Physiol*, *276*, 1046-1053.
- Fujinami, K., Kojima, K., Aragane, K., & Kusunoki, J.** (2001). Postprandial hyperlipidemia in Zucker diabetic fatty *fa/fa* rats, an animal model of type II diabetes, and its amelioration by Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibition. *Jpn J Pharmacol*, *86*, 127-129.
- Gaigé, S., Abysique, A., & Bouvier, M.** (2003). Effects of leptin on cat intestinal motility. *J Physiol*, *546*, 267-277.

Garcia-Martinez, C., Lopez-Soriano, F. J., & Argiles, J. M. (1993). Intestinal glucose absorption is lower in obese than in lean Zucker rats. *J Nutr*, *123*, 1062-1067.

Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M. H., & Skoda, R. C. (1996). Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, *93*, 6231-6235.

Golden, P. L., Maccagnan, T. J., & Padridge, W. M. (1997). Human blood-brain barrier leptin receptor: binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest*, *99*, 14-18.

Grunfeld, C., Zhao, C., Fuller, J., Pollack, A., Moser, A., Friedman, J., et al. (1996). Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest*, *97*, 2152-2157.

Guilmeau, S., Buyse, M., & Bado, A. (2004). Gastric leptin: a new manager of gastrointestinal function. *Current Opinion in Pharmacology*, *4*, 561-566.

Guilmeau, S., Buyse, M., Tsocas, A., Laigneau, J. P., & Bado, A. (2003) Duodenal leptin stimulate cholecystokinin secretion evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. *Diabetes*, *52*, 1664-1672.

Hahn, T., Breininger, J., Baskin, D., & Schwartz, M. (1998). Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neurosci*, *1*, 271-272.

Hakansson, M. L., & Meister, B. (1998). Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, *68*, 420-427.

Halaas, J. L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D. A., & Friedman, J. M. (1997). Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, *94*, 8878-8883.

Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., et al. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, *269*, 543-546.

Haluzik, M., Nedvidkova, J., & Skrha, J. (1999). Treatment with the NO-synthase inhibitor, methylene blue, moderates the decrease in serum leptin concentration in streptozotocin-induced diabetes. *Endocr Res*, *25*, 163-171.

Hamilton, B. S., Paglia, D., Kwan, A. Y. M., & Dietel, M. (1995). Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med*, *1*, 953-956.

Hardie, L., Trayhurn, P., Abramovich, D., & Fowler, P. (1997). Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol*, *47*, 101-106.

Hathout, E. H., Sharkey, J., Racine, M., Ahn, D., Mace, J. W., & Saad, M. F. (1999). Changes in plasma leptin during the treatment of diabetic ketoacidosis. *J Clin Endocrinol Metab*, *84*, 4545-4548.

Havel, P. J., Uriu-Hare, J. Y., Liu, T., Stanhope, K. L., Stern, J. S., Keen, C. L., et al. (1998). Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats : reversal by insulin. *Am J Physiol*, *274*, 1482-1491.

He, Y., Chen, J., Quon, M. J., & Reitman, M. (1995). The mouse obese gene. *J Biol Chem*, *270*, 28887-28891.

Hedley, A. A., Ogden, C. L., Johnson, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., & Flegal, K. M. (2004). Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA*, *291*, 2847-2850.

Heiman, M. L., Ahima, R. S., Craft, L. S., Schoner, B., Stephens, T. W., & Flier, J. S. (1997). Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology*, *138*, 3859-3863.

Hellstrom, P. M., Geliebter, A., Naslund, E., Schmidt, P. T., Yahav, E. K., Hashim, S. A., et al. (2004). Peripheral and central signals in the control of eating in normal, obese and binge-eating human subjects. *Br J Nutr*, *92*, Suppl 1, S47-57.

Hervey, G. R. (1958). The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol*, *145*, 336-352.

Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec*, *78*, 149-72.

Heymsfield, S. B., Greenberg, A. S., Fujioka, K., Dixon, R. M., Kushner, R., Hunt, T., et al. (1999). Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA*, *282*, 1568-1575.

Hidaka, S., Yoshimatsu, H., Kondou, S., Oka, K., Tsuruta, Y., Sakino, H., et al. (2001). Hypoleptinemia, but not hypoinsulinemia, induces hyperphagia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurochem*, *77*, 993-1000.

Hidaka, S., Yoshimatsu, H., Kondou, S., Tsuruta, Y., Oka, K., Nogushi, H., et al. (2002). Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. *The FASEB Journal*, *16*, 509-518.

- Hirsh, A. J., & Cheeseman, C. I.** (1998). Cholecystokinin decreases intestinal hexose absorption by a parallel reduction in SGLT1 abundance in the brush-border membrane. *J Biol Chem*, *273*, 14545-14549.
- Horvath, C. M.** (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*, *25*, 496-502.
- Houseknecht, K. L., Mantzoros, C. S., Kuliawat, R., Hadro, E., Flier, J. S., & Kahn, B. B.** (1996). Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes*, *45*, 1638-1643.
- Hubschle, T., Thom, E., Watson, A., Roth, J., Klaus, S., & Meyerhof, W.** (2001). Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J Neurosci*, *21*, 2413-2424.
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., et al.** (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, *88*, 131-141.
- Igel, M., Kainulainen, H., Brauers, A., Becker, W., Herberg, L., & Joost, H. G.** (1996). Long-term and rapid regulation of ob mRNA levels in adipose tissue from normal (Sprague Dawley rats) and obese (db/db mice, fa/fa rats) rodents. *Diabetologia*, *39*, 758-765.
- Igel, M., Lindenthal, B., Giesa, U., & Von, B. K.** (2002). Evidence that leptin contributes to intestinal cholesterol absorption in obese (ob/ob) mice and wild-type mice. *Lipids*, *37*, 153-157.
- IMS Health.** (2004). Index canadien des maladies et traitements. Période de 12 mois terminée en juin 2004.
- Ingalls, A. M., Dickie, M. M., & Snell, G. D.** (1950). Obesity, a new mutation in the house mouse. *J Hered*, *41*, 317-318.
- Ishii, S., Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Sugihara, H., & Oikawa, S.** (2002). Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. *Endocrinology*, *143*, 4934-4937.
- Isse, N., Ogawa, Y., Tamura, N., Masuzaki, H., Mori, K., Okazaki, T., et al.** (1995). Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem*, *270*, 728-733.
- Jin, J., Zhang, S., Burguera, B. G., Couce, M. E., Osamura, R. Y., Kulig, E., et al.** (2000). Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*, *141*, 333-339.

- Kahle, E. B., Leibel, R. L., Domaschko, D. W., Raney, S. G., & Mann, K. T.** (1997). Obesity genes and insulin resistance syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 827, 35-49.
- Kahn, S. E., Prigeon, R. L., McCulloch, D. K., Boyko, E. J., Bergman, R. N., Schwartz, M. W., et al.** (1993). Quantification of the relationship between insulin sensitivity and B-cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function. *Diabetes*, 42, 1663-1672.
- Kalogeris, T. J., & Painter, R. G.** (2001). Adaptation of intestinal production of apolipoprotein A-IV during chronic feeding of lipid. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 280, 1155-1161.
- Kalra, S. P., Dube, M. G., Sahu, A., Phelps, C. P., & Kalra, P.** (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 10931-10935.
- Katzmarzyk, P. T.** (2002). The Canadian obesity epidemic, 1985-1998. *CMAJ*, 166, 1039-1040.
- Katzmarzyk, P. T., & Ardern, C. I.** (2004). Overweight and obesity mortality trends in Canada, 1985-2000. *Can J Public Health*, 95, 16-20.
- Kennedy, G. C.** (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc London Ser B*, 140, 578-596.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K.** (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402, 656-660.
- Kolaczynski, J. W., Considine, R. V., Ohannesian, J., Marco, C., Opentanova, I., Nyce, M. R., et al.** (1996). Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes*, 45, 1511-1515.
- Konturek, P. C., Brzozowski, T., Sulekova, Z., Brzozowska, I., Duda, A., Meixner, H., et al.** (2001a). Role of leptin in ulcer healing. *Eur J Pharmacol*, 414, 87-97.
- Konturek, P. C., Konturek, S. J., Brzozowski, T., Jaworek, J., & Hahn, E. G.** (2001b). Role of leptin in the stomach and the pancreas. *J Physiol Paris*, 95, 345-354.
- Kow, L., & Pfaff, D.** (1991). The effects of the TRH-metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol Biochem Behav*, 38, 359-364.
- Lahlou, N., Clement, K., Carel, J. C., Vaisse, C., Lotton, C., Le Bihan, Y., et al.** (2000). Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: relation to fat mass. *Diabetes*, 49, 1347-1352.

- Laml, T., Hartmann, B. W., Preyer, O., Ruecklinger, E., Soeregi, G., & Wagenbichler, P.** (2000). Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Gynecol Endocrinol*, *14*, 442-447.
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I., et al.** (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, *379*, 632-635.
- Leibel, R. L., Chung, W. K., & Chua, S. C.** (1997). The molecular genetics of rodent single gene obesities. *J Biol Chem*, *272*, 31937-31940.
- Leibowitz, S., & Alexander, J.** (1991). Analysis of neuropeptide Y-induced feeding: dissociation of Y1 and Y2 receptor effects on natural meal patterns. *Peptides*, *12*, 1251-1260.
- Lepercq, J., & Hauguel de Mouzon, S.** (2002). Leptine et grossesse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, *31*, 167-172.
- Lewin, M. J.M., & Bado, A.** (2001). Gastric leptin. *Microscopy Research and Technique*, *53*, 372-376.
- Liu, C., Liu, X. J., Barry, G., Ling, N., Maki, R. A., & De Souza, E. B.** (1997). Expression and characterization of a putative high affinity human soluble leptin receptor.
- Lostao, M. P., Urdaneta, E., Martinez-Ansó, E., Barber, A., & Martinez, A.** (1998). Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Letters*, *423*, 302-306.
- Maffei, M., Fei, H., Lee, G. H., Dani, C., Leroy, P., Zhang, Y., et al.** (1995a). Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, *92*, 6957-6960.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. M., Zhang, Y., et al.** (1995b). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob mRNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, *1*, 1155-1161.
- Maione, D., Di Carlo, E., Li, W., Musiani, P., Modesti, A., Peters, M. et al.** (1998). Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *EMBO J*, *17*, 5588-5597.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Isse, N., Satoh, N., Okazaki, T., Shigemoto, M., et al.** (1995). Adipocyte-specific expression and regional differences in adipose tissue. *Diabetes*, *44*, 855-858.

Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., et al. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, 3, 1029-1033.

Matsuoka, N., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Satoh, N., et al. (2001). Decreased triglyceride-rich lipoproteins in transgenic skinny mice overexpressing leptin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, 334-339.

McGregor, G. P., Desaga, J. F., Ehlenz, K., Fisher, A., Heese, F., Hegele, A., et al. (1996). Radioimmunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subjects. *Endocrinology*, 137, 1501-1504.

Meier, U., & Gressner, A. M. (2004). Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*, 50, 1511-1525.

Mercer, J. G., Hoggard, N., Williams, L. M., Lawrence, C. B., Hannah, L. T., & Trayhurn, P. (1996). Localization of leptin mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett*, 387, 113-116.

Mix, H., Widjaja, A., Jandl, O., Cornberg, M., Kaul, A., Göke, M., et al. (2000). Expression of leptin and lept receptor isoforms in the human stomach. *Gut*, 47, 481-486.

Mokdad, A. H., Bowman, B. A., Ford, E. S., Vinicor, F., Marks, J.S., & Koplan, J. P. (2001). The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA*, 286, 1195-1200.

Mokdad, A. H., Serdula, M. K., Dietz, W. H., Bowman, B. A., Marks, J. S., & Koplan, J. P. (1999). The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. *JAMA*, 282, 1519-1522.

Montague, C. T., Farooqui, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. *Nature*, 387, 903-908.

Moon, B. C., & Friedman, J. M. (1997). The molecular basis of the obese mutation in ob2J mice. *Genomics*, 42, 152-156.

Moran, T., & Schwartz, G. (1994). Neurobiology of cholecystokinin. *Crit Rev Neurobiol*, 9, 1-28.

Morton, N. M., Emilsson, V., Liu, Y. L., & Cawthorne, M. A. (1998). Leptin action in intestinal cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 26194-26201.

- Mountjoy, K., Mortrud, M., Low, M., Simerly, R. & Cone, R.** (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol*, *8*, 1298-1308.
- Mueller, W. M., Gregoire, F. M., Stanhope, K. L., Mobbs, C. V., Mizuno, T. M., Warden, C. H., et al.** (1998). Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology*, *139*, 551-558.
- Muller, G., Ertl, J., Gerl, M., & Preibisch, G.** (1997). Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, *272*, 10585-10593.
- Murakami, T., Iida, M., & Shima, K.** (1995). Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, *214*, 126-127.
- Muruzábal, F.J., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Archanco, M., & Burrell, M. A.** (2002). Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *General and Comparative Endocrinology*, *128*, 149-152.
- O'brien, S. N., Welter, B. H., & Price, T. M.** (1999). Presence of leptin in breast cell lines and breast tumors. *Biochem Biophys Res Commun*, *259*, 695-698.
- Ockenga, J., Bischoff, S. C., Tillmann, H. L., Rifai, K., Widjaja, A., Boker, K. H. W., et al.** (2000). Elevated bound leptin correlates with energy expenditure in cirrhotics. *Gastroenterology*, *119*, 1656-1662.
- Oliver, P., Picó, C., De Matteis, R., Cinti, S., & Palou, A.** (2002). Perinatal expression of leptin in rat stomach. *Developmental Dynamics*, *223*, 148-154.
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., et al.** (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, *278*, 135-138.
- Pardridge, W. M.** (1986). Receptor-mediated peptide transport through the bloodbrain barrier. *Endocrinol Rev*, *7*, 314-330.
- Pearson, P. Y., O'Connor, D. M., & Schwartz, M. Z.** (2001). Novel effect of leptin on small intestine adaptation. *Journal of Surgical Research*, *97*, 192-195.
- Pelleymounter, M., Cullen, M., Baker, M., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., et al.** (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, *269*, 540-543.
- Picó, C., Oliver, P., Sanchez, J., & Palou, A.** (2003). Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. *Br J Nutr*, *90*, 735-741.

Picó, C., Sánchez, J., Oliver, P., & Palou, A. (2002). Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats. *Obesity research*, *10*, 932-938.

Polonsky, K. S., Given, B. D., & VanCauter, E. (1988). Twenty-four hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest*, *81*, 442-448.

Porte, D. J., Woods, S., Baskin, D., Seeley, R., & Schwartz, M. (1998). Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia*, *41*, 863-881.

Pralong, F. P., Roduit, R., Waeber, G., Castillo, E., Mosimann, F., Thorens, B., et al. (1998). Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology*, *139*, 4264-4268.

Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., et al. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, *380*, 243-247.

Rajala, M. W., Obici, S., Scherer, P. E., & Rossetti, L. (2003). Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest*, *111*, 225-230.

Ranganathan, S., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Mudaliar, S., & Kern, P. A. (1998). Lack of effect of leptin on glucose transport, lipoprotein lipase, and insulin action in adipose and muscle cells. *Endocrinology*, *139*, 2509-2513.

Rau H, Reaves BJ, O'Rahilly S, Whitehead JP. (1999). Truncated human leptin associated with extreme obesity undergoes proteosomal degradation after defective intracellular transport. *Endocrinology* *140*:1718-23

Ritter, S., Dinh, T., & Friedman, M. (1994). Induction of Fos-like immunoreactivity (Fos-li) and stimulation of feeding by 2,5-anhydro-D-mannitol (2,5-AM) require the vagus nerve. *Brain Res*, *646*, 53-64.

Rojo-Martínez, G., Soriguer, F. J., González-Romero, S., Tinahones, F., Moreno, F., Ruiz de Adana, S., et al. (2000). Serum leptin and habitual fatty acid dietary intake in patients with type 1 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology*, *142*, 263-268.

Rosenbaum, M., & Leibel, R. L. (1999). Clinical review 107: Role of gonadal steroids in the sexual dimorphisms in body composition and circulating concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*, *84*, 1784-1789.

Rosenblum, C. I., Tota, M., Cully, D., Smith, T., Collum, R., Qureshi, S., et al. (1996). Functional STAT 1 and 3 signaling by the leptin receptor (OB-R); reduced

expression of the rat fatty leptin receptor in transfected cells. *Endocrinology*, 137, 5178-5181.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G-protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92, 573-585.

Sarraf, P., Frederich, R. C., Turner, E. M., Ma, G., Jaskowiak, N. T., Rivet, D.J. 3rd, et al. (1997). Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med*, 185, 171-175.

Schedl, H. P., & Wilson, H. D. (1971). Effects of diabetes on intestinal growth in the rat. *J Exp Zool*, 176, 487-496.

Schoeller, D. A., Cella, L. K., Sinha, M. K., & Caro, J. F. (1997). Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest*, 100, 1882-1887.

Schubring, C., Kiess, W., Englaro, P., Rascher, W., Dötsch, J., Hanitsch, S., et al. (1997). Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 1480-1483.

Schwartz, M. W., Baskin, D. G., Bukowski, T. R., Kuijper, J. L., Foster, D., Lasser, G., et al. (1996a). Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*, 45, 531-535.

Schwartz, M. W., Figlewicz, D. P., Baskin, D. G., Woods, S. C., & Porte, D. Jr. (1992). Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev*, 13, 387-414.

Schwartz, M. W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E. J., & Porte, D. Jr. (1996b) Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med*, 2, 589-593.

Schwartz, M. W., Prigeon, R. L., Kahn, S. E., Nicolson, M., Moore, J., Morawiecki, A., et al. (1997a). Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms. *Diabetes Care*, 20, 1476-1481.

Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P., et al. (1997b). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, 46, 2119-2123.

Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1996c). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*, 98, 1101-1106.

- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G.** (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*, 661 – 671.
- Seeley, R. J., Yagaloff, K. A., Fisher, S. L., Burn, P., Thiele, T. E., van Dijk, G., et al.** (1997). Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature*, *390*, 49.
- Senaris, R., Garcia-Caballero, T., Casabiell, X., Gallego, R., Castro, R., Considine, R. V., et al.** (1997). Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*, *138*, 4501-4504.
- Shuldiner, A. R., Yang, R., & Gong, D. W.** (2001). Resistin, obesity and insulin resistance--the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med*, *345*, 1345-1346.
- Shutter, J., Graham, M., Kinsey, A. C., Scully, S., Luthy, R., & Stark, K. L.** (1997). Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev*, *11*, 593-602.
- Siegmund, B., Sennello, J. A., Jones-Carson, J., Ganboni-Robertson, F., Lehr, H. A., Batra, A., et al.** (2004). Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut*, *53*, 965-972.
- Silva, L. F. P., & VandeHaar, M. J.** (1999). Role of leptin in mammary cell proliferation. *South African Journal of Animal Science*, *29*, 300-301.
- Sindelar, D. K., Havel, P. J., Seeley, R. J., Wilkinson, C. W., Woods, S. C., & Schwartz, M. W.** (1999). Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes*, *18*, 1275-1280.
- Sinha, M. K., Ohannesian, J. P., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Magosin, S., et al.** (1996a). Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*, *97*, 1344-1347.
- Sinha, M. K., Opentanova, I., Ohannesian, J. P., Kolacynski, J. W., Hale, L., Becker, G. W., et al.** (1996b). Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest*, *98*, 1277-1282.
- Sipols, A. J., Baskin, D. G., & Schwartz, M. W.** (1995). Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*, *44*, 147-151.
- Sitaraman, S., Buyse, M., & Sun, J.** (2002). Intestinal leptin: a novel proinflammatory cytokine. *Gastroenterology*, *120*, 879.

- Sitaraman, S., Liu, X., Charrier, L., Gu, L. H., Ziegler, T. R., *et al.* (2004). Colonic leptin : source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *The FASEB Journal*, *18*, 696-698.
- Slieker, L. J., Sloop, K. W., Surface, P. L., Kriauciunas, A., LaQuier, F., Manetta, J., *et al.* (1996). Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*, *271*, 5301-5304.
- Smith-Kirwin, S. M., O'Connor, D. M., De Johnston, J., Lancey, E. D., Hassink, S. G., & Funanage, V. L. (1998). Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab*, *83*, 1810-1813.
- Sobhani, I., Bado, A., Vissuzaine, C., Buyse, M., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., *et al.* (2000). Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut*, *47*, 178-183.
- Sone, M., Nagata, H., Takekoshi, S., & Osamura, R. Y. (2001). Expression and localization of leptin receptor in the normal rat pituitary gland. *Cell Tissue Res*, *305*, 351-356.
- Stan, S., Levy, E., Bendayan, M., Zoltowska, M., Lambert, M., Michaud, J., *et al.* (2001). Effect of human recombinant leptin on lipid handling by fully differentiated Caco-2 cells. *FEBS Lett*, *508*, 80-84.
- Stanley, B. G., Kyrkouli, S. E., Lampert, S., & Leibowitz, S. F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*, *7*, 1189-1192.
- Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P. K., Bue-Valleskey, J. M., Burgett, S. G., Craft, L., *et al.* (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, *377*, 530-534.
- Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., & Strosberg, A. D. (1998). A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*, *18*, 213-215.
- Takahashi, Y., Okimura, Y., Mizuno, I., Iida, K., Takahashi, T., Kaji, H., *et al.* (1997). Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem*, *272*, 12897-12900.
- Tartaglia, L. A. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem*, *272*, 6093-6096.
- Tartaglia, L., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpper, J., Devos, R., *et al.* (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor. *Cell*, *83*, 1263-1271.
- Tatti, P., Masseli, L., Buonanno, A., Di Mauro, P., & Strollo, F. (2001). Leptin levels in diabetic and nondiabetic subjects. *Endocrine*, *15*, 305-308.

- Thomson, A. B. R., & Wild, G.** (1997). Adaptation of intestinal nutrient transport in health and disease part 2. *Digestive Disease and Sciences*, *42*, 470-488.
- Thornton, J., Cheung, C., Clifton, D., & Steiner, R.** (1997). Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology*, *138*, 5063-5066.
- Travers, S., & Norgren, R.** (1987). Gustatory neural processing in the hindbrain. *Annu Rev Neurosci*, *10*, 595-632.
- Tremblay, M. S., & Willms, J. D.** (2000). Secular trends in the body mass index of Canadian children. *CMAJ*, *163*, 1429-1433.
- Tschop, M., Smiley, D. L., & Heiman, M. L.** (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, *407*, 908-913.
- Tsunoda, Y., Yao, H., Park, J., & Owyang, C.** (2003). Cholecystokinin synthesizes and secretes leptin in isolated canine gastric chief cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *310*, 681-684.
- Turban, S., Hainault, I., Truccolo, J., Andre, J., Ferre, P., Quignard-Boulange, A., et al.** (2002). Specific increase in leptin production in obese (fa/fa) rat adipose cells. *Biochem J.*, *362*, 113-118.
- Ukkola, O., & Poykko, S.** (2002). Ghrelin, growth and obesity. *Ann Med*, *34*, 102-108.
- Uysal, F. K., Önal, E. E., Aral, Y. Z., Adam, B., Dilmen, U., & Ardiçolu, Y.** (2002). Breast milk leptin : its relationship to maternal and infant adiposity. *Clinical nutrition*, *21*, 157-160.
- Vaisse, C., Halaas, J. L., Horvarth, C. M., Darnell, J. E. Jr, Stoffel, M., & Friedman, J. M.** (1996). Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet*, *14*, 95-97.
- Vidal, S., Cohen, S. M., Horvath, E., Kovacs, K., Scheithauer, B. W., Burguera, B. G., et al.** (2000). Subcellular localization of leptin in non-tumorous and adenomatous human pituitaries: an immuno-ultrastructural study. *J Histochem Cytochem*, *48*, 1147-1152.
- Wade, G. N., Lempicki, R. L., Panicker, A. K., Frisbee, R. M., & Blaustein, J. D.** (1997). Leptin facilitates and inhibits sexual behavior in female hamsters. *Am J Physio*, *272*, 1354-1358.

- Wang, L., Barachina, M. D., Martinez, V., Wei, J. Y., & Tache, Y. (2000).** Synergistic interaction between CCK and leptin to regulate food intake. *Regul Pept*, *92*, 79-85.
- Wang, G., Lee, H. M., Englander, E., & Greeley, G. H. (2002).** Ghrelin--not just another stomach hormone. *Regul Pept*, *105*, 75-81.
- Weigle, D. S., Bukowski, T. R., Foster, D. C., Holderman, S., Kramer, J. M., Lasser, G., et al. (1995).** Recombinant *ob* protein reduces feeding and body weight in the *ob/ob* mouse. *J Clin Invest*, *96*, 2065-2070.
- White, D. W., Wang, D. W., Chua, S. C. Jr, Morgenstern, J. P., & Leibel, R. L. (1997).** Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Gln-Pro extracellular domain mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, *94*, 10657-10662.
- White, J. D., & Kershaw, M. (1989).** Increased hypothalamic neuropeptide Y expression following food deprivation. *Mol Cell Neurosci*, *1*, 41-48.
- Wilding, J. P., Gilbey, S. G., Bailey, C. J., Batt, R. A., Williams, G., Ghatei, M. A., et al. (1993).** Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (*ob/ob*) mouse. *Endocrinology*, *132*, 1939-1944.
- Woliński, J., Biernat, M., Guilloteau, P., Weström, B. R., & Zabielski, R. (2003).** Exogenous leptin controls the development of the small intestine in neonatal piglets. *Journal of Endocrinology*, *177*, 215-222.
- Woods, S., Lotter, E., McKay, L., & Porte, D. J. (1979).** Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*, *282*, 503-505.
- Zarjevski, N., Cusin, I., Vetter, R., Rohner-Jeanrenaud, F., & Jeanrenaud, B. (1993).** Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology*, *133*, 1753-1758.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994).** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, *372*, 425-432.
- Zucker, L. M., et al. (1961)** Fatty a new mutation in the rat. *J Hered*, *52*, 275-278.