

N° d'ordre :
N° SIRC

31/14/16

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENE (U.S.T.H.B. ALGER)

INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE
(I.S.N.)

THÈSE

présentée à l'U.S.T.H.B. pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ES SCIENCES
PHYSIOLOGIE ANIMALE (NUTRITION - METABOLISME)

par

Yasmina DAHMANI

DYNAMIQUE COMPAREE ET REGULATION ENDOCRINE DES RESERVES
ENERGETIQUES DE L'ADIPOCYTE ET DE L'HEPATOCYTE CHEZ LE LAPIN :
CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCADIENS ET CIRCANNUELS
CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT

Soutenue publiquement le

devant le Jury

B. ASSELAH	Professeur	U.S.T.H.B.	<i>Président</i>
B. DESBALS	Professeur	Limoges	<i>Rapporteur</i>
M. BENSALAM	Professeur	U.S.T.H.B.	<i>Examineurs</i>
P. DESCHAUX	Professeur	Limoges	
F. HADJ BEKKOUCHE	Professeur	U.S.T.H.B.	
P. PETKOV	Professeur	Sofia	
C. ZIDANE	Professeur	U.S.T.H.B.	

B) 1416

Inscrit sous	1/11.11...
Date le	2007 oct 11
Cote	

"Les découvertes sont rares ; elles sont le fruit
d'un long travail, de pénibles méditations ;
elles ne se commandent pas".

Antoine Laurent de LAVOISIER.

Ce travail a été effectué au laboratoire de Physiologie Animale de L'U.E.R. des Sciences de l'Université de LIMOGES sous la direction de Monsieur le Professeur B. DESBALS.

Monsieur B. DESBALS nous a accueillie dans son laboratoire, par ses conseils éclairés et sa compétence, il a largement contribué à la réalisation de ce mémoire. Qu'il veuille bien accepter tous nos remerciements et notre sincère reconnaissance pour le temps et toute l'aide qu'il a bien voulu nous accorder.

Qu'il nous soit permis de remercier Monsieur B. ASSELAH, Professeur à L'U.S.T.H.B., qui nous fait le grand honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Nous souhaitons qu'il puisse trouver ici l'assurance de notre respectueuse gratitude.

Nous sommes heureuse de témoigner à Monsieur C. ZIDANE, Professeur à l'Université des Sciences Médicales (ALGER), l'expression de notre profonde reconnaissance. Nous voudrions le remercier pour son aide précieuse, de l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail et de l'honneur qu'il nous fait en contribuant à le juger.

Nous remercions Madame M. BENSALÉM, Professeur et Directrice de l'Institut des Sciences de la Nature de L'U.S.T.H.B. (ALGER) de l'intérêt qu'elle porte à juger ce travail.

Nous remercions également Madame F. HADJ BEKKOUCHE, Professeur à L'U.S.T.H.B. d'avoir bien voulu accepter de juger notre travail.

Monsieur P. PETKOV, Professeur d'Histologie et Embryologie ; membre de l'Académie de Médecine à SOFIA, par ses conseils éclairés et les moyens mis à notre disposition, a largement contribué à l'élaboration de ce mémoire. Nous tenons à le remercier très sincèrement pour toute l'aide et le temps qu'il nous a accordés. Qu'il trouve ici l'expression de toute notre gratitude d'avoir accepté de participer au jury d'examen. Nous ne saurions oublier la collaboration très efficace de Monsieur S. DONEV à qui nous exprimons toute notre reconnaissance.

Qu'il nous soit permis, en particulier, de remercier Monsieur P. DESCHAUX, Professeur à L'U.E.R. des Sciences de LIMOGES, qui nous fait le grand honneur de juger ce travail et de l'intérêt qu'il y porte.

Nous remercions également Monsieur G. SALEH et Mesdemoiselles B. ROBERT et A. LESAULT dont la collaboration fructueuse a permis de mener à bien ce travail.

Nos sincères remerciements vont à Monsieur le Professeur G. CATANZANO et à Monsieur le Docteur P.M. LAPLAUD, CHU LIMOGES, qui ont bien voulu nous accueillir dans leur laboratoire, permettant ainsi la réalisation d'une partie de l'expérimentation. Nous n'oublions pas la collaboration très efficace de leur équipe.

Nous ne saurions oublier la gentillesse et l'aide soutenue et amicale que nous ont témoignés Monsieur et Madame NARDOU, c'est à la compétence de Madame O. NARDOU que nous devons la réalisation finale de ce mémoire de thèse. Nous leur renouvelons à tous les deux nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance.

Nous remercions très chaleureusement Monsieur J.C. FAGE pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée pendant la réalisation iconographique de ce mémoire.

Notre sympathie amicale va à Madame A. VILLELEGER pour sa collaboration technique dont nous la remercions.

Que Mesdemoiselles M. Th. BRAU et M.Th. VERSCHUUR trouvent dans ce présent mémoire qui est le fruit de leur travail, l'assurance de notre respectueuse gratitude pour l'aide qu'elles nous ont généreusement prodiguée depuis très longtemps. Nous leur exprimons notre profonde reconnaissance et notre respectueux attachement.

Que tous les collègues et amis qui nous ont aidée et encouragée, trouvent ici l'expression de toute notre gratitude.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
METHODES	4
CHAPITRE I	30
Etude de la lipogenèse de l'hépatocyte isolé chez le lapin adulte.	
CHAPITRE II	76
Mobilisation et élaboration comparées des réserves énergétiques de l'adipocyte et de l'hépatocyte chez le lapin. Cycles physiologiques circadiens et circannuels.	
CHAPITRE III	111
Croissance et développement du lapereau	
CHAPITRE IV	155
Désordres morphologiques consécutifs à la surrenalectomie chez le lapin adulte	
RESUME ET CONCLUSIONS	165
BIBLIOGRAPHIE	170
TABLEAUX	



M E T H O D E S

METHODES

I - MODELE BIOLOGIQUE

A - L'ANIMAL : SON CONDITIONNEMENT NUTRITIONNEL

B - LES PRELEVEMENTS TISSULAIRES

1°) Prélèvements sanguins

2°) Prélèvements des tissus

II - TECHNIQUES ANALYTIQUES

A - LES LIPIDES

1°) Mesure des lipides du foie

2°) Mesure des lipides plasmatiques

B - LES GLUCIDES

1°) Le glucose sanguin

2°) Le glycogène hépatique

C - LES PROTEINES

1°) Au niveau des hépatocytes

2°) Au niveau du plasma

a) Principe

b) Réactifs utilisés

c) Mode opératoire

D - LE GLYCEROL

III - PREPARATION DES CELLULES ADIPEUSES ISOLEES : MESURE DES ACTIVITES LIPOLYTIQUE ET LIPOGENIQUE "IN VITRO"

A - PREPARATION DES CELLULES ADIPEUSES ISOLEES

1°) Choix du milieu d'incubation

2°) Préparation des cellules adipeuses isolées

3°) Incubation des suspensions cellulaires

B - MESURE DE L'ACTIVITE LIPOLYTIQUE

1°) Choix d'un critère pour évaluer la lipolyse "in vitro"

2°) Expression des résultats

C - MESURE DE L'ACTIVITE LIPOGENIQUE

1°) Extraction des lipides totaux et des acides gras

a) Extraction des lipides totaux

b) Extraction des acides gras

2°) Expression des résultats

a) Cas de l'acétate de sodium

b) Cas du glucose

IV - PREPARATION DES HEPATOCYTES ISOLES ET MESURE DE L'ACTIVITE LIPOGENIQUE " IN VITRO"

A - PREPARATION DES HEPATOCYTES PAR PERFUSION DU FOIE

- 1°) Chez l'animal adulte
- 2°) Chez le nouveau-né et le jeune lapereau

B - MESURE DE L'ACTIVITE LIPOGENIQUE DES HEPATOCYTES ISOLES

- 1°) Extraction des lipides totaux et acides gras
- 2°) Expression des résultats

V - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

- A - LE FOIE
- B - LE PANCREAS
- C - L'INTESTIN

VI - PRESENTATION DES RESULTATS

VII - PROVENANCE DES PRODUITS HORMONAUX ET DIVERS AGENTS PHARMACOLOGIQUES UTILISES AU COURS DE CES TRAVAUX.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire s'inscrit dans le cadre des recherches effectuées depuis plusieurs années dans notre laboratoire sur les facteurs de régulations extrinsèque et intrinsèque des métabolismes et plus particulièrement du métabolisme des lipides chez le lapin. L'approche expérimentale de ces problèmes se situe à différents niveaux d'organisation. Ainsi DESBALS et alii (1965) et DESBALS (1967) "in vivo" décrivent et analysent l'origine des troubles de la circulation des lipides consécutifs à des désordres endocriniens aigus induits par la surrénalectomie et l'hypophysectomie.

"In vitro", l'étude de la cellule adipeuse isolée permet à DESBALS et ses collaborateurs (PEJOAN et DESBALS, 1973 ; ELCHINGER et alii, 1976) de dévoiler les mécanismes cellulaires et subcellulaires rendant compte des perturbations observées au niveau du plasma qui est un échelon d'intégration biologique plus complexe. Les régulations intrinsèques, ici hormonales, apparaissent alors dépendantes de facteurs extrinsèques comme les variations annuelles de l'environnement physique et trophique ; c'est l'objet des travaux de DESBALS et de ses collaborateurs (ALAOUTI et alii, 1982 ; SZAS, 1982 ; CATANZANO, 1984 ; CATANZANO et alii, 1986). En fait, ces travaux tendent à situer l'homéostasie du mammifère dans un environnement écologique dominé par de nombreuses fluctuations rythmiques.

ASSENMACHER en 1984, dans le courrier du CNRS, cite les propos tenus dès 1927 par HENDERSON : "nous devons le concept de la constance du milieu intérieur dans sa constance du milieu extérieur dans sa quasi totalité à Claude BERNARD lui-même. Mais cette théorie ne doit pas être comprise comme celle d'une constante absolue ; mais il faut entendre que les variations des propriétés du milieu intérieur sont, en général, cycliques et adaptatives c'est-à-dire fonctionnelles et non pas aléatoires" ; et ASSENMACHER conclut "on peut se demander pourquoi les recherches sur les régulations homéostatiques ont si longtemps ignoré l'aspect rythmique des fluctuations autour de leur niveau constant".

L'être vivant a des propriétés qui sont en adéquation avec les conditions physicochimiques du milieu extérieur, sinon il meurt ; à cet égard citons BOISSIN et alii (1986) "Ainsi au cours de l'évolution des relations temporelles très précises se sont développées entre les fonctions physiologiques vitales (métabolisme énergétique, reproduction, etc...) et les variations journalières et annuelles de l'environnement physique et trophique. Les fluctuations rythmiques observées au niveau des fonctions physiologiques ne sont ainsi que le reflet des variations du milieu. Les cycles physiologiques ne peuvent, cependant, jouer leur rôle adaptatif que dans la seule mesure où leur déroulement est réglé par anticipation".

Ceci est la condition nécessaire de la survie d'une espèce et, est le résultat de l'évolution sur notre planète.

A partir des résultats acquis dans notre laboratoire sur l'homéostasie des graisses chez le lapin adulte nous sommes placés dans trois circonstances susceptibles d'influer sur la régulation de cette homéostasie.

Nous avons tout d'abord envisagé l'influence des conditions physiques du milieu ce qui nous a conduit à révéler des variations cycliques de la régulation du métabolisme des lipides en coïncidence avec les fluctuations rythmiques circadiennes et circannuelles de la photopériode.

Au niveau des régulations intrinsèques nous avons envisagé deux situations ; l'une est physiologique, c'est la croissance et le développement de la naissance à l'âge adulte au travers des périodes de l'allaitement et du sevrage au cours desquelles s'installent et s'affirment les régulations et les propriétés des paramètres impliqués, l'autre est une perturbation endocrinologique aiguë induite par la surrénalectomie.

Nous avons tenté de corrélérer les variations circadiennes et circannuelles de la photopériode, la croissance et le développement et les troubles consécutifs à la surrénalectomie, à la prise alimentaire, aux niveaux plasmatiques et hépatiques des glucides et des lipides et aux activités lipogéniques et lipolytiques spontanées et induites par des agents hormonaux ou leurs analogues de l'hépatocyte et de l'adipocyte isolés "in vitro" ; l'analyse morphologique de certaines structures a eu pour objet de visualiser nos observations quantitatives et de dévoiler des paramètres inaccessibles à l'analyse chimique actuellement.

Nous montrons alors l'adéquation comportementale et physiologique du lapin à sa niche écologique. Il est incontestable, qu'au cours de l'évolution, seules ont survécu les espèces dont les variations cycliques des propriétés du milieu intérieur, dépendantes de l'information génétique étaient en adéquation avec les cycles du milieu extérieur (hibernation de certains animaux, économie d'eau des espèces désertiques, etc...).

Ce qui frappe le lecteur de la production scientifique au sujet de la lipolyse et de la lipogénèse de l'adipocyte, de l'hépatocyte et des effets métaboliques de l'insuline sur ces mécanismes, c'est l'absence de cohérence des observations selon les espèces animales étudiées. Ainsi notre laboratoire a bien différencié le lapin par une faible capacité lipogénique de l'adipocyte isolé et par des variations saisonnières de cette activité métabolique. Dans le présent travail nous décrivons en outre l'activité lipogénique au niveau de l'hépatocyte chez cet animal (ce qui constituera le premier chapitre de notre mémoire).

Les résultats sont différents chez le rat ; de nombreux travaux décrivent une intense activité lipogénique tant de l'adipocyte que de l'hépatocyte (MASORO et alii, 1971 ; BRUCKDORFER et alii, 1972 ; BERRY et alii, 1973 b ; MADKE et alii, 1973 ; NILSSON et alii, 1973 ; CLARK et alii, 1974 ; HARRIS, 1975), en outre dans cette espèce, l'insuline a un rôle incontestable de stimulation de la lipogénèse (DI GIROLAMO et RUDMAN, 1966 ; SAGGERSON, 1974). Au laboratoire sur le blaireau et le renard (SZAS, 1982), il apparaît que l'adipocyte n'a qu'une activité lipogénique discrète et l'insuline est apparemment incapable de stimuler de façon importante la lipogénèse. Donc selon les espèces étudiées l'adipocyte aurait un comportement lipogénique différent et l'insuline n'aurait pas les mêmes propriétés. Nous verrons que la prise en compte de la structure temporelle des espèces peut rendre à ces problèmes toute leur cohérence et permet de retrouver l'unité physiologique des espèces chez les mammifères. Pour se faire nous avons étudié les cycles physiologiques circadiens et circannuels des réserves énergétiques du foie et du tissu adipeux du jeune lapin de deux mois. Nous verrons ensuite comment ces cycles physiologiques dépendants des conditions cycliques du milieu donnent des réponses métaboliques anticipant sur les variations saisonnières trophiques de la niche écologique (ces résultats sont rapportés dans le deuxième chapitre).

Nous nous sommes interrogés sur l'âge auquel la structure temporelle endogène s'accorde aux marqueurs de temps de l'environnement. A cette fin, nous avons entrepris d'étudier l'adipocyte et l'hépatocyte, la lipolyse et la lipogénèse au cours de la croissance et du développement du lapereau de la naissance au sevrage ; ceci constitue notre troisième chapitre.

Enfin, nous avons entrepris de perturber profondément l'économie endocrine du lapin par la surrénalectomie afin d'évaluer les réponses des indicateurs métaboliques et informationnels privilégiés que nous avons choisis, à savoir le plasma, l'hépatocyte, l'adipocyte, l'hypophyse, le pancréas, l'intestin.

I - MODELE BIOLOGIQUE

A - L'ANIMAL : SON CONDITIONNEMENT NUTRITIONNEL

Notre expérimentation a porté sur 2 lots de lapins :

- des mâles "Fauve de Bourgogne" provenant d'un même élevage (La Faurie 33 - CUBJAC - France), âgés de 2 à 3 mois, entre 2 et 2,5 kg,

- des lapereaux de la naissance à l'âge de 60 jours provenant de la souche INRA Toulouse 59 (Race Solam - Solaf). Les animaux sont en cages individuelles dans une ambiance thermique à 20 - 23°C car le froid mobilise les réserves lipidiques (KAYSER, 1955) et la photopériode est celle du Limousin (Altitude : 420 ; longitude : 1,11 ; latitude : 45,52 N).

Les lapins adultes sont nourris à l'aliment complet SANDERS : protéines brutes (16 %) ; lipides (2 %) ; cellulose (16 %) ; eau (14 %) ; supplémentation en minéraux et vitamines, eau "ad libitum".

A la naissance, le lapereau tète le colostrum : matière sèche : 31,4% dont protéines (13,5 %) ; lipides (14,57 %) ; lactose (1,63 %) ; cendres (1,65%) selon (LEBAS, 1971).

Le lapereau tète essentiellement le lait maternel jusqu'au 14ème jour puis il consomme en outre de l'aliment dont la part relative s'accroît jusqu'au sevrage qui a lieu entre le 28ème et le 30ème jour.

B - LES PRELEVEMENTS TISSULAIRES

Sauf exigence expérimentale (étude circadienne), les prélèvements sanguins et les sacrifices des animaux ont toujours lieu entre 9 et 11 heures (heure locale) du matin chez les animaux à jeun (depuis 24 à 48 heures) et nourris.

Les travaux d'analyse portent essentiellement sur le plasma, le foie et le tissu adipeux périrénal.

1°) Prélèvements sanguins

Le sang est prélevé sur héparine ou EDTA (1,5 mg/ml de NaCl à 0,9 %) au niveau de la veine marginale de l'oreille chez l'adulte et par décapitation chez le lapereau. Après centrifugation le plasma décanté est recueilli et stocké à - 25°C jusqu'à utilisation ultérieure.

2°) Prélèvements des tissus

- Tissu adipeux

Le tissu adipeux périrénal du lapin est prélevé immédiatement après le sacrifice des animaux pour préparer des adipocytes isolés selon ROBBELL (1964).

- Foie

. **Analyse biochimique** : Le prélèvement d'un fragment de foie en vue de la détermination de la teneur en glycogène doit être effectué le plus rapidement possible. Pour éviter toute diminution du taux de glycogène par glycolyse (DESBALS, 1963); entre le sacrifice et l'immersion du fragment de foie pesé dans la potasse aqueuse à 30 % bouillante, il doit s'écouler moins de 2 minutes. La répartition quantitative de ce constituant n'étant pas homogène dans tous les lobes (CANN, 1956), nous prenons le soin de prélever dans tous les cas le fragment de foie dans le même lobe et au même endroit. Nous avons exprimé le taux de glycogène d'une part en concentration, g p. cent de foie frais, et d'autre part en g p. kg d'animal ; cette dernière expression est nécessaire car elle tient compte des variations relatives de la masse du foie et du poids de l'animal, ceci est important lors du développement et de la croissance mais aussi lorsque la masse du foie varie rapidement. Ainsi nous sommes toujours assurés que les variations de concentration en g p. kg d'animal n'étaient pas uniquement dues à la variation du rapport :

$$\frac{\text{Poids du foie}}{\text{poids du corps}} \times 100$$

mais avait une signification métabolique.

. **Analyse métabolique** : Pour obtenir des hépatocytes le foie est perfusé in situ avec un milieu Krebs Ringer bicarbonaté en présence de collagénase selon BERRY et FRIEND (1969) ; cette technique est adaptée au lapin (voir chapitre I) dans notre laboratoire.

II - TECHNIQUES ANALYTIQUES

A - LES LIPIDES

Les lipides ont été évalués quantitativement dans le plasma et le foie.

1°) Mesure des lipides du foie

Un fragment de foie frais pesé est broyé à l'ultraturax dans le mélange chloroforme-méthanol (2 : 1 V/V) selon FOLCH et alii, (1957) qui permet l'extraction à froid des lipides en une seule manipulation. Le broyat est filtré sur papier dégraissé. Une prise aliquote du filtrat est mise à sec et sert à estimer par pesée les lipides totaux du foie. Le dosage des acides gras est réalisé par une microméthode adaptée au laboratoire selon FOLCH et alii (1957), SPERRY (1955) et ALBRINK (1959). Une prise aliquote du filtrat est mise à sec puis saponifiée par la potasse alcoolique normale. Après acidification par l'acide chlorhydrique normal, l'extraction des acides gras est effectuée par l'éther de pétrole qui est mis à sec. Les acides gras et l'insaponifiable sont dissous à chaud (50°C) dans de l'éthanol absolu (distillation au laboratoire). Sur cette même solution alcoolique sont dosés les acides gras totaux et le cholestérol total du foie. Les acides gras sont titrés par la soude N/50 en présence de bleu de Nil (en solution dans l'alcool absolu) à l'aide d'une microburette Beckman 153.

Le cholestérol total est dosé par colorimétrie selon **LIEBERMANN BUCHARD** décrite par **STADTMAN (1957)** après mise à sec d'un aliquot de la solution alcoolique.

2°) Mesure des lipides plasmatiques

Les triglycérides sont dosés par une technique enzymatique (**BOEHRINGER MANNHEIM GmbH diagnostica**).

Le cholestérol total est dosé par une méthode enzymatique (**BOEHRINGER MANNHEIM GmbH diagnostica**).

Les lipides totaux sont dosés par une méthode colorimétrique avec le mélange sulfophosphanilique (**BIOMERIEUX**).

B - LES GLUCIDES

1°) Le glucose sanguin

Le glucose est dosé par une méthode enzymatique à la glucose-oxydase (**TRINDER, 1969**).

2°) Le glycogène hépatique

Un fragment de foie frais pesé à la balance de torsion est hydrolysé par la potasse aqueuse à 30 % pendant 30 min dans un bain-marie bouillant. Le glycogène est précipité par l'alcool absolu et récupéré par centrifugation sous forme de culot qui est hydrolysé par H_2SO_4 (**GOOD, KRAMER et SOMOGYI, 1933**). Après neutralisation par la soude N le glucose est dosé selon **NELSON (1944)** et non par la méthode enzymatique précédemment décrite car le milieu final n'est pas parfaitement neutre et rend incertaine la méthode à la glucose-oxydase.

C - LES PROTEINES

1°) Au niveau des hépatocytes

Ce dosage permet de rapporter les activités métaboliques de l'hépatocyte à un critère quantitatif représentatif de la cellule : les protéines. Les protéines sont dosées par colorimétrie selon **LOWRY et alii (1951)** après broyage des hépatocytes à l'ultraturax dans du tampon Krebs Ringer bicarbonaté.

2°) Au niveau du plasma

Des valeurs instantanées de la glycémie dans certains de nos cas expérimentaux donnent une image imparfaite de l'évolution de ce paramètre. Or la glycosylation des protéines sériques mise en évidence pour la première fois par **MAILLARD (1912)** et **BIERRY et FANDARD (1914)**, est favorisée par l'hyperglycémie (**BAKER et alii, 1984 ; LLOYD et alii, 1984 ; LABADIE, 1985**). Ainsi les variations du taux des protéines glycosylées du plasma rendent compte sur plusieurs jours du niveau moyen de la glycémie. Ces protéines glycosylées sont dosées selon **JOHNSON et alii (1982)** modifié par **LABADIE (1985)**.

DOSAGE DES PROTEINES GLYCOSYLEES PLASMATIQUES

Gamme étalon					Echantillons		
Blanc A	Concentration en DMF extrapolée à 1 l de plasma				Blanc E	Plasma	
	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM		Témoin	NBT
	1000	1000	1000	1000	1000		1000
Solution de NBT μ l	1000	1000	1000	1000	1000		1000
Tampon carbonates μ l	1ère incubation 10 min. au bain-marie à 37°C						
Solution de DMF μ l	0	20	40	60	80		
Solution de sérum albumine μ l	100	80	60	40	20		
Plasma μ l						100	100
NaCl à 9 % μ l						100	
2ème incubation 15 min. au bain-marie à 37°C							

a) Principe

Le glucose fixé sur les fonctions amines des protéines sériques sous forme de céto-amines peut réduire la solution de nitro-bleu de tétrazolium. Il y a production d'un dérivé formazan de couleur violacée dont la cinétique de formation est suivie en spectrophotométrie à pH = 10,8 ; à 37°C et 510 nm pendant 15 min. L'évaluation quantitative se fait par rapport à un étalon que l'on obtient par condensation de glucose avec la morpholine : le désoxy-morpholino-fructose (DMF). Ce DMF est en solution dans du sérum physiologique renfermant de la sérum-albumine.

b) Réactifs utilisés

- Solution tampon carbonates à 0,1 M/l, pH = 10,8 ; dissoudre 0,84 g de NaHCO_3 (PM = 84) et 25,74 g de Na_2CO_3 , 10 H_2O (PM = 286) dans l'eau distillée, q.s.p. 1 litre.

- Solution de Nitro-bleu de tétrazolium (NBT) à 0,25 mM/l dans le tampon précédent.

- Solution de sérum albumine humaine ou bovine (fraction V) à 40 g/l dans NaCl aqueux à 9%.

- Solution de désoxy-1-morpholino-1-D fructose (DMF) à 5 mM/l dans la solution précédente : peser 20 mg pour 16 ml de solution.

c) Mode opératoire

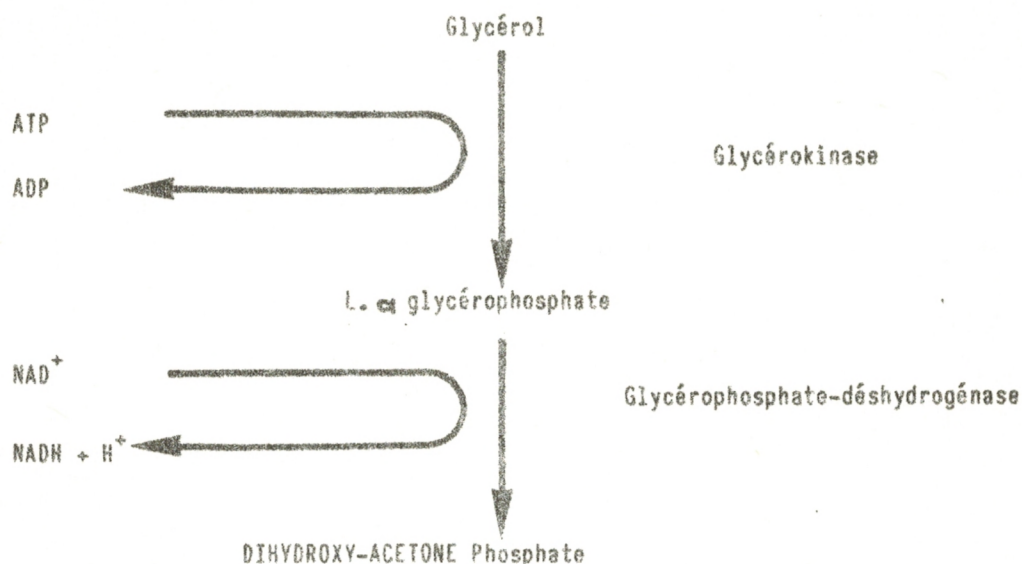
Nous avons modifié la technique de LABADIE (1985) pour l'adapter à des microdosages car nous ne disposons que de faibles quantités de plasma, surtout chez le jeune lapereau. La densité optique est lue au spectrophotomètre à 510 nm ; le zéro étant réglé avec le Blanc E. La D.O. du témoin dépourvu de colorant sera soustraite de celle obtenue après réaction avec le NBT.

Les résultats peuvent être exprimés de deux façons différentes : soit en mM de DMF par litre de plasma, soit en micromoles de DMF par gramme de protéines sériques. Cette deuxième expression implique donc un dosage des protéines sériques que nous avons réalisé selon LOWRY et alii (1951).

D - LE GLYCEROL

Le glycérol libéré dans le milieu d'incubation des adipocytes isolés est dosé selon WIELAND (1957) sur les aliquots de 200 μl dont l'activité métabolique est arrêtée par le froid à 0°C.

Le principe repose sur les réactions enzymatiques suivantes :



La quantité de NAD utilisée est dos e en présence d'hydrate d'hydrazine. L'hydrate d'hydrazine bloque la fonction cétone de la dihydroxy-acétone phosphate et rend la réaction irréversible. La quantité de NAD utilisée est proportionnelle à celle de glycérol présent dans le milieu.

Le milieu réactionnel, préparé extemporanément, a la composition suivante : hydrazine 1 M ; glycolle $2 \cdot 10^{-1}$ M ; MgCl₂ $2 \cdot 10^{-3}$ M ; ATP $1,25 \cdot 10^{-5}$ M ; NAD $0,55 \cdot 10^{-3}$ M ; glycérokinase 0,2 g/ml ; glycérophosphate déshydrogénase 1 g/ml, pH 8,9.

A chaque prise de 200 μ l de milieu d'incubation, on ajoute 2 ml de milieu réactif. Après 60 min à la température ambiante, la lecture de la densité optique est faite à la longueur d'onde de 340 nm sur un spectrophotomètre LKB. Une gamme étalon de glycérol (glycérol bidistillée MERCK)   (0,05 ; 0,1 et 0,2 μ moles/ml) est réalisée pour chaque dosage.

III - PRÉPARATION DES CELLULES ADIPEUSES ISOLEES : MESURE DES ACTIVITES LIPOLYTIQUE ET LIPOGENIQUE "IN VITRO"

A - PRÉPARATION DES CELLULES ADIPEUSES ISOLEES : La méthode utilisée est celle décrite par ROBBELL (1964).

1^o) Choix du milieu d'incubation :

Les diverses solutions salines tendent à reproduire la composition

du milieu extracellulaire afin d'assurer au mieux l'intégrité métabolique des cellules. Les adipocytes sont incubés dans une solution de Krebs Ringer bicarbonaté et albuminé (KRBA). Ce milieu KRBA étant plus approprié que le krebs Ringer phosphate albumine qui d'après KUMON et alii (1976 b) réduit considérablement la lipolyse in vitro chez le lapin. Le milieu d'incubation contient de l'albumine. Il a été montré une relation entre la libération des acides gras et du glycérol et la présence d'albumine dans le milieu (GOODMAN, 1958 ; VAUGHAN, 1962 ; ROBBELL, 1965). En l'absence d'albumine, l'hydrolyse des triglycérides est freinée par l'accumulation des acides gras libres (AGL) dans la cellule adipeuse (CUSHMAN et alii, 1973 ; BURNS et alii, 1975 ; FAIN et SHEPHERD, 1975, 1976 ; MALGIERI et alii, 1975) et le rôle de l'albumine est de fixer les acides gras libres.

La présence de glucose dans le milieu d'incubation des adipocytes augmente la lipolyse spontanée ou induite par un agent lipolytique chez le Rat (CARLSON, 1965 ; CHLOUVERAKIS, 1967 ; HO et alii, 1970 ; NAITO et OKADA, 1975), chez l'Homme (EFFENDIC et OSIMAN, 1970) et chez le Lapin (PEJOAN, 1976). Pour nos protocoles expérimentaux, nous avons utilisé dans tous les cas, un milieu glucosé. Il s'agit d'un milieu Krebs Ringer bicarbonaté albuminé (KRBA) et glucosé de composition : NaCl 120 mM ; KCl 4,8 mM ; KH_2PO_4 1,2 mM ; Mg SO_4 1,2 mM ; CaCl_2 1,8 mM ; NaHCO_3 25 mM ; glucose 5 mM ; albumine 3,5 g p. 100 ml de milieu ; pH final 7,4. Ce milieu est préparé extemporanément à partir d'une solution mère Krebs Ringer. Dans la solution obtenue par dilution, on dissout le bicarbonate de sodium, l'albumine et le glucose.

2°) Préparation des cellules adipeuses isolées :

Pour limiter la lyse des cellules adipeuses, les diverses opérations seront réalisées dans des tubes en polyéthylène (Nalgène). Les expériences antérieures faites au laboratoire ont conduit à retenir le protocole expérimental suivant :

- 3 à 5 g de tissu adipeux périrénal sont découpés en fragments et placés dans un tube en nalgène contenant 10 à 15 ml de KRBA (pour les expériences d'évaluation de l'activité lipolytique la solution est glucosée, alors que lorsqu'on veut évaluer la lipogenèse il ne faut surtout pas introduire de glucose car il servirait de précurseur) et 10 à 15 mg de collagénase (WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION) ; l'atmosphère dans le tube est un mélange O_2 - CO_2 -95/05 ; une agitation rapide au bain-marie métabolique à 37°C pendant 30 min permet la digestion par la collagénase du stroma conjonctif et vasculaire. Cette durée est suffisante pour dissocier les adipocytes de lapin (DESBALS et alii, 1971), une prolongation dans le temps de cette digestion entraînerait une lyse des cellules.

La suspension cellulaire filtrée sur soie japonnaise (filtre DURIEUX, Screen 12) est recueillie dans un tube en polyéthylène et laissée au repos moins d'une minute à 37°C afin que les adipocytes se rassemblent en une phase supérieure ; cette séparation par flottaison est une méthode douce, la centrifugation favoriserait leur lyse ; la couche inférieure est éliminée par aspiration. La suspension cellulaire est lavée deux fois par 10 ml de KRBA(*) glucosé maintenu à 37°C. A la suite du dernier rinçage, le culot cellulaire est dilué avec du KRBA glucosé toujours à 37°C.

3°) Incubation des suspensions cellulaires

Le culot de cellules obtenu est quantitativement variable avec la quantité de tissu prélevé et l'origine anatomique du tissu (CATANZANO, 1984). La suspension cellulaire est ajustée à 7 ou 10 ml par du KRBA glucosé à 37°C selon le nombre d'aliqots qui doivent être faits. Des aliqots de 500 μ l sont distribués dans des tubes en polyéthylène contenant 1,5 ml de KRBA glucosé(**) avec ou sans agents lipolytiques ou antilipolytiques éventuellement ajoutés juste avant l'incubation. Les hormones et les agents utilisés sont délivrés dans un volume constant de 50 μ l. L'atmosphère est constituée par le mélange O₂-CO₂ 95/05 et l'incubation est réalisée sous agitation lente au bain-marie métabolique à 37°C pendant 90 min (**).

B - MESURE DE L'ACTIVITE LIPOLYTIQUE

1°) Choix d'un critère pour évaluer la lipolyse "in vitro"

L'activité lipolytique des cellules adipeuses isolées est évaluée par la quantité de glycérol libéré dans le milieu d'incubation ; cette méthode a été préférée à l'évaluation de la lipolyse par le dosage des acides gras libres car le glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides n'est pas métabolisé dans la cellule adipeuse (BALLY et alii, 1960 ; VAUGHAN, 1962 ; STEINBERG ET VAUGHAN, 1961). En effet l'activité glycérokinase de l'adipocyte est extrêmement faible (RESNEF et SHAPIRO, 1970), par suite, la phosphorylation du glycérol venant de la lipolyse n'intervient pratiquement pas dans le processus de réestérification des acides gras. Toutefois, chez la souris génétiquement obèse, souris ob/ob (THENEN et MAYER, 1975) la glycérokinase est active et l'augmentation de l'activité glycérokinase est corrélée avec le degré d'hyperinsulinémie.

Au cours de la synthèse des triglycérides, les AGL provenant de la lipolyse peuvent être réestérifiés facilement et leur taux peut être considéré comme la résultante de deux processus métaboliques opposés (lipolyse et réestérification). Ces remarques font que les AGL ne peuvent être parfaitement représentatifs de la lipolyse des cellules adipeuses isolées, d'autant plus que certaines substances (substrats, hormones, produits pharmacologiques, etc...) peuvent affecter l'une des deux réactions métaboliques ; par exemple le glucose du milieu d'incubation facilite la réestérification des AGL ce qui réduit la mesure de la lipolyse évaluée par les AGL. Par suite, la quantité de glycérol apparu dans le milieu d'incubation est bien l'indice du niveau de la lipolyse car le glycérol provient de cette seule séquence métabolique.

Remarques :

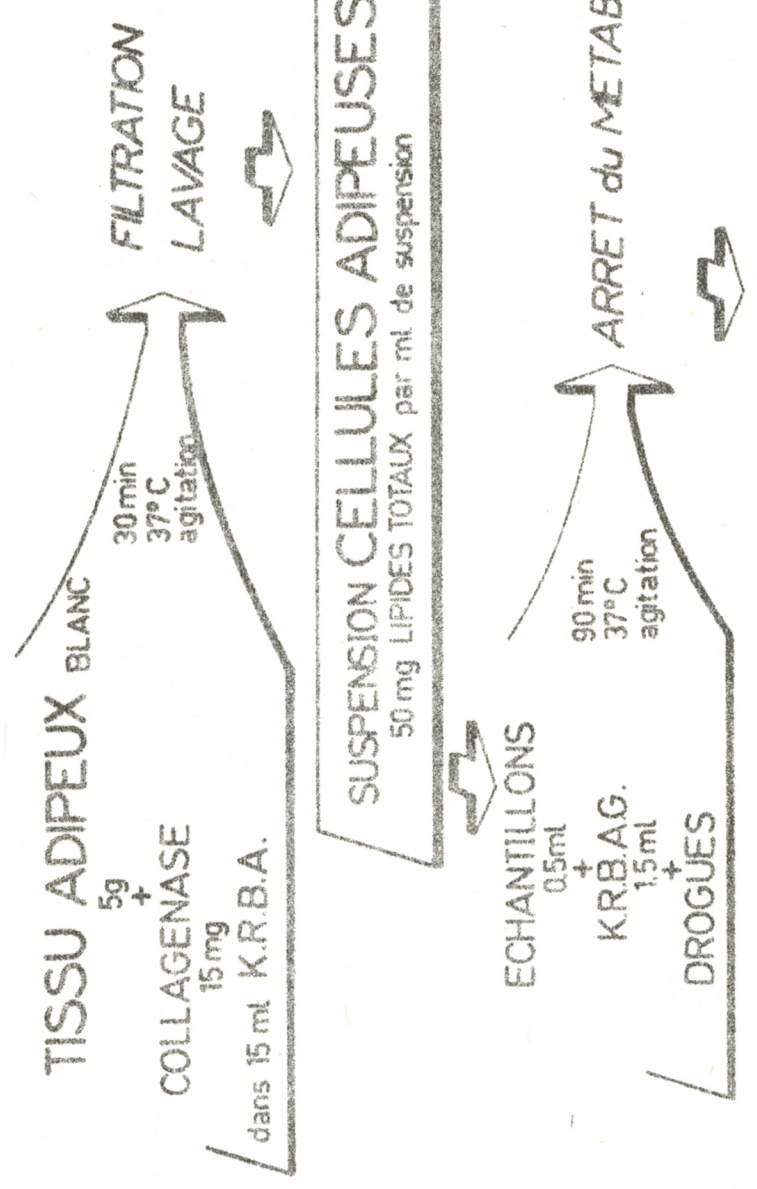
- Lors de l'étude de l'activité lipogénique des adipocytes isolés :
- * Le culot cellulaire est lavé la première fois avec 10 ml de KRBA non glucosé.
 - ** Des aliqots de 500 μ l sont distribués dans les tubes en polyéthylène contenant 1,5 ml de KRBA glucosé avec ou sans acétate (83 mg p. 100 ml) selon le précurseur étudié
 - *** L'incubation est réalisée sous agitation lente au bain-marie métabolique à 37°C pendant 180 min.

TECHNIQUE

LIPOLYSE

selon Rodbell (1964)

K: KREBS
R: RINGER
B: BICARBONATE Na
A: ALBUMINE
G: GLUCOSE



LIPOLYSE exprimée en μ mole de GLYCEROL pour 100 mg de LIPIDES TOTAUX

2°) Expression des résultats

La lipolyse est exprimée selon JEANRENAUD (1967) en micromoles de glycérol libéré dans le milieu d'incubation pour 100 mg de lipides totaux et pour 90 min d'incubation.

Remarque : Les lipides totaux de la suspension cellulaire sont extraits selon la méthode de DOLE et MEINERTZ (1960) et évalués par pesée.

C - MESURE DE L'ACTIVITE LIPOGENIQUE

Nous avons adapté la technique de VEZINNET (1976) pour déterminer l'activité lipogénique des adipocytes isolés. Au cours de l'incubation, l'adipocyte en présence du précurseur radioactif (glucose ou acétate) synthétise des lipides (acides gras, triglycérides, di et monoglycérides) et du glycérol dans lesquels sont incorporés des atomes de carbone venant des précurseurs radioactifs. Les lipides se partagent entre le milieu intracellulaire et le milieu d'incubation, ceci étant fonction de l'intensité de la lipolyse qui elle-même varie selon les conditions expérimentales. Pour éviter l'incidence du processus lipolytique, la totalité des lipides de l'essai a été extraite, c'est-à-dire les lipides intracellulaires et ceux qui auraient diffusé dans le milieu d'incubation. Les mesures effectuées traduiront ainsi le niveau vrai de la lipogénèse quel que soit le devenir de ces lipides dans leur répartition (intra et extracellulaire). Les adipocytes sont incubés dans le milieu KRBA glucosé et en présence de l'acétate de sodium 10 mM lorsque nous étudions la synthèse lipidique de novo à partir de l'acétate radioactif. Les précurseurs radioactifs (CEA, France) glucose ^{14}C (D - Glucose ^{14}C (U) uniformément marqué) et acétate $^{14}\text{C} - 1$ (sel de sodium marqué sur le seul carbone n°1) sont ajoutés à raison de 0,5 μCi par essai. Les effets de l'insuline, hormone stimulante de la lipogénèse, sont étudiés. Cette hormone est utilisée à la dose de 1 mUI/ml car au laboratoire CATANZANO (1984) a montré chez le lapin adulte l'efficacité métabolique de cette dose d'hormone qui induit une augmentation de la mise en réserve des triglycérides par les adipocytes du tissu adipeux périrénal à partir du glucose.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

	BLANC (μl)	TEMOIN (μl)	ESSAI (μl)
H ₂ O distillée	500		
KRBA	1500	1500	1500
Glucose ^{14}C (U) ou Acétate $^{14}\text{C} - 1$ 0,25 $\mu\text{Ci/ml}$	50	50	50
Suspension Cellulaire		500	500
Insuline 1 mUI/ml			50

1°) Extraction des lipides totaux et des acides gras

a) Extraction des lipides totaux

Les lipides totaux sont extraits selon FOLCH et alii (1957). A la fin de l'incubation, la suspension cellulaire est introduite dans 17 fois son volume d'un mélange chloroforme-méthanol (2 : 1, V/V). Les tubes sont vigoureusement agités puis laissés au repos pendant au moins 12 heures ; le mélange chloroforme-méthanol a précipité les protéines, rompu les complexes lipoprotéines et solubilisé les lipides. Les tubes sont réagités et la solution est filtrée sur verre fritté n°3 sous aspiration. Le filtrat est recueilli dans une ampoule à décantation de 60 ml dans laquelle on ajoute 12 ml d'une solution dite "saline" (Eau distillée 235 ml, méthanol RP 240 ml, chloroforme RP 15 ml, $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ 177,5 mg). L'ampoule est vigoureusement agitée ; puis laissée au repos et le mélange se sépare lentement en 2 phases au bout de 2 heures. La phase inférieure contenant les lipides est recueillie dans un erlenmeyer de 60 ml et mise à sec à l'étuve à vide (60 cm Hg, 50-60°C) pendant 12 à 18 heures jusqu'à poids constant. Nous poursuivons l'extraction des lipides par des solvants de moins en moins polaires pour éviter toute contamination par de l'eau contenant des précurseurs radioactifs hydrosolubles comme le glucose et l'acétate. Dans un premier temps, le résidu sec est repris à chaud par la solution de Dole (alcool isopropylique 4 V ; heptane 1 V ; H_2SO_4 RP 0,1 V) puis on ajoute successivement 5 ml d'heptane (solvant très peu polaire) et 5 ml d'eau distillée (solvant très polaire) ce qui assure la partition maximale lipidique par rapport à l'eau. Sur la phase heptanique supérieure hydrophobe, sont prélevés 2 aliquots de 3 ml qui sont mis à sec dans une étuve à vide (60 cm Hg, 60°C).

- Détermination pondérale et mesure de la radioactivité incorporée dans les lipides totaux : le résidu sec pesé, est solubilisé dans 10 ml de liquide scintillant (PPO = 5 g, POPOP = 0,3 g et toluène : 1 litre) puis la mesure de la radioactivité est faite au spectromètre à scintillation liquide (BECKMAN Ls 7000).

- Extraction des acides gras après évaporation dans une étuve à vide (60 cm Hg, 60°C).

b) Extraction des acides gras

L'extrait sec contenant les lipides totaux de la prise aliquote de 3 ml est saponifié par 10 ml de potasse éthanolique 0,6 N au bain-marie à 60°C pendant 2 heures. On ajoute ensuite 10 ml d'eau distillée dans laquelle se dissolvent les savons. Les lipides insaponifiables sont extraits par 3 ml d'heptane après agitation vigoureuse ; on laisse reposer et la phase heptanique supérieure est éliminée par aspiration. Sur la fraction aqueuse, on ajoute 1 ml d'HCl 12 N et on agite vigoureusement ; après 15 min, les acides gras sont extraits successivement par 5 et 3 ml d'heptane. Les phases supérieures heptaniques sont recueillies dans un tube de lecture de radioactivité préalablement taré. On procède à une évaporation sous vide à 60°C jusqu'à poids constant ; ceci nous permet de déterminer le poids des acides gras totaux de la prise. Le résidu sec contenant les acides gras totaux est dissous dans 10 ml de liquide scintillant et la radioactivité est mesurée au spectromètre à scintillation liquide.

LIPOGENESE

TECHNIQUE

suspension CELLULES ADIPEUSES isolées

TISSU ADIPEUX blanc 5g
+ COLLAGENASE 15 mg
+ KRBA 15 ml

30min
→
37°C
agitation /

filtration
→
lavage

50 mg LIPIDES TOTAUX par ml. de suspension

ECHANTILLONS 0.5 ml
+ KRBAG 15 ml
+ DROGUES

180min
→
37°C
agitation /

arrêt métabolique

à 0°C

extraction

LIPIDES TOTAUX
FOUCH + SOLUTION SALINE

PHASE LIPIDIQUE

mise à sec 60°C sous vide

DOLE + HEPTANE + EAU

+
D-GLUCOSE-¹⁴C(U)
ACETATE ¹⁴C-1

PHASE LIPIDIQUE

mise à sec 80°C sous vide

SAPONIFICATION

KOH éthanolique → 60°C → 120 min.

ACIDIFICATION → HCl

EXTRACTION ACIDES GRAS → Heptane
mise à sec 80°C sous vide

LIQUIDE de SCINTILLATION* (10ml)

COMPTAGE RADIOACTIVITE INCLUSE
dans les ACIDES GRAS (sur résidu sec)

LIPOGENESE EXPRIMEE EN N.MOLE

DE PRECURSEUR p.g. d'ACIDES GRAS

LIQUIDE de SCINTILLATION* (10 ml)

COMPTAGE RADIOACTIVITE
INCLUSE dans les LIPIDES TOTAUX
(sur résidu sec)

LIPOGENESE EXPRIMEE EN N.MOLE

DE PRECURSEUR p.g. de LIPIDES TOTAUX

* SOLUTION de SCINTILLATION :

Diméthyl POPOP + PPO + Toluène

Remarque :

Dans l'expression de nos résultats, nous pouvons considérer la radioactivité des lipides totaux comme le résultat des radioactivités incorporées au niveau du glycérol et des acides gras (libres et estérifiés). La différence entre la radioactivité des lipides totaux et celle des acides gras totaux est considérée comme le résultat de la conversion des précurseurs en glycérol. Selon O'HEA (1969) ; POTHOVEN et BEITZ (1973) les lipides insaponifiables ne représentent qu'un très faible pourcentage des lipides totaux synthétisés dans le tissu adipeux et nous pouvons donc négliger cette fraction lipidique dans nos résultats.

2°) Expression des résultats

Les résultats de la lipogenèse sont exprimés en cpm (coups par minute) par 180 min d'incubation ou en nanomoles de précurseurs incorporé ou converti par gramme de lipides totaux ou d'acides gras par heure d'incubation, selon le calcul suivant :

a) Cas de l'acétate de sodium

Activité spécifique : 55 mCi/mM soit 0,055 μ Ci/nM. Dans chaque tube, on met donc 0,5 μ Ci donc $\frac{0,5}{0,055} = 9,09$ nM. Dans chaque tube, on met donc 9,09 nM d'acétate marqué. Dans chaque tube, on met aussi 1,5 mg d'acétate non marqué. Le PM de l'acétate est égal à 82.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ M} \longrightarrow 82 \cdot 10^3 \text{ mg} \\ \text{d'où } 1 \text{ nM} \longrightarrow 82 \cdot 10^{-6} \text{ mg} \end{array}$$

$$\text{donc } 1,5 \text{ mg correspond à } \frac{1,5}{82 \cdot 10^{-6}} = 18300 \text{ nM}$$

$$\text{Acétate total dans chaque tube : } 18300 + 9,09 = 18309,09 \text{ nM}$$

$$\text{Le rapport } \frac{\text{acétate marqué}}{\text{acétate total}} = \frac{9,09}{18309,09} = \frac{1}{2014}$$

$$\text{D'où acétate total} = \text{acétate marqué} \times 2014$$

$$\text{D'autre part on sait que } 1 \mu\text{Ci correspond à } 2,22 \cdot 10^6 \text{ dpm.}$$

On a vu que 1 nM correspond à 0,055 μ Ci soit :

$$0,055 \times 2,22 \cdot 10^6 = 122100 \text{ dpm}$$

$$\text{nMoles d'acétate total incorporé} = \text{nMoles d'acétate marqué incorporé} \times 2014 \text{ soit :}$$

$$\text{nMoles d'acétate total incorporé} = \frac{\text{nombre de dpm}}{122100} \times 2014$$

De plus on a : poids des lipides totaux (LT) ou acides gras totaux (AG) en mg et une durée d'incubation de 3 heures. On a donc :

$$\text{Acétate total incorporé en nMoles par g de LT ou AG et par heure} =$$

$$\frac{\text{dpm}}{122100} \times 2014 \times \frac{1000}{P} \times \frac{1}{3}$$

Toutes simplifications effectuées, on obtient :

$$\text{nMoles d'acétate total incorporé p. g de LI ou AG et par heure} = \frac{\text{dpm} \times 5,5}{\text{P mg}}$$

Remarque 1 : Cette évaluation est satisfaisant car ce sont bien des molécules d'acétate qui sont incorporées dans les lipides.

Remarque 2 : Les comptages de radioactivité sont corrigés du rendement et de l'affaiblissement (quenching).

b) Cas du glucose

Activité spécifique : 250 mCi/mM soit 0,25 μ Ci/nM.

Dans chaque tube, on met 0,5 μ Ci donc $\frac{0,5}{0,25} = 2$ nMoles

Dans chaque tube, on met aussi 2 mg de glucose froid. Le PM du glucose est égal à 180

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mole} \longrightarrow 180 \text{ g} \\ \text{d'où } 1 \text{ nMole} \longrightarrow 180 \cdot 10^{-6} \text{ mg} \end{array}$$

$$\text{Donc 2 mg correspondent à } \frac{2}{180 \cdot 10^{-6}} \text{ mg} = 11111 \text{ nMoles}$$

Glucose total dans le tube : 11111 + 2 = 11113 nMoles

$$\text{Le rapport } \frac{\text{Glucose marqué}}{\text{Glucose total}} = \frac{2}{11113} = \frac{1}{5556}$$

D'où glucose total = glucose marqué x 5556

On a vu que 1 nMole correspond à 0,25 μ Ci soit :

$$0,25 \times 2,22 \cdot 10^6 = 555000 \text{ dpm}$$

nMoles de glucose total incorporé = nMoles de glucose marqué x 5556

$$\text{soit nMoles de glucose total incorporé} = \frac{\text{nombre de dpm}}{555000} \times 5556$$

Pour exprimer le résultat par rapport au gramme et par heure, on a :

$$\frac{\text{dpm} \times 5556}{555000} \times \frac{1000}{\text{P}} \times \frac{1}{3}$$

Toutes simplifications effectuées, on obtient :

$$\text{nMoles de glucose total incorporé p. g de LI ou AG et par heure} = \frac{\text{dpm} \times 3,337}{\text{P mg}}$$

Remarque : Afin de nous conformer à la réalité métabolique, nous devons affecter les résultats concernant l'incorporation de glucose dans les AG d'un coefficient multiplicateur de $\frac{2}{3}$. En effet, une molécule de glucose ^{14}C à six atomes de carbone marqués va donner deux molécules d'acide pyruvique à trois atomes de carbone marqués, soit après décarboxylation deux molécules d'acétate marquées sur les deux carbonnes.

1 glucose \longrightarrow 2 acides pyruviques \longrightarrow 2 acétates

6 C marqués

6 C marqués

4 C marqués

Il y a donc perte de deux carbones marqués par rapport à la molécule de départ, le résultat fourni par le calcul sera alors un résultat par défaut. Si l'on veut exprimer la lipogénèse en nMoles de glucose converties et pouvoir comparer l'utilisation du glucose à celle de l'acétate, il est donc nécessaire de multiplier les résultats concernant le glucose par le coefficient $\frac{6}{4}$ ou $\frac{3}{2}$.

IV - PREPARATION DES HEPATOCYTES ISOLES ET MESURE DE L'ACTIVITE LIPOGENIQUE IN VITRO

Les hépatocytes sont isolés selon BERRY et FRIEND (1969). Le foie est perfusé in situ avec un milieu Krebs Ringer bicarbonaté (KRB) dépourvu de calcium et contenant de la collagénase. L'absence de calcium est nécessaire pour une bonne dissociation des cellules et la collagénase permet la digestion de la trame conjonctive intercellulaire.

A - PREPARATION DES HEPATOCYTES PAR PERFUSION DU FOIE

1°) Chez l'animal adulte

Le lapin nourri ou à jeun depuis 48 heures est anesthésié par du pentobarbital (60 mg/kg/i.v.). Après laparotomie, deux incisions latérales permettent de bien dégager le foie. Le foie est perfusé par la veine porte avec un milieu KRB contenant de l'EDTA et héparine (à 37°C, pH 7,4) constamment oxygéné (O₂/CO₂ - 95/05) dépourvu de calcium et de collagénase. La veine cave inférieure est sectionnée au-dessous de la veine rénale droite afin de laver le foie sans provoquer de surpression. Le foie se décolore rapidement et devient brun clair. Les liquides de perfusion et de rinçage s'écoulent dans l'abdomen et sont éliminés. La cage thoracique est ensuite ouverte et une canule est introduite dans la veine cave inférieure en passant par l'oreillette droite du cœur. L'écoulement de la perfusion par cette voie est imposé en ligaturant la veine cave inférieure au-dessus de la veine rénale droite afin de recycler le liquide de perfusion. La circulation du perfusé est assurée par une pompe péristaltique foulante et aspirante dont le débit est maintenu à 60 ml/min afin que le volume du foie reste à peu près constant. Les différents milieux de perfusion (trois) sont maintenus à 39°C. Le choix du milieu de perfusion est discuté dans le chapitre 1 ; et à la suite de plusieurs essais, nous avons été amené à choisir cette composition de KRB : [NaCl 120 mM ; KCl 4,8 mM ; KH₂PO₄ 1,2 mM ; Mg SO₄ 1,2 mM ; CaCl₂ 2,5 mM ; NaHCO₃ 25 mM] pH final 7,4. Ce milieu est préparé extemporanément à partir d'une solution mère Krebs Ringer : NaCl 600 mM ; KCl 24 mM ; KH₂PO₄ 6mM ; Mg SO₄ 6mM et d'une solution mère de CaCl₂ 90 mM pouvant être conservées à + 4°C pendant une durée maximale de deux semaines. Dans la solution obtenue par dilution, on dissout le bicarbonate de sodium. Les solutions préparées sont utilisées dans cet ordre :

1 - Liquide de préperfusion : volume de 250 ml Krebs Ringer sans Ca⁺⁺ + héparine (10 UI/ml) + EDTA (2 mM). La durée de préperfusion est de 4 min ; le liquide n'est pas récupéré (circuit ouvert) et sert à éliminer les ions Ca⁺⁺ intercellulaires et le sang en évitant qu'il ne coagule.

2 - Liquide de rinçage : volume de 500 ml de Krebs Ringer sans calcium, ce liquide est en circuit ouvert ; la durée de perfusion est de 8 min : le liquide sert à éliminer les hématies qui restent dans le foie, l'héparine et l'EDTA.

3 - Liquide de perfusion : volume de 250 ml de Krebs Ringer sans calcium contenant la collagénase 0,02 % (50 mg/250 ml) ; circuit fermé. La durée de perfusion est de 15 min environ.

Le débit est toujours maintenu à 60 ml/min ; les milieux dont le pH est de 7,4 sont abondamment oxygénés (O_2/CO_2 - 95/05) et l'oxygénation est maintenue constante et très abondante pendant toute la durée de la perfusion et jusqu'à l'obtention de la préparation finale des hépatocytes isolés.

Dès que la surface du foie commence à se "déchirer", la perfusion est arrêtée. Le foie est rapidement prélevé, sa capsule ainsi que la vésicule biliaire sont enlevées et il est plongé dans 70 ml de KRB sans calcium où il est dilacéré en petits fragments qui sont placés dans un erlenmeyer en plastique. Ces morceaux sont agités pendant 10 min dans un bain-marie métabolique à agitation rapide à 38°C sous oxygénation (O_2/CO_2 - 95/05) continue, afin de disperser les cellules. La suspension cellulaire obtenue est filtrée sur un tamis en soie japonaise (filtre DURIEUX, Screen 12) puis sur un tamis plus fin en nylon (Nybolt, 48 HC). Le filtrat est récupéré dans des tubes à centrifuger en plastique et la centrifugation qui se fait à 30 g pendant une minute aboutit à la formation d'un dépôt de cellules au fond du tube et d'un surnageant contenant des débris de cellules, des fragments de membranes et le reste de collagénase. Ce surnageant est éliminé et le culot est repris par du KRB sans Ca^{++} . L'opération est répétée deux fois et la suspension est reprise finalement par du KRB additionné de calcium (2,5 mM).

La suspension cellulaire ainsi obtenue est refiltrée sur un tamis en nylon (Nybolt, 48 HC) et récupérée dans un erlenmeyer en plastique qui est agité dans un bain-marie (100 cycles/min) à 38°C, sous oxygénation (O_2/CO_2 - 95/05) pendant 10 min ; c'est la préincubation. Cette étape permet aux cellules de récupérer leurs potentialités en recouvrant, en outre, un niveau physiologique d'ATP et de K^+ dont le taux peut avoir été modifié au cours de la préparation des cellules. Nous procédons ensuite à la numération cellulaire aux tests morphologiques et métaboliques de viabilité avant de réaliser nos dilutions et de travailler avec un nombre constant de cellules.

Au terme de ces opérations, la suspension cellulaire diluée est utilisée pour les incubations en présence de précurseurs radioactifs pour la détermination de l'activité lipogénique au niveau de l'hépatocyte isolé chez des animaux placés dans des conditions physiologiques variées.

2°) Chez le nouveau-né et le jeune lapereau

La technique de perfusion du foie utilisée chez l'adulte n'est pas directement applicable au nouveau-né et au jeune lapereau car la veine porte est fragile et difficile à ligaturer, nous avons adapté une méthode mise au point chez le Rat par CALLIKAR et alii (1980) qui consiste à perfuser le foie dans le sens inverse de la circulation normale. Après anesthésie de l'animal par 3 mg de pentobarbital par 100 g de poids corporel par voie sous-cutanée et laparotomie, un cathéter est introduit dans la veine cave inférieure en dessous des reins et la perfusion est immédiatement commencée avec un débit de

6 ml/min. La veine porte est sectionnée immédiatement après la mise en route de la perfusion, permettant un libre écoulement du sang. Le milieu de perfusion n'est pas recyclé. Afin d'empêcher la diffusion du milieu de perfusion dans la circulation générale nous avons ligaturé la veine cave inférieure au niveau du coeur isolant ainsi la circulation hépatique. Le foie est lavé de son sang en moins d'une minute après le début de la perfusion. La rapidité de cette technique permet de perfuser simultanément deux à quatre animaux et d'obtenir une quantité suffisante de cellules hépatiques pour les études métaboliques envisagées. Après rinçage du foie, la perfusion est poursuivie en présence de collagénase à une concentration de 0,01 % pendant 15 min environ. A la fin de cette période, le foie est prélevé, dilacéré dans 40 ml de KRB sans Ca^{++} et agité pendant 10 min à 37°C sous oxygénation pour finir la dissociation des cellules. Après filtration (filtre DURIEUX, Screen 12 ; et en nylon, Nybolt 48 HC) la suspension cellulaire est centrifugée deux fois (2 min à 30 g) ; le culot de la première centrifugation est repris par environ 40 ml de KRB avec Ca^{++} (2,5 mM) ; le culot de la deuxième centrifugation est remis en suspension dans environ 20 ml de KRB avec Ca^{++} . La suspension cellulaire est à nouveau filtrée (filtre en nylon, Nybolt 48 HC) puis le volume est ajusté après numération à une concentration de 10^6 à $3 \cdot 10^6$ cellules/ml. Une préincubation de 10 à 15 min sous oxygénation est nécessaire aux cellules pour récupérer leurs potentialités fonctionnelles, aussitôt après les incubations sont commencées.

Remarques :

Le rendement en cellules hépatiques est faible, il a été évalué à 30 % du poids initial du foie par EL MANOUBI (1981) et à 30 à 40 % chez le nouveau-né comme chez le jeune lapereau de nos expérimentations. Ce facteur est donc limitant pour obtenir une grande quantité d'hépatocytes d'où la nécessité de perfuser simultanément au moins deux animaux.

Comme nous l'avons observé sur les coupes histologiques, le foie du lapereau à la naissance est très riche en cellules hématopoïétiques (Planche 11) nos préparations cellulaires contiennent donc non seulement des hépatocytes mais aussi des cellules de la lignée hématopoïétique. Celles-ci sont partiellement éliminées au cours des deux centrifugations mais représentent malgré tout 40 à 50 % du nombre total des cellules isolées à ces stades de développement selon EL MANOUBI (1981).

Avant d'effectuer toute étude métabolique nous nous assurons d'abord de la qualité de nos préparations cellulaires et ce, par des tests morphologiques (au bleu trypan à 0,2 %) et métabolique (mesure de la quantité de glucose synthétisée "in vitro" par les hépatocytes isolés). On considère que cette activité métabolique, néoglucogénèse à partir du lactate, donne une bonne indication de la viabilité des cellules obtenues.

B - MESURE DE L'ACTIVITE LIPOGENIQUE DES HEPATOCYTES ISOLEES

Cette technique est dérivée de celle utilisée au laboratoire pour l'étude de la lipogénèse des adipocytes. Nous avons utilisé le glucose ^{14}C (D - Glucose - ^{14}C (U) uniformément marqué), l'acétate ^{14}C - 1 (sel de sodium marqué sur le seul carbone n°1), le propionate ^{14}C - 1 (sel de sodium marqué

sur carbone n° 1) à raison de 0,5 μCi soit $1,85 \cdot 10^4$ becquerel par échantillon et l'eau tritiée $^3\text{H}_2\text{O}$ à raison de 250 μCi soit $9,25 \cdot 10^6$ becquerel par essai. Sur le processus de la lipogenèse nous avons fait intervenir l'insuline qui est l'hormone stimulante par excellence. Cette hormone lipogénique est utilisée aux doses de 0,1 ; 0,5 ; 1 mUI/ml de milieu d'incubation.

Les incubations des prises aliquotes de 1000 μl de suspension cellulaire sont réalisées à 37°C, dans des tubes en polyéthylène selon le protocole suivant :

	BLANC μl	TENDIN μl	ESSAI μl
KRB	2000	1000	1000
Glucose ^{14}C (U) ou Acétate ^{14}C 1 ou Propionate ^{14}C - 1 0,25 μCi p. ml	50	50	50
Suspension cellulaire hépatocytes (10^6 à 10^7 /ml)		1000	1000
Insuline (mUI/ml)			50

Le contenu de chaque tube est placé sous atmosphère gazeuse (O_2 - CO_2 95/05) et l'incubation est réalisée à 37°C pendant 180 min.

En présence d'eau tritiée $^3\text{H}_2\text{O}$ comme "précurseur" pour la synthèse de novo d'acides gras dans les hépatocytes nous avons adopté le protocole suivant :

* Préincubation (30 min)

	BLANC μL	TEMOIN μL	ESSAI μL
KRB	2000	1000	1000
Lactate de sodium 10 mM	40	40	40
Pyruvate de sodium 1 mM	40	40	40
Suspension cellulaire : hépatocytes (10^6 à 10^7 /ml)		1000	1000
Insuline 1 mUI/ml)			50
* Incubation			
$^3\text{H}_2\text{O}$ 250 μCi	10	10	10

Après préincubation, le contenu de chaque tube est enrichi d'un mélange (O_2 - CO_2 - 95/05) et l'incubation est réalisée à 37°C au bain-marie métabolique sous agitation lente pendant 180 min.

1°) Extraction des lipides totaux et acides gras

Pour les hépatocytes incubés en présence de glucose ^{14}C (U), d'acétate ^{14}C - 1 et de propionate de sodium ^{14}C - 1, les lipides totaux sont extraits selon FOLCH et alii (1957) de la même façon que pour les adipocytes.

Pour les hépatocytes incubés avec l'eau tritiée $^3\text{H}_2\text{O}$ les acides gras et les lipides totaux sont extraits selon WINDMUELLER et SPAETH (1966) et HARRIS (1975). Le contenu des fioles est transvasé dans des tubes en verre et la réaction est arrêtée par une centrifugation à 5000 g pendant 35 secondes. Le surnageant est éliminé et les lipides du culot cellulaire sont extraits selon FOLCH et alii (1957) mais ici le mélange chloroforme-méthanol est laissé pendant 12 heures en présence des cellules.

Après une nouvelle centrifugation, le surnageant recueilli dans un tube de verre est évaporé à sec dans une étuve à vide (60 cm Hg, 50-60°C). L'extrait sec est repris dans 10 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (2/1, V/V) et 2,5 ml d'une solution de $MgCl_2$ (4 mM/l). Quatre lavages avec 2,5 ml d'un mélange méthanol/eau (1/1, V/V)² sont nécessaires pour éliminer toute l'eau tritiée éventuellement solubilisée dans la phase lipidique. Après le quatrième lavage la radioactivité d'un aliquot de la phase supérieure est estimée pour vérifier qu'il ne reste plus d'eau tritiée contaminante. Deux aliquots sont alors prélevés et mis à sec dans une étuve à vide (60 cm Hg, 60°C).

- Détermination des lipides totaux : après évaporation et dissolution du résidu sec dans 10 ml de liquide scintillant, la radioactivité incorporée dans les triglycérides est lue au spectromètre à scintillation liquide.

- Extraction des acides gras : l'extrait sec contenant les lipides totaux de l'aliquot est saponifié par 10 ml de potasse éthanolique 0,6 N au bain-Marie à 60°C pendant 2 heures. On ajoute ensuite 10 ml d'eau distillée dans laquelle se dissolvent les savons. L'insaponifiable est extrait par 3 ml d'heptane après une agitation vigoureuse ; on laisse reposer et la phase supérieure heptanique est éliminée par aspiration. Sur la phase aqueuse on ajoute 1 ml d'HCl 12 N et on agite fortement ; après 15 min les acides gras sont extraits successivement par 5 et 3 ml d'heptane. Les phases supérieures heptaniques sont réunies, mises à sec et le résidu sec est repris par 10 ml de liquide scintillant (mesure au spectromètre à scintillation liquide).

2°) Expression des résultats

L'activité lipogénique des hépatocytes isolés exprimée en cpm (coups par min) peut être rapportée :

- au poids sec des cellules déterminé selon **KREBS et alii (1973)**.
- au nombre de cellules, soit 10^6 cellules
- à la quantité de protéines totales contenue dans 10^6 cellules vivantes, déterminée selon **LOWRY et alii (1951)**.
- au poids sec de lipides totaux contenus dans 10^6 cellules, extraits selon **FOLCH et alii (1957)**.

Nous avons préféré rapporter nos mesures aux protéines totales, considérant que celles-ci constituent le critère le plus représentatif.

Avec l'eau tritiée témoin de la synthèse des acides gras, la lipogénèse dans les hépatocytes isolés est exprimée en micromoles d'eau tritiée incorporée dans les acides gras par 10^6 cellules pendant 180 min d'incubation.

Remarque :

Correspondance entre les unités du système international de mesure de la radioactivité.

Une curie ou 1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ becquerel ou Bq

V - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

A - LE FOIE

- Au microscope photonique

Pour la recherche du glycogène, des fragments de foie sont fixés dans du bouin neutre ou dans du Dubosq Brazil (GABE, 1953) pendant 24 à 48 heures. Après inclusion dans la paraffine les blocs sont débités en coupes de 4 à 5 microns d'épaisseur qui sont traitées par l'acide périodique de Schiff (P.A.S) selon GABE (1953).

Pour la recherche des lipides, les fragments de foie sont fixés dans du formol à 10 % pendant 24 heures. La répartition des lipides dans les lobules hépatiques est observée sur des coupes à congélation libres de 20 à 50 microns d'épaisseur colorées par l'huile rouge (Oil Red) ou le Soudan III.

- Au microscope électronique

De très petits fragments de foie d'environ 1 mm^3 sont fixés dans la glutaraldéhyde à 2 % en solution dans le tampon de Sørensen à pH 7,2 ; cette fixation est suivie d'une postfixation osmique à 5 % dans ce même tampon pendant une heure. L'inclusion est faite à l'étuve à 56°C pendant 48 heures dans un mélange : résine Epon-Araldite. Les coupes sont réalisées après durcissement des capsules avec un ultramicrotome Reichert (OMU - 2) et colorées par l'acétate d'uranium (WATSON, 1958) et le citrate de plomb (REYNOLDS, 1963).

B - LE PANCREAS

Pour une étude au microscope photonique, des fragments de pancréas sont fixés dans du Bouin neutre et inclus dans la paraffine. Les coupes de 4 microns sont colorées par la paralaldéhyde fuscine (P.A.F.).

Pour l'étude ultrastructurale, les fragments de pancréas sont traités de la même façon que le foie.

C - L'INTESTIN

Pour la recherche des amines biogènes, des fragments d'intestin grêle sont fixés dans du Faglupagas (IMAI et alii, 1982) pendant au moins 24 heures. Des coupes à congélation de 10 à 20 microns sont immergées dans la solution de Faglupagas pendant 20 min à 24 heures et montées sur lames dégraissées.

Le montage est réalisé dans l'Entellan sans deshydratation préalable et l'observation est faite au microscope à fluorescence à 405 nm. L'acide glyoxalique contenu dans la solution de Faglupagas révèle les amines biogènes (fluorescence jaune pour la sérotonine et fluorescence vert-bleu pour les catécholamines).

PREPARATION DES SOLUTIONS UTILISEES

* Le liquide de Bouin :

Solution saturée d'acide picrique	75 ml
Formol du commerce	25 ml
Acide acétique	5 ml

* Le liquide de Dubosq Brasil ou Bouin alcoolique : fixateur qui se prépare extemporanément.

Alcool 80°	160 ml
Acide picrique	1 g
Acide acétique cristallisé	15 ml
Formol de commerce	60 ml

* Formol à 10 % :

Formol de commerce	10 ml
Eau distillée	90 ml

* Faglupegas :

Acide glyoxylique (Glyoxylsaure monohydrat, $C_2H_4O_4$)	2 g (en solution dans 50 ml de tampon phosphate à 0,2 M pH 7,4)
Paraformaldéhyde	20 ml (en solution à 20 % dans H_2O distillée)
Glutaraldéhyde à 25 %	2 ml
Solution saturée d'acide picrique	15 ml
Saccharose	15 g

Filter avant utilisation.

* Tampon phosphate à 0,2 M :

Na_2HPO_4	143,3 g
NaH_2PO_4	15,6 g
H_2O distillée	q.s.p. 2500 ml

* Tampon Sørensen 0,1 M :

$NaH_2PO_4 \cdot 1H_2O$	6,9 g dans 500 ml H_2O distillée (solution A)
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	8,89 g dans 500 ml H_2O distillée (solution B)

Pour obtenir une molarité de 0,1 M, mélanger 8 volumes de A et 42 volumes de B.

* Solution de glutaraldéhyde à 2 % :

Elle se prépare à partir d'ampoules de 5 ml à 70 % : 5 ml de glutaraldéhyde à 70 % + 9 ml H₂O distillée, on obtient 14 ml de glutaraldéhyde à 25 %. Cette solution peut être conservée quelques temps à + 4°C en flacon bien bouché et inactinique.

La glutaraldéhyde à 2 % :

Tampon phosphate (Na ₂ HPO ₄ et KH ₂ PO ₄) 0,05 M	46 ml
Glutaraldéhyde à 25 %	4 ml
Saccharose	1,35 g

La solution de glutaraldéhyde à 2 % se conserve à + 4°C en flacon inactinique (éventuellement fractionner par 5 ml et stocker au congélateur à - 20°C.

* Acide périodique de Schiff (A.P.S.) :

Acide périodique à 0,5 %

Réactif de Schiff : - broyer 7,6 g de métabisulfite de sodium et 4 g de fuscine diamant (acide)

- Ajouter 400 ml HCl 0,15 N (500 ml H₂O distillée + 6,5 ml HCl)

- Laisser reposer une nuit à l'obscurité

- Le lendemain ajouter environ 12 spatulées de charbon activé.

Agiter et laisser reposer quelques instants.

- Filtrer, on doit obtenir une solution eau de roche ou légèrement jaune sinon recommencer l'adsorption.

Métabisulfite de sodium :

Eau distillée	90 ml
HCl N	5 ml
Métabisulfite de sodium à 10 %	5 ml

* Le Soudan III et l'huile rouge ou Oil Red :

Ces colorants servant à la mise en évidence des lipides sont mis chacun à saturation dans l'alcool à 70 °, préparés extemporanément et filtrés avant utilisation.

* La fuscine paralaldéhyde :

Elle est préparée selon GABE (1953) avec quelques modifications apportées par PETKOV (1960) :

Eau distillée	200 ml
Fuscine basique cristallisée	1 g

- faire bouillir le mélange 1 à 2 min

- Refroidir jusqu'à la température de 20°C

-Filtrer la solution obtenue sur 2 ml de paralaldéhyde

HCl pur

2 ml

- Le filtrat est conservé à l'obscurité pendant 24 heures

- Refiltrer

- La poudre recueillie est mise à l'étuve à 60°C pendant 48 heures

- La solution mère est préparée en mettant cette poudre dans 100 ml d'alcool à 70°

- Conservation à + 4°C

- Le colorant est préparé extemporanément dans les proportions suivantes :

- . solution mère : 10 ml
- . Alcool à 70° : 30 ml
- . Acide acétique concentré : 0,4 ml

* Acétate d'uranium :

Mélanger pendant 30 min 1,25 g d'acétate d'uranyle et 25 ml d'eau distillée, après filtration, la solution est conservée à l'obscurité et à + 4°C ; au moment de la coloration, la solution mère est diluée dans l'alcool absolu (V/V).

* Citrate de plomb :

Mélanger pendant 30 min 661 mg de nitrate de plomb, 880 mg de citrate de sodium et 15 ml d'eau distillée jusqu'à obtention d'une solution d'un blanc laiteux. Ajuster le volume à 25 ml puis ajouter goutte à goutte de la soude N jusqu'à obtenir une solution transparente ayant un pH égal à 12.

* Résine-Epon-Araldite :

DDSA (Dodécényl-succinique anhydride)	60 ml
Epikote 812 (éther glycidique 100)	25 ml
Araldite M	20 ml

- Agiter le mélange pendant 30 min (très lentement)

- Ajouter 4 ml de DMP 30 [2,4-tri (diméthylamino-méthyl) phénol]

- Agiter pendant 30 min (lentement)

- Répartir en petits compte gouttes plastiques et mettre immédiatement à - 20°C.

VI- PRESENTATION DES RESULTATS

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de tableaux récapitulatifs, de figures et de photographies. Les valeurs moyennes sont affectées de l'erreur standard à la moyenne (E.S.M.). Les comparaisons entre les diverses données sont réalisées à l'aide des tests statistiques non paramétriques de MANN-WHITNEY et de WILCOXON et paramétriques du T de Student.

VII - PROVENANCE DES PRODUITS HORMONAUX ET DIVERS AGENTS PHARMACOLOGIQUES UTILISES AU COURS DE CES TRAVAUX :

Héparine : CHOAY

Synacthène : β^{1-24} tétracosactide (CIBA)
Insuline : Rabbit Insulin (NOVO Industrie)
Isoprotérénol : IPRD (Sigma)
Albumine : Albumine bovine fraction V (SIGMA)
Collagénase : Collagenase Worthington Biochemical Corporation
Glycérol : Glycérol bidistillé, d = 1,23, MERCK
Hydrate d'Hydrazine : SCHUCHARDT MUNCH
Glycocolle : MERCK
Mg Cl₂ : MERCK
ATP
NAD
GK et GDH → Enzymes } BOEHRINGER MANNHEIM
Eau tritiée (3 H₂O) : New England Nuclear (N.E.N.)
Propionate de sodium (¹⁴C - 1) : AMERSHAM
Glucose ¹⁴C (U) } C.E.A.
Acétate de sodium (¹⁴C - 1) }
Cholestérol : réf. 231-347 }
Triglycérides : réf. 126-039 } Kit BOEHRINGER MANNHEIM
Glucose-oxydase peroxydase (G.O.D.) réf. 166-391 }
Lipides totaux réf. 61-402 : Kit BIOMERIEUX
EDTA (éthylènediamine tetraacetic acid) : SIGMA
Bleu de Nil (sulfate) : PROLABO
Oil Red : PROLABO
Nitro-bleu de tétrazolium : SIGMA, grade III n° 6876, PM : 817,7
DMF : SIGMA, N° D 6149, PM : 249
PPO (2,5 - Diphenyloxazole) : PACKARD
POPOP (Diméthyl 1,4 - bis [2 - (4 - méthyl 5 - Phényloxazole)] : PACKARD

Remarque : les principales abréviations utilisées dans la légende des figures histologiques :

A.G : appareil de Golgi
c.h. : cellule hématopoïétique
E.P. : espace porte
E.D. : espace de Disse
F.C. : fibre de collagène
Gly : glycogène

H : hépatocytes

h. : hématies

K : cellule de Kupffer

L : lipides

Me : mégacaryoblaste

m : mitochondrie

N : noyau

nu : nucléole

R.e.g. et R.E. : réticulum endoplasmique granulaire

VCL : veine centrolobulaire

h.u. : heure universelle.

CHAPITRE I

ETUDE DE LA LIPOGENESE DE L'HEPATOCYTE ISOLE CHEZ LE LAPIN ADULTE

- I - PREPARATION DES HEPATOCYTES ISOLES CHEZ LE LAPIN
- II - ETUDE DE LA LIPOGENESE
- III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

CHAPITRE I

I - PREPARATION DES HEPATOCYTES ISOLES CHEZ LE LAPIN

A - RAPPEL HISTORIQUE

- 1°) Les paramètres physicochimiques
- 2°) La culture cellulaire des hépatocytes
- 3°) Qualités physiologiques des hépatocytes isolés
 - a) Observation au microscope photonique : colorations vitales
 - b) Viabilité métabolique : l'hépatocyte et la néoglucogénèse
- 4°) L'hépatocyte et la lipogénèse
 - a) La lipogénèse vraie
 - b) Accumulation lipidique ou stéatose ; origine :
 - Stéatose d'origine nutritionnelle
 - Stéatose d'origine endocrinienne
 - Stéatose d'origine pharmacologique
 - Stéatose d'origine infectieuse

B - DESCRIPTION CRITIQUE DE NOTRE TECHNIQUE

- 1°) Le traitement "in situ"
 - 2°) Le traitement "in vitro"
- a) Contrôles morphologiques
 - b) Contrôle métabolique

C - CHOIX DE L'EXPRESSION DES RESULTATS

- 1°) Mesure des protéines totales
- 2°) Détermination du poids sec des cellules et des lipides totaux
- 3°) Détermination du poids frais de 10^6 cellules
- 4°) Influence du nombre d'hépatocytes sur la lipogénèse
- 5°) Lipogénèse et durée d'incubation des hépatocytes isolés

II - ETUDE DE LA LIPOGENESE "IN VITRO" CHEZ LE LAPIN ADULTE

- A - LES PRECURSEURS DE LA LIPOGENESE DE L'HEPATOCYTE
- B - EFFET DE L'INSULINE SUR LA LIPOGENESE DE L'HEPATOCYTE
- C - CONCLUSION

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

- A - L'HEPATOCYTE EST-IL UN SITE DE LA BIOSYNTHESE "DE NOVO" DES ACIDES GRAS CHEZ LE LAPIN ?
- B - REMARQUES SUR LES ROLES RESPECTIFS DU FOIE ET DU TISSU ADIPEUX DANS LA SYNTHÈSE ET LE STOCKAGE DES LIPIDES
- C - DES EFFETS DE L'INSULINE SUR LA LIPOGENESE HEPATIQUE

I - PREPARATION DES HEPATOCYTES ISOLES CHEZ LE LAPIN

A - RAPPEL HISTORIQUE

1°) Les paramètres physicochimiques

Le foie occupe une position centrale dans le métabolisme ; sa taille, sa structure, son homogénéité le rendent propre aux investigations biochimiques. Cependant, la présence de 40% environ de cellules non parenchymales (DAOUST, 1958), la difficulté d'obtenir beaucoup d'échantillons identiques à partir d'un foie, l'impossibilité de réaliser des traitements expérimentaux simultanés sur un même foie, sa durée de vie limitée in vitro (8 à 10 heures) posent certains problèmes. Des tentatives d'isolement et purification de cellules hépatiques intactes ont été faites pour surmonter cet ensemble de difficultés. Des traitements physiques et chimiques ont permis de séparer le tissu hépatique en une suspension de cellules isolées malheureusement avec un très grand pourcentage de cellules altérées.

ANDERSON (1953) décrit, le premier, une méthode de préparation de cellules isolées de foie de rat avec un rendement de 40 %. Cet auteur provoque une distension du foie en perfusant l'organe par la veine porte sous une pression élevée ; le foie est ensuite découpé en petits fragments qui sont doucement broyés et centrifugés. Les cellules ainsi dissociées par ces traitements mécaniques sont examinées ; d'une part elles ne montrent aucune activité métabolique ou du moins très peu (absence de synthèse de glucose en présence d'un substrat gluconogénique) d'autre part elles sont colorées par un colorant vital comme le bleu trypan ; ainsi préparés ces hépatocytes ont perdu tous leurs complexes enzymatiques du cytoplasme pendant la préparation.

On constate que la séparation des cellules ne faisant intervenir que des moyens mécaniques s'avère inadéquate pour obtenir des cellules en bon état fonctionnel, c'est alors que les recherches s'orientèrent vers une séparation par voie chimique (enzymatique).

HOWARD et alii, en 1967 obtiennent chez le rat la première préparation d'hépatocytes isolés en perfusant le foie avec une solution de **collagénase** à 0°C ; le foie est ensuite découpé et incubé à 37°C dans le même milieu enzymatique. Par cette technique le nombre de cellules vivantes disponibles est relativement faible et par conséquent de bons résultats fonctionnels sont difficiles à obtenir (MURTHY et PETERING, 1969; GALLAI-HATCHARD et GRAY, 1971 ; CRISP et POGSON, 1972).

BERRY et FRIEND (1969) avec une solution de collagénase maintenue à 37°C obtiennent des suspensions de cellules hépatiques non altérées toujours en perfusant le foie de rat dans le sens physiologique (veine porte → foie).

Actuellement, seuls des milieux avec collagénase sont utilisés pour perfuser le foie de rat ou de lapin afin d'obtenir des cellules isolées non altérées et fonctionnelles (SEGLÉN, 1972 b). La collagénase utilisée pour la dispersion des cellules hépatiques est extraite d'une bactérie anaérobie (*Clostridium histolyticum*)*. Elle a une activité protéolytique et elle doit être hautement purifiée car selon GARRISON et HAYNES (1973), HOWARD et alii (1973) et SEGLÉN (1973 b) les effets de la collagénase

sur la dispersion des cellules varient en fonction des contaminats protéolytiques qu'elle contiendrait.

Dans les perfusions de foie, la concentration de la collagénase doit être comprise entre 10 et 80 mg p. 100 ml de milieu ; la quantité optimale pour une bonne séparation des hépatocytes est selon SEGLEN (1973) de 0,05 % . Cette quantité varie avec l'activité spécifique de l'enzyme (SEIFTER et HARPER, 1970).

Pour PETERKOFESY et alii (1971), bien que hautement purifiée, la collagénase du commerce contiendrait des contaminats protéolytiques.

Remarque :

L'existence des collagénases a été décrite pour la première fois à l'Institut Pasteur (Paris) par WEINBERG et SEGIN sur la gangrène, infection causée par une bactérie anaérobie "Le Clostridium histolyticum" chez les soldats blessés lors de la guerre de 1914-1918.

Outre la collagénase, le calcium intervient dans la séparation des cellules. D'une part le calcium intervient en favorisant la cohésion intercellulaire et d'autre part il favoriserait l'action de la collagénase. Ces deux propriétés antinomiques expliquent le débat entre les auteurs, certains voulant renforcer l'action de l'enzyme par addition de calcium, d'autres au contraire chélatent le calcium pour réduire l'adhésion réciproque des cellules. Ainsi d'après SEGLEN (1973 a) le calcium est nécessaire à une bonne dispersion des cellules car la collagénase serait une enzyme Ca^{++} dépendante ; l'apport de Ca^{++} est alors indispensable pendant la perfusion pour augmenter l'activité protéolytique et accélérer le processus de digestion de la trame de collagène afin de séparer les hépatocytes les uns des autres (SEGLEN, 1974 b). Inversement l'utilisation d'un chélateur d'ions Ca^{++} dans la perfusion montre le rôle de cet oligoélément dans la cohésion et l'adhésion des cellules ; mais dans ce cas, SEGLEN (1974 b) a montré l'inactivité totale de la collagénase dans la dispersion des cellules. Par contre des observations faites par ce même auteur ont montré qu'une concentration optimale de 5 mM de Ca^{++} était nécessaire pour stimuler les effets de la collagénase.

Le rôle joué par les ions Ca^{++} dans la cohésion des cellules est connu depuis les travaux de RINGER en 1890 sur une algue, et a été retrouvé depuis sur bien d'autres cellules par des auteurs comme MOSCOVA et alii (1965) et GINGELL et alii (1970). AMSTERDAM et JAMIESON (1974) pensent que le calcium jouerait le même rôle que les particules intercellulaires au niveau d'un desmosome augmentant ainsi l'adhérence des cellules. Si on ne tient compte que de ces observations on commettrait donc une erreur en ajoutant du calcium dans le milieu de perfusion du foie. Ainsi SEGLEN (1972 b) propose de préperfuser le foie avec un milieu sans Ca^{++} contenant même en plus un chélateur de ce cation soit de l'EDTA ou de l'EGTA (0,5 mM) ; puis on perfuse le foie avec une solution de collagénase en présence de calcium 1 mM (SEGLEN, 1973 a) ; cet apport de calcium est désormais sans conséquence car l'élimination du calcium de l'espace intercellulaire, lors de la perfusion, a produit des altérations définitives dans la structure des protéines intercellulaires (COMAN, 1954).

Le rôle joué par le calcium dans l'adhésion des hépatocytes a été décrit aussi chez la souris par MODJANOVA et MALENKOV (1973).

Toutefois les avis sont partagés quant à la présence ou l'absence du calcium dans le milieu de perfusion du foie ; selon les travaux de ZAHLTEN et alii (1973) et ZAHLTEN et STRATMAN (1974) l'addition de Ca^{++} est "nuisible" pour la séparation des cellules. En revanche pour certains auteurs (BERG et BOMAN, 1972 ; BARNABEI et alii, 1974 ; BAUR et alii, 1975 ; CHRISTOFFERSEN et BERG, 1974 ; EDWARDS et FAIN, 1974 ; NILSSON et alii, 1974 ; VON BAHR et alii, 1974 ; WILLIAMS et GUNN, 1974) le calcium serait indispensable dans le milieu de perfusion d'un organe en présence de collagénase. D'après ces mêmes auteurs, les cellules isolées avec une préperfusion sans Ca^{++} puis une perfusion avec collagénase et Ca^{++} , retiennent mieux les ions K^+ et ont un potentiel de membrane plus élevé que celles préparées à partir d'un milieu dépourvu de calcium.

TOLBERT et FAIN (1974) ont montré que les hépatocytes isolés ont besoin de ce cation bivalent pour réaliser la néoglucogénèse à partir d'un substrat comme le lactate ; le calcium stimulerait alors la respiration basale de ces cellules (HOWARD et alii, 1973 ; DUBINSKY et COCKRELL, 1974). Les avantages des ions Ca^{++} ont également été observés lors de l'isolement des cellules du pancréas exocrine (AMSTERDAM et JAMIESON, 1972) et des néphrons du rein (BALZER et alii, 1974).

Pour notre part, lors de l'isolement des hépatocytes de lapin, nous avons adapté la méthode de BERRY et FRIEND (1969) modifiée par MARTIN (1979) c'est-à-dire que nous préperfusionnons le foie en présence d'EDTA (2 mM) et nous effectuons une perfusion de l'organe avec une solution de collagénase sans calcium. Nous avons fait quelques essais de perfusion du foie en présence de calcium, mais si nous avons obtenu une très bonne dispersion des cellules, en revanche le taux de mortalité était très élevé d'où notre choix d'un milieu de perfusion sans calcium.

L'isolement des hépatocytes dans un bon état fonctionnel est sous l'influence d'autres paramètres notamment le volume, la composition, le pH et la température du milieu de perfusion. La célérité pour la mise en place de la perfusion (INGLEBRETSSEN et WAGLE, 1972 ; ZAHLTEN et STRATMAN, 1974) est très importante aussi et la rapidité d'intervention de l'expérimentateur lors de la canulation de la veine porte permet d'éviter toute perte de sang qui entraînerait l'asphyxie des cellules. Ces facteurs étant respectés, nous ne devons pas ignorer l'importance du débit et de la pression selon lesquels le milieu de perfusion est distribué dans le foie.

L'activité de la collagénase est optimale à pH 7,5 ; selon SEGLEN (1973 a) le pH du milieu ne doit pas être inférieur à 7,3. Le foie acidifiant très rapidement le milieu, il est donc nécessaire d'introduire dans le circuit un système pouvant maintenir le pH à un niveau constant pendant toute la durée de la perfusion (10 à 15 min selon le poids du foie). Plusieurs méthodes ont été proposées à la suite de travaux multiples : un pHmètre à injection continue de NaOH dans le milieu (SEGLEN, 1972 a, b) ; un milieu bicarbonaté sous gazage continu - O_2/CO_2 , 95/05 (BERG et alii, 1972) ; un tampon organique comme le N - 2 - hydroxyéthylpipérazine - N' - 2 - éthanesulfonic (HEPES) à une concentration élevée (SEGLEN, 1973 b). Ces trois méthodes sont acceptables mais la plus simple et la plus avantageuse est l'utilisation du tampon HEPES (SEGLEN, 1976). En effet, la première

solution contrôlant le pH demande un équipement spécial onéreux bien que la soude soit d'un prix plus modéré que le tampon organique. Dans le deuxième cas, l'oxygénation du milieu est bien assurée mais la formation de bulles d'air peut entraîner l'éclatement des petites veinules hépatiques. Malgré cet inconvénient, de ces trois techniques rapportées par la littérature nous avons choisi l'utilisation d'un milieu Ringer bicarbonaté sous oxygénation continue (O_2/CO_2 - 95/05) car nous pensons que l'oxygénation du milieu a une importance prépondérante pour les cellules. En effet les travaux de SEGLEN (1976) attribuent une grande importance à l'oxygénation du milieu pendant toute la durée de perfusion mais d'après cet auteur, le temps de perfusion n'excédant pas 30 min, les cellules peuvent tolérer malgré tout une courte période d'anoxie. L'activité respiratoire d'un foie perfusé en anoxie peut être restaurée après réoxygénation (SEGLEN, 1973 b) et les cellules isolées dans ces conditions d'hypoxie partielle seraient pleinement viables. Cependant, un manque d'oxygène peut induire d'importantes perturbations sur le métabolisme cellulaire car d'après SEGLEN (1973 d, 1974 a) les effets ne sont pas toujours immédiats.

En conclusion, la tolérance partielle au manque d'oxygène d'une cellule doit tenir compte des conditions métaboliques auxquelles la cellule sera soumise et aussi des investigations ultérieures ; ainsi l'oxygénation* est primordiale si on veut étudier le complexe enzymatique de la chaîne respiratoire, la néoglucogénèse, et dans notre cas la lipogénèse.

* Remarque :

Madame BROER (du laboratoire du Professeur ROSSELIN de l'Unité INSERM 55, Hôpital St Antoine - Paris) qui nous présenta la technique de préparation des hépatocytes chez le rat, nous recommanda d'assurer la meilleure et la plus importante oxygénation possible. De même Monsieur JEANBLIN (de l'E.N.V. Lyon) nous conseilla aussi de privilégier l'oxygénation des cellules.

Le débit de la perfusion est un paramètre conditionnant le niveau d'oxygénation. Ainsi chez le rat un débit de 40 à 50 ml/min avec oxygénation continue est nécessaire pour perfuser le foie avec une solution de collagénase sans anticoagulant et, pour des raisons économiques le milieu est régénéré (SEGLEN, 1972 a ; 1973 b). Toutefois certains auteurs travaillent sans oxygénation forcée, ils réduisent alors le débit à 5 ml/min et ne régénèrent pas la solution qui est éliminée après son passage par le foie, circuit dit "ouvert" (CAPUZZI et alii, 1971, 1974 et QUISTORFF et alii, 1973). QUISTORFF et alii (1973) proposent un débit lent lors de la perfusion car selon SCHIMASSEK (1968) les érythrocytes présents dans le foie augmentant la viscosité du milieu, ceci favoriserait une pénétration plus uniforme et homogène de la collagénase dans tout le tissu. Le débit et par suite la pression du milieu arrivant dans la veine porte ne doivent en aucun cas être élevés, car ceci provoquerait un oedème du foie entraînant des déchirures de la capsule hépatique ainsi que des membranes cellulaires.

Ainsi chez le lapin comparativement aux rapports de taille avec le rat, le débit est de 60 à 70 ml/min (MARTIN, 1979 ; CALLIKAN, 1980 ; EL MANOUBI, 1981). Afin d'éviter toute embolie entraînant une hypertension

pouvant déchirer les veinules, tous les milieux doivent être préalablement filtrés. Pour notre protocole expérimental, nous avons choisi un débit moyen de 60 ml/min et toutes les solutions sont filtrées à travers un tamis : filtre HC 48 microns de diamètre.

La température du milieu de perfusion doit être maintenue constante à 37°C (SEGLEN, 1976). Nos milieux sont placés dans un incubateur thermostaté à 39,5°C et ainsi les liquides de préperfusion et perfusion atteignent le foie à une température de 37°C compte tenu des circuits non isolés thermiquement.

Le foie peut être soit "in situ" et dans ce cas les veine porte et veine cave sont respectivement canulées pour établir un circuit fermé permettant une régénération du milieu (MORTIMORE, 1961), soit hors de l'animal et dans ce cas, seule la veine porte est canulée (SEGLEN et JARVELL, 1969).

Pour notre part, le foie est perfusé "in situ" avec 250 ml de KRB sans Ca^{++} en présence de collagénase (0,02 % soit 50 mg) à pH 7,5 sous une température de 37°C et en oxygénation continue (O_2/CO_2 - 95/05).

Le milieu de perfusion doit remplacer le sang et pour cela, il doit être le plus proche possible du milieu interstitiel afin que les cellules ne soient pas altérées (SEGLEN, 1972 a).

De nombreux auteurs rapportent un effet favorable de l'albumine quand elle est présente dans le milieu de perfusion et selon HOLLER et BREUR (1974) l'albumine induit une meilleure distribution de l'oxygène lors de la perfusion. Cependant les avis sont partagés ; pour KREBS et alii (1973) l'albumine diminuerait l'activité des enzymes protéolytiques et ces auteurs pensent que la capacité de consommation d'oxygène, la néoglucogénèse et la synthèse de l'urée sont identiques en présence ou en absence d'albumine. De même ZALESKI et alii (1977) perfusent le foie de rat et incubent les hépatocytes isolés avec un milieu dépourvu d'albumine. Toutefois il semble qu'en absence d'albumine la suspension cellulaire forme des agrégats qui lors des centrifugations, préincubation et incubation s'accrochent aux parois des tubes et par suite l'activité métabolique cellulaire est altérée. D'autre part l'albumine serait nécessaire dans la suspension cellulaire pour capter les acides gras libres et la bilirubine qui ont des potentialités toxiques pour les cellules. Les concentrations d'albumine utilisées sont variables selon les auteurs : 3 %, 2 % et 1,5 % sont utilisées pour perfuser le foie de rat respectivement par WINDMUELLER et alii (1966), DICKSON et alii (1977), INGEBRETSEN et WAGLE (1972). CAPUZZI et alii (1974) utilisent de l'albumine bovine et de l'albumine foetale de chat dans des proportions de 5 % pour isoler des hépatocytes d'oiseaux. Pour l'isolement de nos hépatocytes chez le lapin, nous avons essayé des milieux dépourvus ou pourvus d'albumine bovine fraction V à la concentration de 3,5 % ; les résultats métaboliques étant les mêmes dans les deux cas, nous avons alors préféré travailler avec du Krebs Ringer bicarbonaté sans albumine, ce qui entre autres avantages permet d'éviter toute formation de mousse lors de l'arrivée de l'oxygène.

Dans le Krebs Ringer bicarbonaté sans calcium servant à la pré-perfusion nous ajoutons de l'héparine à 10 UI/ml (MARTIN, 1979) et de l'EDTA à 2 mM (BERRY and FRIEND, 1969). Les conditions nutritionnelles

(animaux à jeun ou nourris), l'âge de l'animal, le stade d'évolution du foie n'influent pas sur la viabilité des hépatocytes isolés par rapport à la méthodologie qui représente le paramètre principal dans la préparation des cellules (BISSEL et alii, 1973 ; BONNEY et alii, 1973, 1974).

Les cellules isolées de foie ont une durée de vie très limitée qui ne dépasse pas 24 heures, et au bout de quelques heures, leur activité métabolique diminue considérablement. Ainsi, plusieurs tentatives ont été faites pour améliorer cette durée de vie et BONNEY (1974), BISSEL et alii (1973) ont rapporté des méthodes pour conserver "in vitro" les hépatocytes isolés de rat pendant plusieurs jours mais en culture et en évitant leur différenciation. DICKSON et FOGSON (1977) en employant du sérum d'embryon de veau dans le milieu d'incubation ont réussi à maintenir les hépatocytes isolés de rat dans un état physiologique pendant des périodes allant jusqu'à 8 heures et au cours des 8 heures suivantes ils n'ont observé qu'une légère altération.

2°) La culture cellulaire des hépatocytes

La culture des hépatocytes isolés de foie adulte est considérée comme difficile pour deux raisons : d'une part la méthodologie ne permet pas toujours d'obtenir une quantité significative de cellules isolées intactes, d'autre part on note parfois une incapacité des cellules isolées du foie adulte à proliférer. Le premier problème peut être surmonté en prenant beaucoup de précautions par contre le deuxième est biologique ; normalement un foie adulte est formé d'un tissu dont les cellules ne prolifèrent plus pendant des centaines de jours (GRISHAM, 1973), alors qu'on peut observer leur croissance "in vitro". Ainsi la croissance linéaire des hépatocytes isolés de rat a été observée chez le fœtus (LEFFERT et alii, 1972), chez le jeune (WILLIAMS et alii, 1971 ; DIAMOND et alii, 1973 ; BAUSCHER et SHAFFER, 1974) et chez l'adulte (COON, 1968 ; CASANELLO et GERSCHENSON, 1970 ; SCHATZ, 1974). Dans de nombreux cas, les hépatocytes en culture montrent une dégénérescence maligne de façon spontanée (KATSUTA et alii, 1965 ; OSHIRO et alii, 1972 ; BOREK, 1972).

Depuis l'introduction de la collagénase dans la méthode de dissociation des hépatocytes (HOWARD et alii, 1967 ; BERRY et FRIEND, 1969) de nombreux laboratoires essayent de faire des cultures d'hépatocytes de rat adulte (IYPE, 1972 ; ALWEN et alii, 1972 ; BONNEY et alii, 1974 ; SEGLEN, 1974 c ; WILLIAMS et GUNN, 1974).

Dans des conditions qui semblent optimales, il n'a pas été possible d'obtenir d'activité métabolique de ces cellules en culture et de plus, au bout d'une à deux semaines un phénomène de lyse se produit (SEGLEN, 1976). Des travaux très récents de BEGUE et alii (1986) ont montré que les co-cultures d'hépatocytes et de cellules épithéliales d'origine animale ou humaine permettent de maintenir pendant plusieurs mois les hépatocytes hautement fonctionnels et ce, en leur recréant un environnement physiologique. Par suite nous avons préféré, à la culture d'hépatocytes, l'étude des hépatocytes isolés "in vitro".

successifs ; d'autre part, elles s'adsorbent aux parois des tubes à centrifugation (BISSEL et alii, 1972).

b) Viabilité métabolique : L'hépatocyte et la néoglucogenèse

Ce test, couramment utilisé par certains auteurs (CALLIKAN, 1980 ; MARTIN, 1979 ; EL MANOUBI, 1981 ; AZOUT et alii, 1983, 1984 ; ZALESKI et BRYLA, 1977 ; ZALESKI et alii, 1981) chez le Rat et chez le Lapin, représente un des meilleurs critères de l'activité métabolique des cellules mesurée par la quantité de glucose synthétisée et la linéarité de cette synthèse au cours des deux premières heures d'incubation.

On considère que la néoglucogenèse à partir du lactate donne une bonne indication de la viabilité cellulaire. Cette voie complexe consommatrice d'énergie nécessite l'intégrité fonctionnelle de la respiration cellulaire et une production continue d'ATP. De plus, les enzymes de la néoglucogenèse étant situées de part et d'autre de la membrane mitochondriale, un fonctionnement normal de la cellule exige une intégrité fonctionnelle à la fois du cytoplasme et de la mitochondrie ainsi que des mécanismes de transfert de substrat ou de cofacteurs à la membrane mitochondriale.

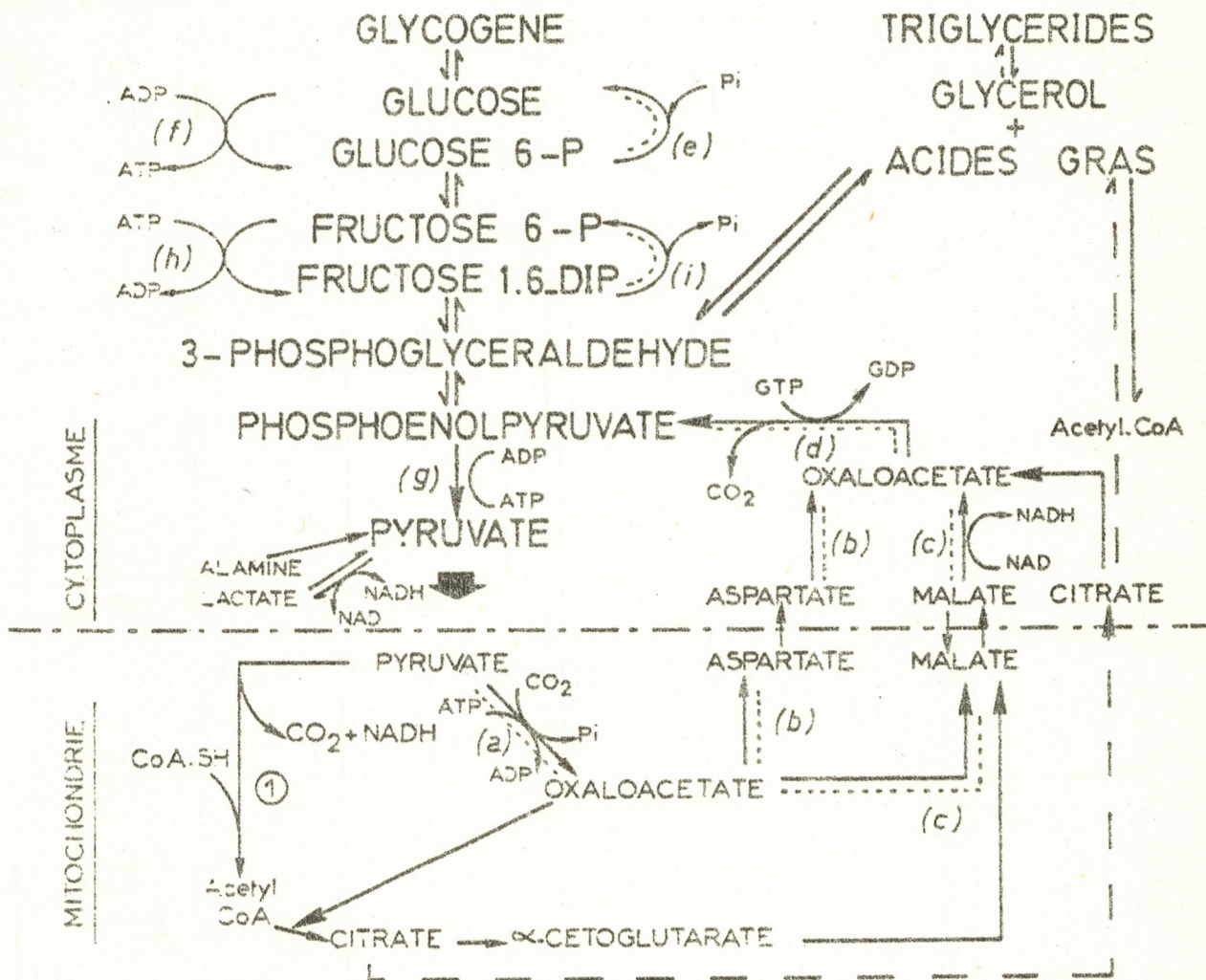
Le rôle essentiel du foie et des hépatocytes isolés dans la néoglucogenèse à partir du lactate, du pyruvate, du fructose et des aminoacides a été largement montré chez le Rat (ROSS et alii, 1967 ; BERRY and FRIEND, 1969 ; INGEBRETSEN and WAGLE, 1972 ; CORNELL et alii, 1973 ; GARRISON et HAYNES, 1973 ; QUISTORFF et alii, 1973 ; VENEZIALE et alii, 1973 ; ZAHLTEN et alii, 1973, 1974 ; CLARCK et alii, 1974 ; CORNELL et alii, 1974 ; HAYNES et alii, 1974 ; WAGLE, 1974 ; SEGLEN, 1974 a ; TOLBERT and FAIN, 1974 ; ZAHLTEN et alii, 1974 ; CALLIKAN, 1980 ; AZOUT, 1984) et chez le Lapin par (ZALESKI et BRYLA, 1977 ; ZALESKI et alii, 1981 ; MARTIN, 1979 ; EL MANOUBI, 1981). Toutefois, le Rat semble un modèle assez particulier pour cette étude. En effet, chez cette espèce, la PEPCK (Phosphoénol pyruvate carboxykinase) se trouve localisée exclusivement dans le cytoplasme, alors que dans la plupart des espèces (homme, lapin, cobaye, mouton, porc) il existe une activité de la PEPCK à la fois mitochondriale et cytoplasmique (HANSON, 1973).

La néoglucogenèse est une voie métabolique qui utilise en sens inverse la plupart des réactions enzymatiques de la glycolyse à l'exception de trois d'entre elles (Fig. 1). Celles-ci représentent des points de contrôle de la glycolyse et des barrières énergétiques pour les réactions nécessaires à la synthèse du glucose.

La réversibilité de la glycolyse ne sera donc possible que par la présence d'autres enzymes permettant de contourner ces barrières énergétiques. Ces étapes unidirectionnelles sont catalysées suivant le sens par les couples enzymatiques suivants :

- 1 - Glucokinase et glucose - 6 phosphatase
- 2 - Phosphofructokinase et fructose 1 - 6, diphosphatase
- 3 - Pyruvate kinase et pyruvate carboxylase et phosphoénol-pyruvate carboxykinase (PEPCK)

Figure I - Schéma montrant le transfert de substrats lors de la néoglucogénèse et de la lipogénèse.



----- Etapes spécifiques de la néoglucogénèse

———— Etapes de la lipogénèse

a ; b ; c ; d ; e ; f ; g ; h sont les enzymes de la glycolyse et de la néoglucogénèse dans le foie.

- (a) = Pyruvate carboxylase - (b) = Aspartate aminotransférase
- (c) = Malate déshydrogénase - (d) = Phosphoenolpyruvate-carboxykinase (PEPCK)
- (e) = Glucose - 6 - phosphatase - (f) = Hexokinase ou glucokinase
- (g) = Pyruvate kinase - (h) = Phosphofructokinase - (i) = Fructose - 1,6 - diphosphatase

① Cycle de Krebs

4°) L'hépatocyte et la lipogénèse

Le foie assure la synthèse des lipides à partir d'acides gras et de glucose et ces lipides néoformés sont aussitôt transportés vers d'autres tissus par le sang. L'hépatocyte hydrolyse les lipoprotéines du plasma afférent et stocke les triglycérides (SUNDLER, 1973). Toutefois à la suite d'anomalies, le foie peut s'enrichir de façon importante en lipides ; on obtient une stéatose ou foie gras. Cette surcharge lipidique du foie a plusieurs origines :

- la lipogénèse et ses variations au cours du développement.
- l'influence nutritionnelle
- le contrôle endocrinien, les influences pharmacologique ou infectieuse.

Examinons tout d'abord si le foie est impliqué par une lipogénèse vraie c'est-à-dire une synthèse de "novo" d'acides gras ou s'il est tout simplement un organe qui ne fait qu'accumuler les acides gras endogènes ou exogènes sous forme de triglycérides.

a) La Lipogénèse vraie

Les hépatocytes isolés de Rat sont capables tout à la fois d'inclure les acides gras exogènes (le palmitate) et d'incorporer le carbone marqué (^{14}C) de l'acétate dans les esters d'acides gras (ONTKO, 1972 ; BERRY et alii, 1973 b ; CAPUZZI et alii, 1974 ; SUNDLER et alii, 1974 ; SAUER et MAHADENAN, 1973). Les hépatocytes ne pourraient utiliser directement les triglycérides et il n'y aurait aucune preuve de libération d'acides gras dans le milieu extracellulaire (FELTS et BERRY, 1971). Pour ces auteurs le foie accumulerait les lipides sous forme d'esters d'acides gras. Cependant, WADKE et alii, (1973) ont observé une synthèse de "novo" d'acides gras (palmitate et stéarate) dans le foie de Rat perfusé avec de l'eau radioactive marquée au tritium et les quantités d'acide palmitique obtenues sont comparables à celles citées par JUNGAS (1968) à partir du tissu adipeux.

En définitive, on peut penser que le foie est le siège d'une synthèse d'acides gras de "novo" tout comme le tissu adipeux (FOSTER et KATZ, 1966 ; VEZINHET, 1976).

b) Accumulation lipidique ou stéatose ; origine :

ENTENMANN et alii (1940), FLEURET (1953), GOMEZ-CAPILLA et alii (1975), LE GOFF et alii (1977), MICHOUDET et alii (1978) et BARRE (1982) ont montré une évolution de la surcharge grasseuse du foie chez le poussin au cours de son développement.

Chez les mammifères, la réserve lipidique hépatique est bien moins importante que chez les vertébrés inférieurs où le foie joue un rôle de stockage ; ceci a été observé chez la grenouille (GUIBE et THIREAU, 1977) et chez la plupart des poissons (ROUSSEL, 1900 ; DEFLANDRE, 1903 ; FONTAINE et CALLAMANDRE, 1953).

- Stéatose nutritionnelle

Dès 1912, CHALATOW montre que les lipides du foie varient quantitativement et qualitativement en fonction des graisses de l'alimentation. Ainsi utilisant du cholestérol dissous dans l'huile, il note l'apparition d'un foie gras qui est d'autant plus important que le régime est riche en lipides. De même MILLBRADT (1930), PAGE et MENSCHICK (1932) enregistrent l'augmentation du cholestérol dans le foie de lapins. CLEMENT et LEBRETON (1952), administrant du cholestérol à 5 % à des rats blancs, pendant un an, obtiennent des foies gras avec une augmentation pondérale des esters de cholestérol et des triglycérides. AGID (1953) observe une surcharge hépatique en esters de cholestérol sans foie gras chez le lapin après administration de cholestérol en émulsion dans l'eau.

Si l'influence nutritionnelle est très importante comme nous venons de le voir sur la surcharge du foie en lipides, que se passe-t-il "in vitro" au niveau de l'hépatocyte ?

Les hépatocytes isolés de rats nourris synthétisent principalement des esters d'acides gras et ceux de rats à jeun essentiellement des corps cétoniques (ONTKO, 1972). Les hépatocytes isolés de rats nourris, incubés en présence d'eau tritiée synthétisent des triglycérides (NILSSON et alii, 1973, 1974). Ces auteurs ont noté qu'une très faible quantité d'acides gras est libérée en même temps que les esters d'acides gras. CLARCK et alii (1974) et SUNDLER et alii (1974) ont montré que les hépatocytes isolés de rats nourris "ad libitum" ou soumis à un régime hyperglucidique ou hyperlipémique synthétisent des esters d'acides gras à partir de sources endogènes avec un taux de triglycérides élevé chez les animaux recevant un apport calorique plus important. En effet, BERRY et alii (1973 b) et NILSSON et alii (1973a) ont observé des résultats comparables après avoir incubé des hépatocytes isolés de rat en présence d'acides gras. Certains hydrates de carbone favorisent l'orientation des acides gras dans la voie de l'estérification au lieu de leur oxydation chez le rat à jeun (ONTKO, 1972).

D'après CLARCK et alii (1974) le lactate augmente la formation des triglycérides et serait un excellent substrat pour la "lipogénèse" hépatique "in vitro" alors que le glucose n'aurait qu'un rôle minime dans cette voie.

Si la synthèse d'esters d'acides gras est stimulée par certaines substances, d'autres l'inhibent au contraire, c'est le cas des nucléotides cycliques (CAPUZZI et alii, 1974) et du N⁶, O² - Dibutyryl Adénosine 3',5' - Monophosphate (HARRIS, 1975).

Cette propriété d'accumulation des lipides par le foie est considérée comme normale, en revanche lorsque le tissu hépatique développe une surcharge "en graisses" on parle de stéatose. Le foie peut développer différents types de stéatoses qui sont fonction des effets qui les induisent. La stéatose est engendrée par les régimes comportant des teneurs exagérées en lipides (BEST et alii, 1949 ; CLEMENT et alii, 1953 ; LIEBER et alii, 1961 ; HARTROFF et alii, 1969). Le dégénérescence graisseuse provoquée par un éthyliisme aigu est caractérisée par une accumulation de triglycérides (LAMELIN, 1965 ; LIEBER et SPRITZ, 1966 ; BARAONA et LIEBER, 1970).

Les régimes de gavage sont stéatogènes car ils fournissent un excédent important en glucides et un déficit en protides. C'est ainsi qu'une suralimentation du canard et de l'oie conduit à une stéatose par accumulation de triglycérides dans le foie (LECLERCQ et alii, 1968). Cependant l'hypertrophie hépatique chez l'oie est au départ plus physiologique que pathologique (BLUM et LECLERCQ, 1973).

- Stéatose d'origine endocrinienne

Certains troubles comme l'hyperlipémie sont sous la dépendance des sécrétions hypophysaires. DESBALS (1967) a montré après avoir hypophysectomisé et surrénalectomisé des lapins, que l'administration de corticotropine provoque chez cet animal le développement d'une mobilisation intense des graisses avec hyperlipémie et surcharge lipidique du foie. Notons aussi chez la poule pondeuse, une stéatose induite par l'augmentation de la lipogenèse lors de la ponte. On parle du foie gras hémorragique chez cette espèce (COUCH, 1956).

- Stéatose d'origine pharmacologique

L'administration de poisons minéraux et organiques débouche sur une stéatose hépatique caractérisée par un taux élevé de triacylglycérols (ROUX, 1960). Des antibiotiques comme la tétracycline, la puromycine, conduisent à une stéatose par diminution de la synthèse de protéines (FEINBERG et alii, 1954).

- Stéatose d'origine infectieuse

La stéatose peut être d'origine infectieuse (LEEVY, 1962) et même génétique selon GUILLAUME (1975). Chez l'homme, les stéatoses hépatiques relèvent d'une pathologie très disparate. Chez l'enfant atteint du syndrome de REYE, nous observons une encéphalopathie et une dégénérescence graisseuse du foie (ODIEVRE, 1973). Ce syndrome pouvant également se rencontrer chez l'adulte (VARMA et alii, 1970).

Il ressort de cette recherche bibliographique que le foie "in vivo" et "in vitro" a des propriétés permettant la néoglucogénèse et l'accumulation des lipides surtout des triglycérides.

Les hépatocytes isolés pour être fonctionnels requièrent tout un ensemble de conditions les rapprochant le plus possible de l'intégrité fonctionnelle et structurale qu'ils ont "in situ". Si les hépatocytes du rat ont été étudiés dans diverses voies métaboliques (néoglucogénèse, lipogenèse, uréogénèse, cétogénèse, ...), les investigations faites sur les hépatocytes isolés de lapin ne concernent jusqu'à ce jour que la néoglucogénèse.

Nos recherches bibliographiques n'ont pu relever de travaux sur la lipogénèse au niveau des hépatocytes isolés de lapin.

Suite aux travaux réalisés dans le laboratoire ces dernières années sur la lipogénèse des adipocytes isolés du lapin, il nous a semblé intéressant de nous orienter vers l'étude de la lipogénèse de l'hépatocyte chez cet animal en étudiant la synthèse de "novo" des acides gras et leur stockage ainsi que les effets de l'insuline dont le rôle au niveau de la lipogénèse chez le lapin reste encore très controversé (DI GIROLAMO et RUDMAN, 1966 ; SAGGERSON, 1974 ; VEZINHET, 1976 ; ALAOUI et alii, 1982).

B - DESCRIPTION CRITIQUE DE NOTRE TECHNIQUE

1°) Le traitement "in situ"

Après anesthésie, laparotomie et mise en place des perfusions (voir chapitre Méthodes) les conditions ci-après sont scrupuleusement respectées :

- la température du foie est maintenue à 37°-38°C. ce qui suppose une régulation de la température du liquide de perfusion ;

- le pH des liquides de préperfusion et perfusion est à 7,5 ;

- l'élimination du Ca⁺⁺ intercellulaire est assurée par la préperfusion avec du KRB sans Ca⁺⁺ en présence d'EDTA (2 mM) et d'héparine (10 UI/ml) pour éviter toute coagulation ;

- puis nous procédons au rinçage ce qui élimine le chélateur avant la perfusion en présence de collagénase ;

- maintenir la pression hydrostatique par un débit de 60 ml/min ;

- perfuser en présence de collagénase (0,02 %) pendant 15 à 20 min ce qui permet une dissociation correcte des cellules sans dégradation de leur membrane ;

- éliminer les hématies et la collagénase par un rinçage du foie.

2°) Le traitement "in vitro"

Il faut éviter d'exercer de trop fortes pressions mécaniques au moment du prélèvement du foie et de sa délacération :

- les tamis de filtration doivent avoir des mailles suffisamment petites pour retenir les gros amas et suffisamment grandes pour laisser passer les cellules isolées (Filtres Durieux, Screen 12 ; Nybolt 48 HC) ;

- la centrifugation dont le seul but est d'éliminer les débris cellulaires et les hématies restantes doit s'effectuer avec une faible accélération (30-50 g pendant une minute) pour que les cellules hépatiques se déposent au fond du tube, sans dépasser une limite, au-delà de laquelle les hépatocytes s'agglomèrent et restent groupés en amas de façon irréversible ;

- le culot d'hépatocytes est alors rincé et centrifugé deux fois. Ces centrifugations doivent être conduites rapidement car après centrifugation d'une minute les hépatocytes déposés au fond du tube sont quasiment privés d'oxygène et il suffit de quelques minutes d'anoxie pour que ces cellules subissent des altérations avec une perte définitive d'ATP supprimant toute activité métabolique ; un troisième lavage diminue la viabilité des hépatocytes (KREBS et alii, 1973) ;

- tout au long de la manipulation l'oxygénation des hépatocytes isolés et le pH doivent être maintenus constants ; un intense barbotage des milieux baignant les cellules est assuré par le mélange O_2/CO_2 , 95/05.

La suspension cellulaire obtenue est récupérée dans un erlenmeyer en plastique, elle est agitée (100 c/min) au bain-marie à 38°C pendant au moins 10 min sous oxygénation ; c'est la préincubation qui prévient la déplétion en glycogène, l'altération de la glucokinase et qui préserve aussi l'intégrité métabolique des cellules (BARNABEI et alii, 1974 ; CORNELL et alii, 1974 ; ZAHLTEN et alii, 1974).

a) Contrôles morphologiques

Les cellules vivantes sont examinées au microscope photomicroscopique rapidement après coloration au bleu trypan (0,2 %) ; en effet au bout de 3 min toutes les cellules se laissent infiltrer par ce colorant vital, ce qui ne permet plus de distinction entre cellules vivantes et mortes.

La figure 1 montre des cellules vivantes à contours réguliers et non colorées, des cellules mortes dont le ou les noyaux sont bien colorés et avec des membranes plasmiques très irrégulières. Cette observation nous permet d'estimer le rendement de la préparation cellulaire qui se situe généralement entre 70 et 90 %. Après numération la suspension cellulaire est amenée à la concentration de 10^6 , 10^7 cellules hépatiques par ml (figure 2).

Après fixation des frottis, les hépatocytes sont colorés au May-Grunwald-Giemsa (M.G.G.) et observés ; les figures (3 et 4) montrent les particularités de ces cellules, à savoir la présence fréquente de 2 noyaux par cellule ce qui caractérise la tétraploïdie des hépatocytes des mammifères, leur nombre a été estimé à 30 % dans le foie de rat adulte (ANDERSON, 1953 ; WEATLEY, 1972). La figure 4 met en évidence l'aspect granulaire, vraisemblablement des lysosomes et du glycogène, des hépatocytes.

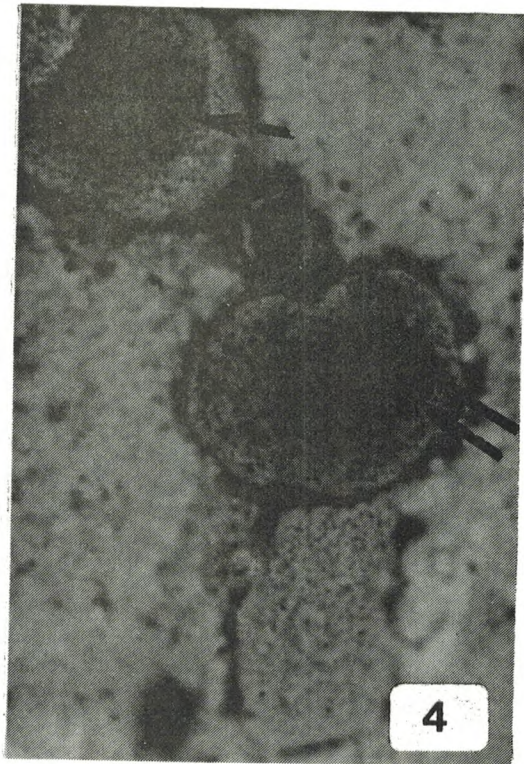
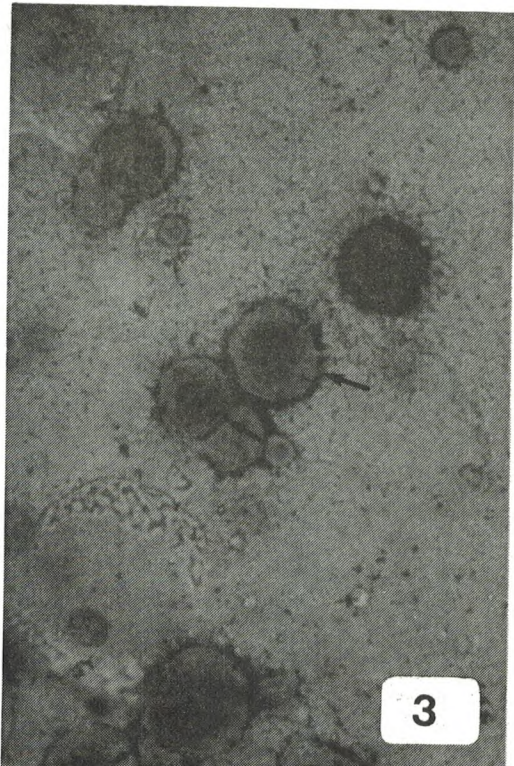
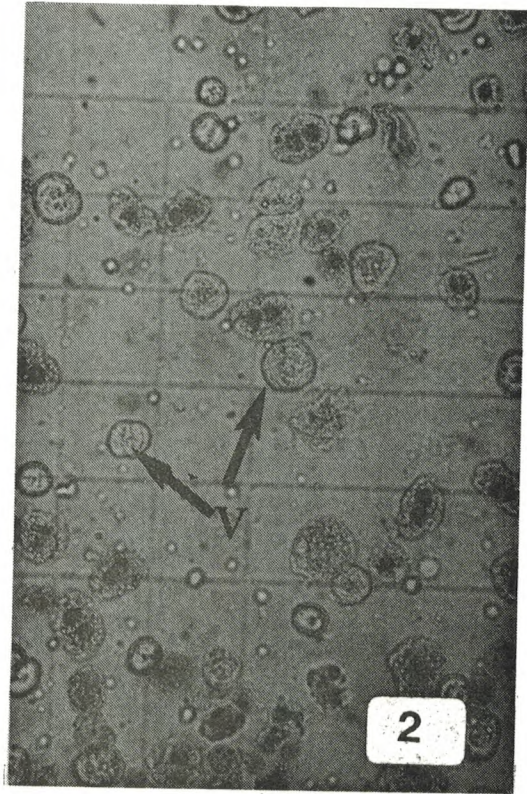
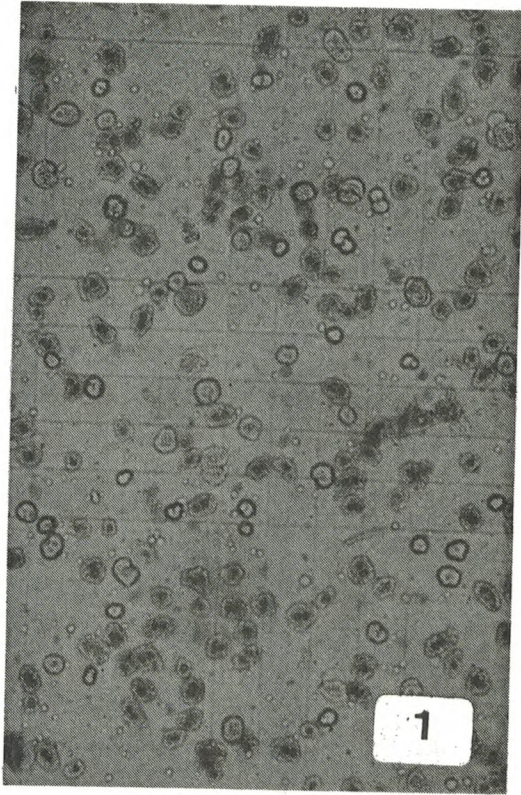
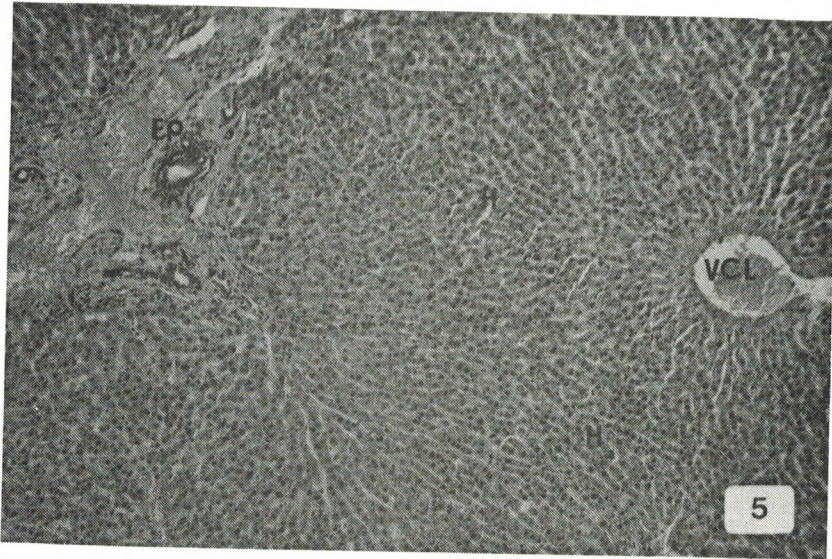


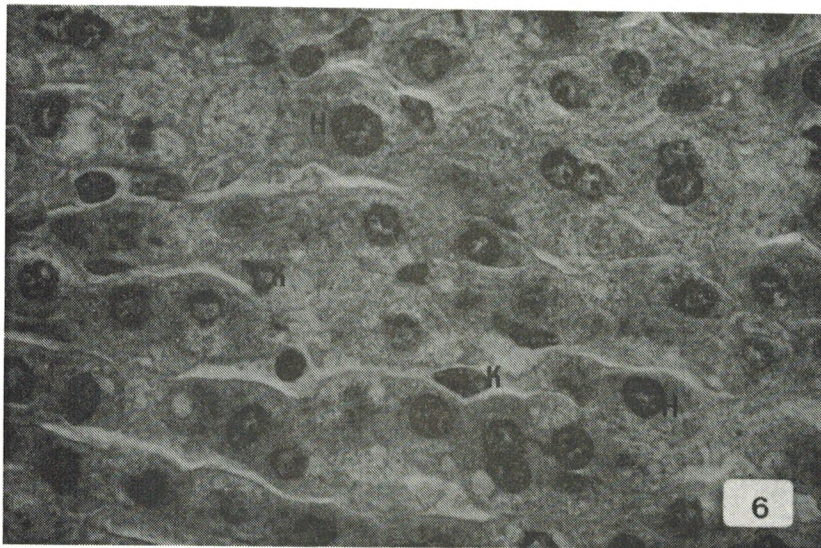
PLANCHE 2

STRUCTURE GENERALE DU FOIE DE LAPIN
en microscopie photonique



Lobules hépatiques

X 18



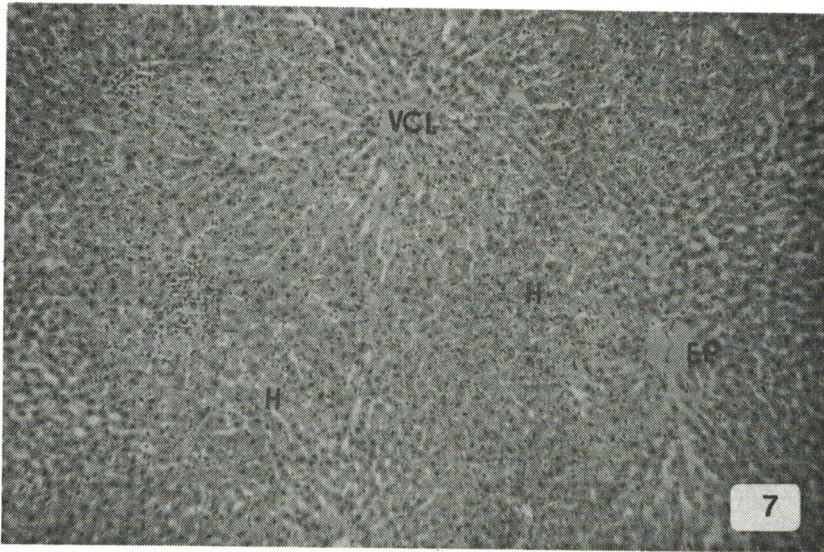
Hépatocytes et
cellules de KUPFFER

X 360

Figures 5 - 6 : Le foie montre des lobules hépatiques dont le centre est occupé par la veine centrolobulaire ; séparés les uns des autres par des espaces portes.
On observe des hépatocytes et des cellules de KUPFFER.

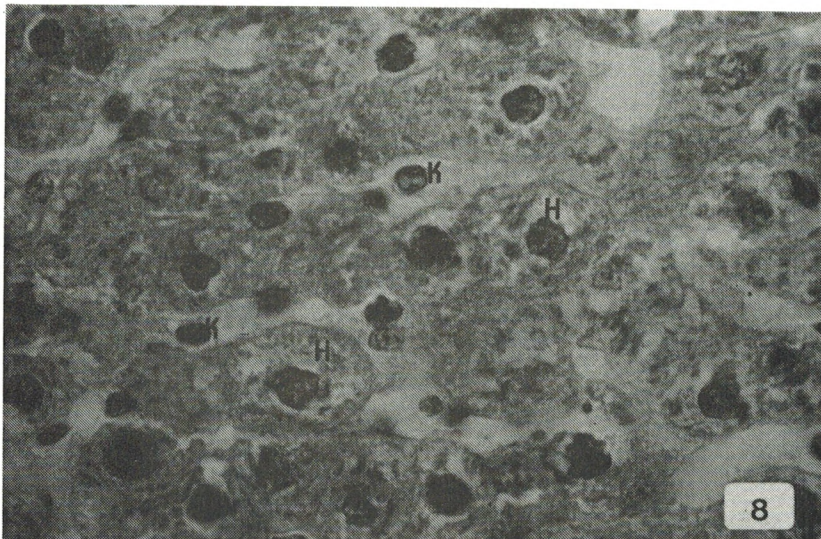
PLANCHE 3

STRUCTURE GENERALE DU FOIE D'HOMME
en microscopie photonique



Lobules hépatiques

X 18



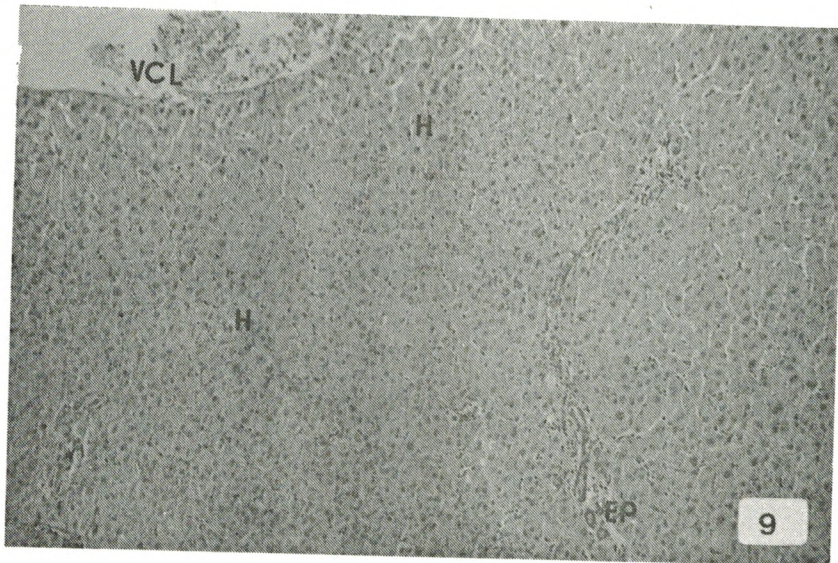
Hépatocytes et
cellules de KUPFFER

X 360

Figures 7 - 8 : Le foie d'homme comme celui de lapin montre la même structure (des hépatocytes, des cellules de KUPFFER).

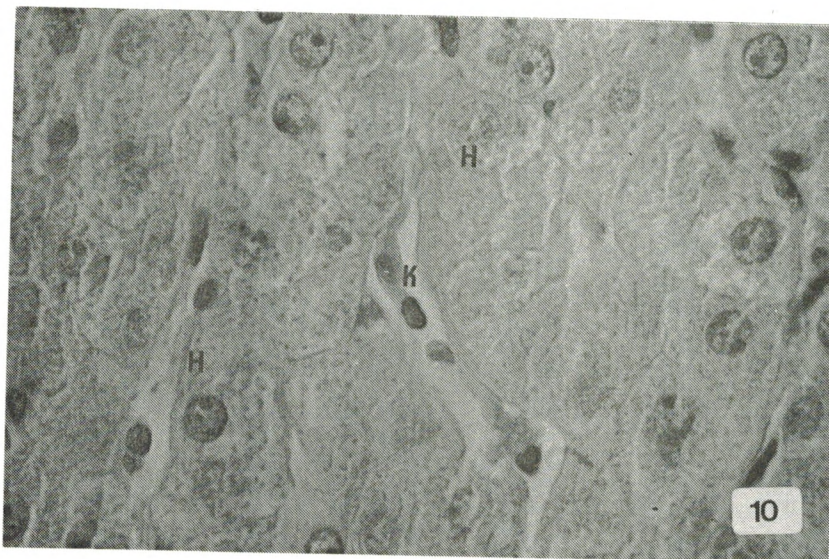
PLANCHE 4

STRUCTURE GENERALE DU FOIE DE RAT
en microscopie photonique



Lobules hépatiques

X 18



Hépatocytes et cellules
de KUPFFER

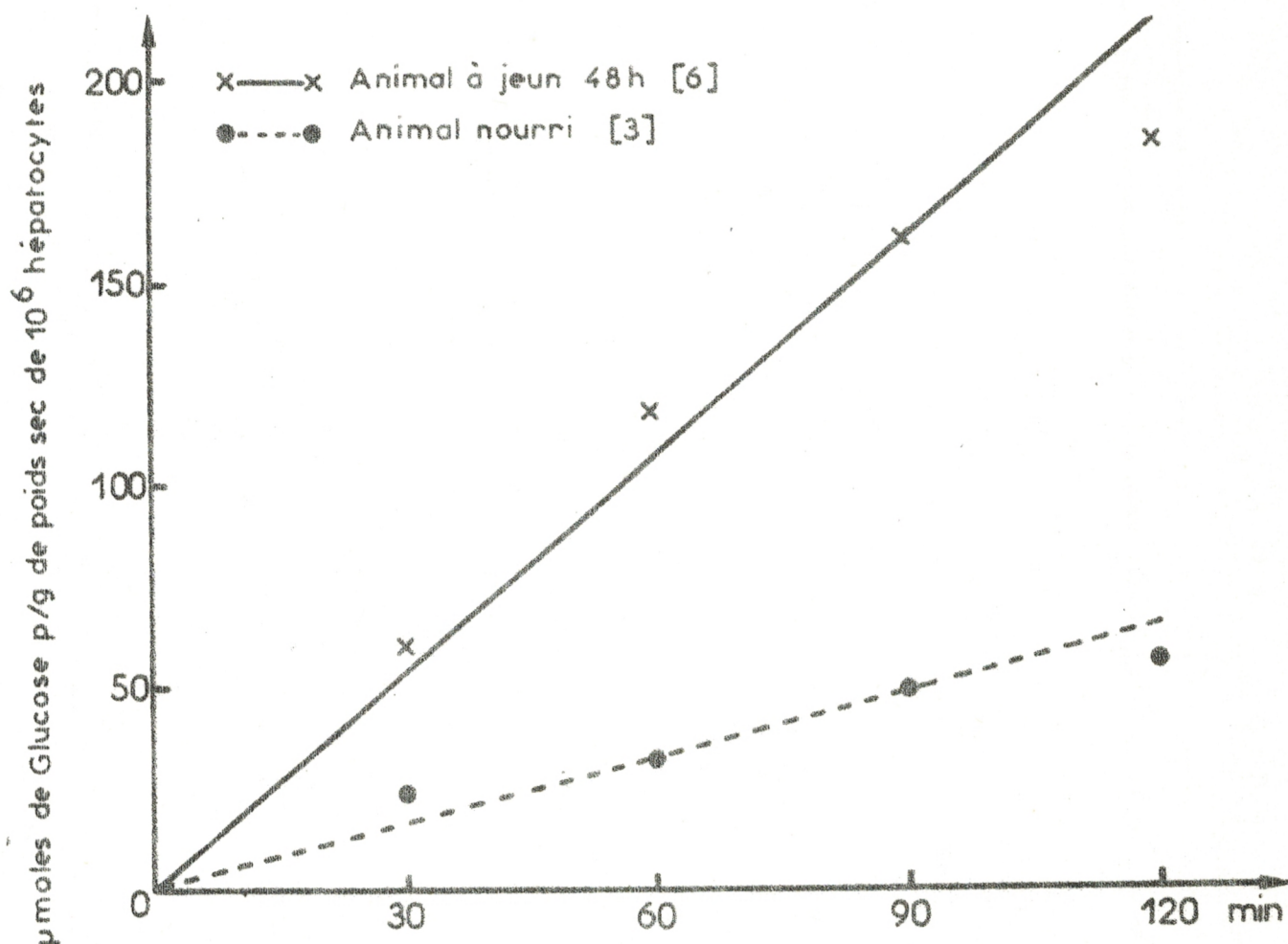
X 360

Figures 9 -10 : Il y a ressemblance de structure avec le lapin et l'homme. La taille des hépatocytes est plus grande que celle du lapin.

TABLEAU I - Biométrie des hépatocytes et cellules de KUPFFER : chez le lapin, l'homme et le rat.

Espèces	Diamètre des cellules hépatiques "	Nombre de cellules dans un volume de $1 \mu^3$		Pourcentage de cellules hépatiques dans $1 \mu^3$
		Cellules hépatiques	cellules de Kupffer	
LAPIN	13 à 15	1245	136	90
HOMME	17 à 18	491	36	93
RAT	15 à 22	772	100	88

Figure II - Néoglucogénèse à partir de lactate (10 mM) de l'hépatocyte isolé de lapin adulte à jeun depuis 48 heures ou nourri "ad libitum"



[] Nombre d'animaux

Après 60 minutes d'incubation les hépatocytes du lapin à jeun présentent une activité néoglucogénique très intense (118 ± 5) micromoles de glucose p. g de poids sec de 10^6 hépatocytes comparativement à l'animal nourri (32 ± 1) ; ce qui représente une différence de 270 %.

Après fixation au Bouin et coloration à l'hémalum-éosine, l'étude comparée de l'aspect histologique du foie de lapin, d'homme et de rat (figures 5, 7 et 9) nous permet de constater la ressemblance de leurs structures. A partir des figures (6, 8 et 10) les cellules de KUPFFER sont observées et leur nombre est évalué chez les 3 espèces (tableau I). Ainsi la taille de l'hépatocyte du lapin est plus petite que celle des hépatocytes d'homme et de rat, par contre les cellules de KUPFFER sont plus nombreuses chez le lapin.

b) Contrôle métabolique (figure II ; tableau 1)

Un des meilleurs critères de l'activité métabolique des hépatocytes isolés est l'évaluation de la quantité de glucose néoformé par ces cellules à partir d'un substrat donneur d'atomes de carbone : le lactate de sodium.

La mesure du glucose produit par les hépatocytes en présence de lactate pendant une heure d'incubation reflète à la fois l'activité de la glycogénolyse et celle de la néoglucogenèse. La contribution de la glycogénolyse à la production de glucose par les hépatocytes est déterminée dans les échantillons incubés en absence de lactate. Cette production basale ou endogène de glucose est due essentiellement à la glycogénolyse. Elle a donc été soustraite de la production totale de glucose mesurée en présence de lactate afin d'estimer les intensités nettes de gluconéogenèse à partir du substrat.

Les préparations cellulaires que nous avons utilisées pour notre étude synthétisent en moyenne 118 micromoles de glucose par g de poids sec de 10^6 cellules p. heure d'incubation à partir de lactate 10mM chez l'animal adulte à jeun depuis 48 heures et cela au bout de la première heure d'incubation. Cette intensité néoglucogénique n'est que de 65 micromoles p. g de poids sec p. heure dans la deuxième heure d'incubation.

Chez l'animal nourri la quantité de glucose néoformé n'est que de 32 micromoles p. g de poids sec à partir du même substrat pris à la même concentration et pendant le même temps.

La figure II montre que l'activité métabolique de l'hépatocyte dans nos conditions expérimentales est correcte puisque dans les deux cas examinés nous assistons à une augmentation de la transformation du lactate en glucose. Ceci démontre que les hépatocytes restent fonctionnels et peuvent donc être utilisés pour l'étude de la lipogenèse in vitro.

Remarquons que nos mesures de néoglucogenèse chez le lapin à jeun sont semblables à celles de (80 et 150 micromoles p. g poids sec p. heure) de MARTIN (1979) chez ce même animal à jeun. En revanche ces activités sont inférieures à celles citées par POGSON chez le cobaye (150 micromoles p. g de poids sec p. heure) ou chez le mouton (180 micromoles p. g de poids sec p. heure).

Il faut noter que l'état nutritionnel des animaux est fondamental dans ce genre d'étude (EL MANOUBI et alii, 1983). En effet, l'action de l'alimentation sur la néoglucogénèse est connue depuis fort longtemps. Le jeûne augmente en général l'activité néoglucogénique du foie alors que l'administration d'un excès de glucose déprime l'activité de la PEPCK (KREBS et EGGLESTON, 1965), c'est ce qu'ont montré EL MANOUBI et alii (1983) chez le lapin ; ils concluent que chez le lapin nourri, le foie est riche en glycogène et par suite la cellule hépatique "in vitro" va présenter une glycogénolyse qui ne peut pas rendre compte de l'état biologique de cette cellule et en outre la néoglucogénèse ne peut pas, sur des cellules déjà pourvues en glycogène, être importante.

En revanche selon ZALESKI et BRYLA (1978) la participation de la PEPCK cytoplasmique au flux gluconéogénique est aussi importante chez le lapin nourri que chez le lapin à jeun ; selon ces mêmes auteurs le jeûne n'affecte pas l'utilisation du lactate, du pyruvate ou du propionate au cours de la néoformation de glucose. Par ailleurs, pour ARINZE et alii (1973 a, 1973 b) la participation de la PEPCK cytoplasmique est faible chez le lapin et le chat nourris, par contre elle augmente considérablement lors du jeûne. RAY et alii (1966) ont montré que l'activité de la carboxykinase cytosolique est multipliée par quatre lors du jeûne, au contraire cette modification n'est pas très sensible en ce qui concerne la carboxykinase mitochondriale, la pyruvate carboxylase et la fructose 1,6 - diphosphatase.

En définitive, nos données montrent chez l'animal nourri une production modeste de glucose. En revanche, chez le lapin à jeun depuis 48 heures l'hépatocyte est dépourvu de glycogène et l'apparition de glucose lors de l'incubation avec le lactate est le signe d'une activité métabolique à signification biologique. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par MARTIN (1979) et CALLIKAN (1980).

C - CHOIX DE L'EXPRESSION DES RESULTATS

Le choix d'un mode d'expression des résultats approprié est important, non seulement d'un point de vue conceptuel, mais également pour comparer les résultats obtenus à partir d'animaux d'âges différents et dans des conditions physiologiques différentes.

L'expression de l'activité lipogénique des cellules peut être rapportée :

- à la quantité de protéines totales insolubles
- au poids sec des cellules
- au poids sec des lipides totaux
- au poids frais des cellules
- au nombre de cellules

et aussi au temps d'incubation.

Après avoir étudié chacun de ces paramètres, nous avons préféré exprimer l'activité lipogénique des hépatocytes par rapport à 10^6 cellules et p. mg de protéines totales p. 180 min d'incubation.

1°) Mesure des protéines totales (tableau 2)

La quantité de protéines totale mesurée dans la prise aliquote de l'échantillon est corrigée d'une valeur égale au pourcentage de cellules vivantes par rapport au nombre total d'hépatocytes ; ceci signifie que la quantité de protéines qui sert de référence pour l'expression de la mesure (radioactivité) est celle qui est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

- Etude de la reproductibilité du dosage

Nous avons obtenu des quantités moyenne de 18,5 ; 27,5 ; 44,5 microgrammes de protéines pour des prises aliquotes respectives de 20, 30 et 50 microlitres d'un volume de 2 ml de suspension cellulaire (10^6 cellules p. ml). Dans la limite de nos dilutions les quantités prélevées montrent une excellente proportionnalité en protéines totales par rapport aux comptages cellulaires. La réaction est bien quantitative.

- Protéines cellulaires et état nutritionnel

HARRISON (1953) et CORNELL et alii (1974) constatent une diminution du poids corporel du rat lors d'un jeûne de un à six jours, il s'en suit une disparition totale des réserves de glycogène et une baisse du taux des protéines et des éléments minéraux (eau, potassium). Pour notre part, chez le lapin à jeun depuis 48 heures nous obtenons $350 \pm 13 \mu\text{g}$ de protéines totales pour 10^6 cellules, cette valeur moyenne est significativement plus faible que celle trouvée chez le lapin nourri "ad libitum" où nous obtenons $804 \pm 53 \mu\text{g}$ pour 10^6 cellules. Nous montrons donc une corrélation entre la quantité de protéines obtenues dans 10^6 hépatocytes et les conditions nutritionnelles de l'animal.

Ainsi, la quantité de protéines totales est diminuée d'environ 44 %. Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus chez le Rat soumis à un jeûne de 48 heures par CORNELL et alii (1974) qui observe lui aussi une diminution d'environ 39% de la quantité de protéines totales par rapport à l'animal nourri.

2°) Détermination du poids sec des cellules et des lipides totaux (tableaux analytiques 3 a et b)

La détermination du poids sec des cellules est réalisée par la mesure de la différence de poids d'un ml d'une suspension cellulaire avant et après séchage à 105°C . Chez l'animal nourri nous obtenons un poids sec de $3,02 \pm 0,47 \text{ mg}$ p. 10^6 cellules et cette valeur n'est que de $0,91 \pm 0,01 \text{ mg}$ p. 10^6 cellules chez le lapin à jeun depuis 48 heures.

Nos résultats sont comparables à ceux de la littérature qui rapportent un poids sec de 2 à 3 mg p. 10^6 cellules chez le lapin nourri (MARTIN, 1979), en revanche, il est inférieur à la valeur obtenue chez le rat (KREBS et alii, 1973).

Les lipides totaux contenus dans 10^6 cellules sont mesurés chez l'animal nourri "ad libitum" et le lapin à jeun depuis 48 heures. Nous obtenons un poids sec de $0,73 \pm 0,07$ mg p. 10^6 cellules dans les hépatocytes de lapin nourri pour $0,14 \pm 0,02$ mg chez l'animal à jeun.

Nous constatons que selon l'état physiologique de l'animal (nourri ou à jeun), nous avons des variations significatives tant du poids sec des cellules que de leur contenu en lipides et protéines totales.

3°) Détermination du poids frais de 10^6 cellules

Le tableau II montre une augmentation du poids sec de 10^6 hépatocytes de la naissance à l'âge adulte, en revanche, nous notons une nette diminution du poids frais des cellules hépatiques de l'animal adulte par rapport au nouveau-né ; la réduction est d'environ du tiers (le poids frais des cellules est évalué à partir de 10^6 cellules en suspension dans 1 ml de milieu ; la suspension est centrifugée, le culot est lavé deux fois et après l'ultime centrifugation le poids du culot est assimilé au poids frais des cellules).

TABLEAU II - Comparaison du nombre d'hépatocytes, du poids sec et du poids frais des hépatocytes isolés chez des lapins nourris de la naissance à l'âge adulte.

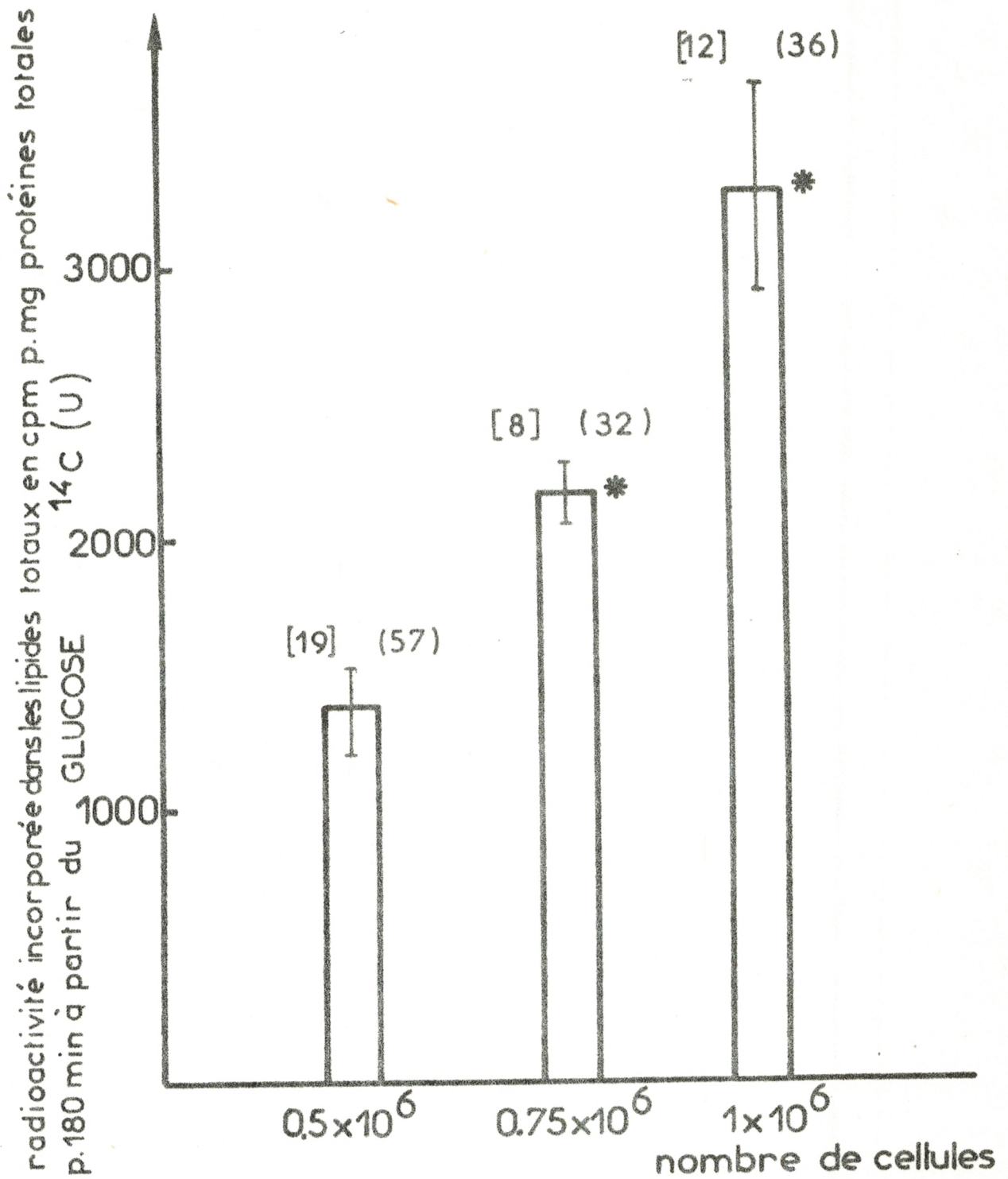
Age	Million d'hépatocytes/ml	Poids sec mg/ml	Poids frais mg/ml
Naissance	1	1,8	30,0
20 jours	1	2,2	13,0
60 jours	1	2,8	9,0
Adulte	1	3,0	8,9

Légende : au cours du développement le poids sec de 10^6 hépatocytes augmente alors que le poids frais diminue.

4°) Influence du nombre d'hépatocytes sur la lipogenèse (Tableau 4, figure III)

Nous avons voulu vérifier que la grandeur de la population cellulaire n'influencait pas le métabolisme. L'expérimentation sur des lapins adultes à jeun depuis 48 heures montre que la capacité de stockage des lipides totaux dans les hépatocytes se trouve accrue proportionnellement à l'effec-

Figure III - Influence du nombre d'hépatocytes sur la lipogénèse



[] Nombre d'animaux

() Nombre d'essais

* Valeur 1×10^6 significativement différente de la valeur $0,5 \times 10^6$ cellules au seuil de 0,05

La lipogénèse est proportionnelle au nombre d'hépatocytes dans nos limites.

tif cellulaire. Ainsi, lorsque le nombre d'hépatocytes passe de 0,5 à 0,75 10^6 cellules, le taux de la radioactivité incorporée dans les lipides totaux passe de 1382 ± 162 à 2174 ± 191 cpm p. mg de protéines totales p. 180 min et lorsque le nombre de cellules est de 10^6 elle est de 3285 ± 364 . Donc la biosynthèse des lipides totaux s'accroît quasiment proportionnellement avec le nombre de cellules. Par suite, nous avons choisi de travailler avec 10^6 hépatocytes dans toutes nos analyses.

5°) Lipogenèse et durée d'incubation des hépatocytes isolés (tableaux analytiques 5, 6).

L'expérimentation porte sur des lapins adultes à jeun depuis 48 heures ou nourris "ad libitum". Chez le lapin à jeun, pendant les 60 premières minutes l'augmentation de la lipogenèse est de 613 % ; elle n'est plus que de 24 % entre 60 et 120 min d'incubation et elle se poursuit jusqu'à 180 min en s'accroissant encore de 53 %. Ainsi l'hépatocyte reste métaboliquement actif au moins pendant trois heures avec un accroissement continu des synthèses lipidiques (tableau III, figure IV).

Chez le lapin nourri, pendant les 60 premières minutes la lipogenèse, bien que toujours très active, ne s'accroît que de 21 % entre 60 et 120 min d'incubation ; elle se poursuit au cours de la troisième heure d'incubation et augmente encore de 29 % (tableau III).

En définitive, nous trouvons donc la même tendance d'évolution que chez l'animal à jeun depuis 48 heures où le niveau de la biosynthèse est plus élevé surtout lors de la première heure d'incubation ; de plus l'activité de l'hépatocyte persiste au-delà d'une heure d'incubation.

Remarque : Si la culture d'hépatocytes isolés pose beaucoup de problèmes à cause de leur dégénérescence au bout d'un certain temps et l'absence de potentialité de prolifération, il a été possible de les maintenir en vie pendant au moins 8 heures "in vitro" dans un milieu d'incubation approprié (DICKSON et POGSON, 1977) et BONNEY (1974), BISSEL et alii (1973) ont même réussi à maintenir en vie des hépatocytes isolés de rat pendant plusieurs jours mais avec une diminution de l'activité métabolique. Pour notre part, nous avons réussi à maintenir en vie des hépatocytes isolés de lapin pendant une dizaine d'heures (mise en évidence par le test morphologique au bleu trypan).

En conclusion, la continuité de la biosynthèse lipidique dans l'hépatocyte isolé pendant au moins trois heures, nous a amené à fixer la durée de nos incubations à 180 minutes.

TABLEAU III - Etude cinétique de l'activité lipogénique de l'hépatocyte isolé chez le lapin normal adulte à jeun depuis 48 heures ou nourri. Précurseur : glucose ^{14}C (U)

LIPIDES TOTAUX			
Durée d'incubation en minutes			
0	60	120	180
A JEUN [15]			
cpm p. mg de protéines totales			
Témoin	Accroissement par rapport au témoin		
229 ± 7	1717 ± 307 ■	2130 ± 244 *	3270 ± 292 *
% d'accroissement d'heure en heure			
	+ 613	+ 24	+ 53
NOURRI [8]			
cpm p. mg de protéines totales			
Témoin	Accroissement par rapport au témoin		
229 ± 7	591 ± 91	716 ± 106	926 ± 93 *
% d'accroissement d'heure en heure			
	+ 211	+ 21	+ 29

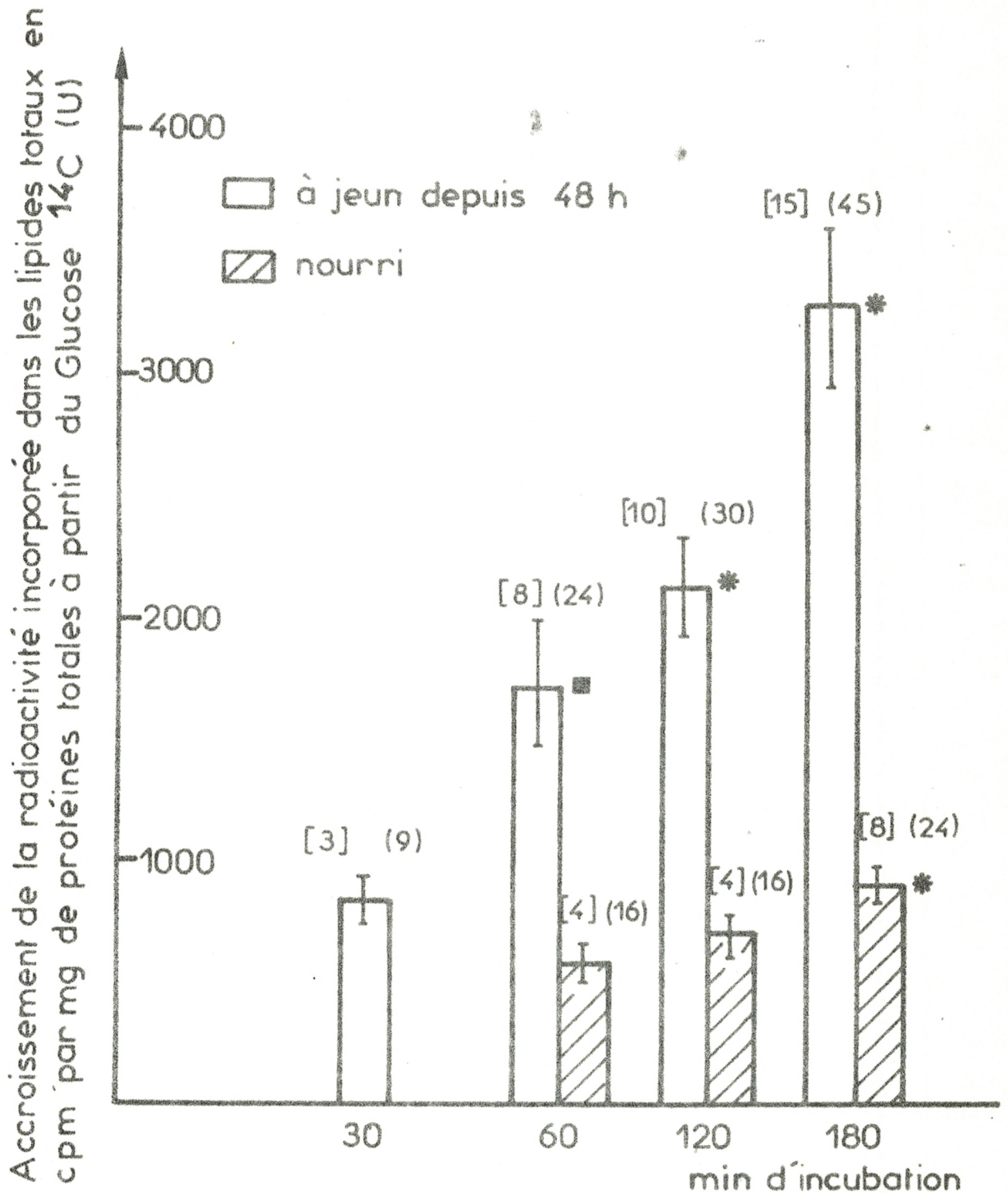
[] Nombre d'animaux

■ Valeur significativement différente de la valeur témoin 0 min. au seuil de 0,05

* Valeurs à 120 et 180 min. significativement différentes de la valeur à 60 min. au seuil de 0,05

La lipogenèse augmente proportionnellement à la durée d'incubation.

Figure IV - Etude cinétique de l'activité lipogénique de l'hépatocyte isolé chez le lapin normal adulte à jeun depuis 48 heures ou nourri "ad libitum"



[] Nombre d'animaux

() Nombre d'essais

* Valeur à 180 minutes significativement différente de la valeur 60 minutes au seuil de 0,05.

Valeur à 60 minutes significativement différente de la valeur T 0 au seuil de 0,05.

La lipogénèse augmente proportionnellement à la durée d'incubation.

II - ETUDE DE LA LIPOGENESE "IN VITRO" CHEZ LE LAPIN ADULTE

L'étude a porté sur 40 lapins mâles, âgés de plus de deux mois et pesant entre 2 à 3 kg (tableaux analytiques 7, 8, 9).

A - LES PRECURSEURS DE LA LIPOGENESE DE L'HEPATOCYTE (tableau IV, figure V).

Nous constatons que l'hépatocyte isolé de lapin adulte synthétise des lipides à partir de l'eau tritiée et du glucose ; l'acétate et le propionate ne sont que très faiblement incorporés dans les lipides. L'hépatocyte utilise préférentiellement le glucose et l'eau tritiée dans la triglycérogénèse.

Nous avons évalué la contribution relative de l'acétate, du propionate, du glucose et de l'eau tritiée à la synthèse des lipides totaux en dehors de toute stimulation hormonale.

Ainsi, si l'on considère que la quantité de carbone fournie par les substrats exogènes (glucose, acétate, acide propionique) mis à la disposition de l'hépatocyte est nettement excédentaire à son utilisation métabolique, on peut admettre que le pourcentage relatif d'utilisation du glucose s'exprime par le rapport :

$$\frac{\text{Quantité de glucose incorporé (cpm p. mg de protéines totales)}}{\text{Total de l'incorporation des 3 précurseurs (cpm p. mg de protéines totales)}} \times 100$$

Nous avons ainsi effectué le calcul du pourcentage relatif d'incorporation des précurseurs utilisés dans la synthèse "de novo" des lipides totaux et des acides gras.

<u>Lipides totaux</u>	<u>Acides gras</u>
Glucose : 91 %	Glucose : 48 %
Acétate : 3 %	Acétate : 23 %
Propionate : 5 %	Propionate : 27 %

Il s'en suit que l'utilisation du glucose comme précurseur de lipides totaux est très nettement supérieure à celle des 2 autres substrats ; en revanche l'hépatocyte incorpore préférentiellement l'eau tritiée dans la synthèse "de novo" d'acides gras (tableau 9 et figure VI). D'après nos résultats, l'hépatocyte est capable d'incorporer jusqu'à 397 ± 117 micromoles d'eau tritiée dans les acides gras synthétisés "de novo" pendant 180 min et cela en dehors de toute stimulation hormonale.

TABLEAU IV - Lipogénèse d'hépatocytes isolés de lapin normal adulte nourri "ad libitum". Effets de l'insuline. Nature du précurseur.

Précurseur	LIPIDES TOTAUX				ACIDES GRAS			
	cpm p. 10 ⁶ cellules p. 180 min.	Insuline 1 mU/ml	cpm p. mg de protéines totales	Insuline 1 mU/ml	cpm p. 10 ⁶ cellules p. 180 min.	Insuline 1 mU/ml	cpm p. mg de protéines totales	Insuline 1 mU/ml
Bouc tritico [5]	Témoins 0		Témoins 0		Témoins 0		Témoins 0	
	71 ± 23	100* ± 32	115 ± 54	125* ± 39	90 ± 25	94 ± 18	141 ± 59	138 ± 44
Glucose [9]	Témoins 0		Témoins 0		Témoins 0		Témoins 0	
	894 ± 199	639 ± 186	856 ± 108	625 ± 165	14 ± 6	19 ± 6	23 ± 13	30 ± 14
Acéarate [3]	Témoins 0		Témoins 0		Témoins 0		Témoins 0	
	22 ± 5	46* ± 1	32 ± 4	72* ± 13	8 ± 3	13 ± 4	11 ± 3	19 ± 3
Propionate [3]	Témoins 0		Témoins 0		Témoins 0		Témoins 0	
	36 ± 8	37 ± 8	52 ± 3	58 ± 14	8 ± 2	10 ± 1	13 ± 3	17 ± 1

[] Nombre d'animaux * Valeur significativement différente de la valeur témoin sans hormone au seuil de 0,05.
 La lipogénèse de l'hépatocyte isolé de lapin est effective comme le montre l'incorporation du tritium et éventuellement le glucose qui fournit les carbones de cette biosynthèse.

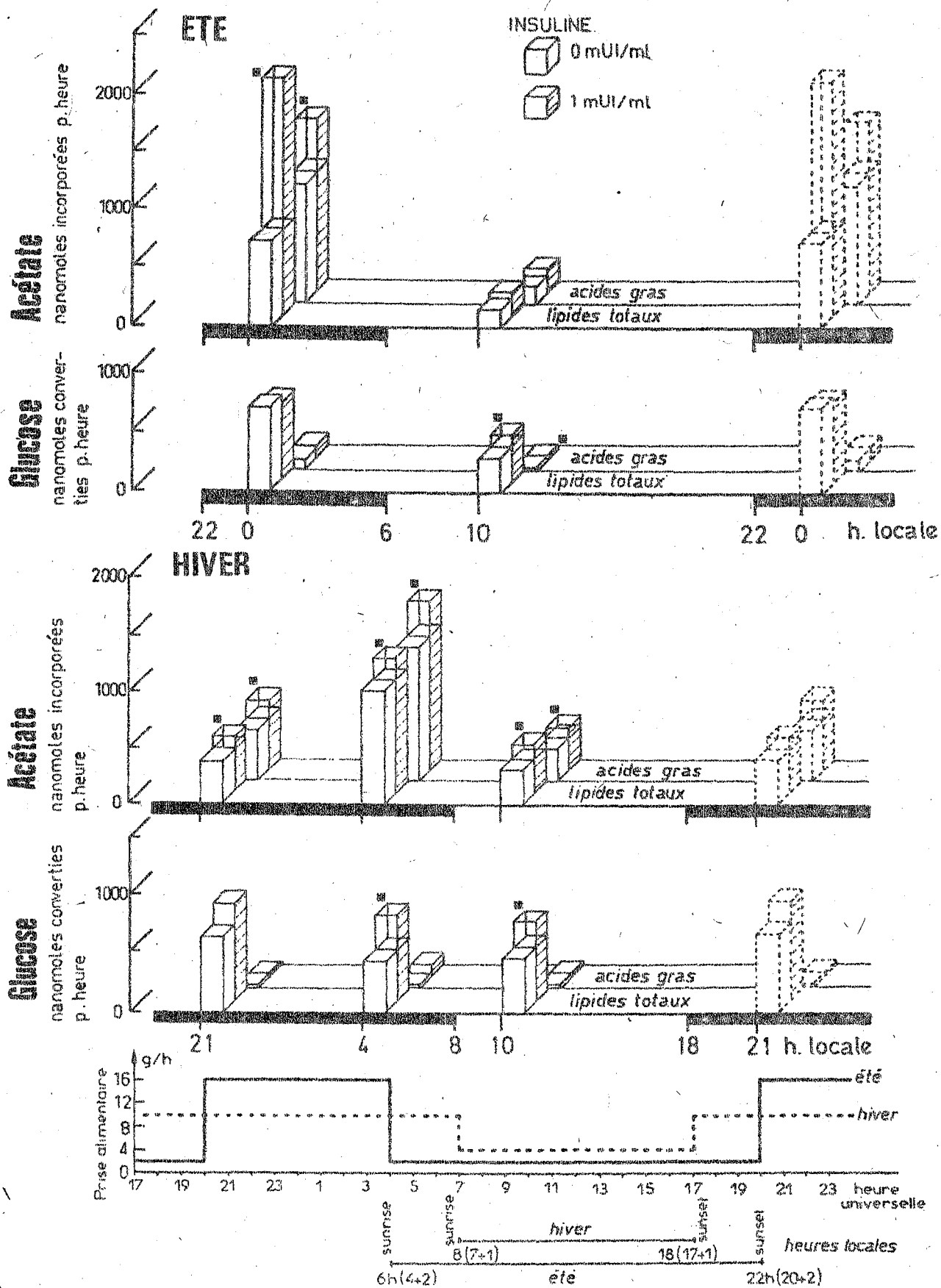


Figure XII - Activité lipogénique adipocytaire du lapin de 60 jours nourri "ad libitum"
 Effets de l'insuline - Cycles circadien et circannuel.

Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0,05.

- Cycles circadiens

L'activité lipogénique de l'adipocyte dépend de la photopériode. Si nous examinons la lipogénèse d'acides gras à partir de l'acétate nous constatons qu'en période diurne le niveau est à 150 ± 24 nmoles d'acétate incorporé par heure alors qu'à minuit il est huit fois plus élevé (1032 ± 586), ou encore de 301 ± 115 à 10 heures du matin pour 1196 ± 286 à 4 heures du matin. Pour la triglycérogénèse nous passons de 150 à 10 heures à 734 nmoles à minuit. Quant à la lipogénèse à partir du glucose, elle présente aussi un rythme circadien avec un maximum nocturne ; en synthèse d'acides gras : pour 19 nmoles en période diurne nous obtenons 82 à minuit ; en terme de triglycérogénèse, le jour la synthèse est de 310 ± 47 nmoles par heure pour 722 96 à minuit, ou bien encore de 427 ± 82 à 10 heures et 654 ± 136 à 21 heures.

Il est donc incontestable qu'il existe un rythme circadien de la lipogénèse de l'adipocyte, elle s'effectue en période nocturne chez le lapin.

- Effets de l'insuline (tableau VIII, figure XII)

Pour évaluer quantitativement les effets éventuels lipogéniques de l'insuline nous avons calculé le pourcentage de stimulation par le rapport :

$$\frac{\text{Lipogénèse stimulée} - \text{lipogénèse spontanée}}{\text{Lipogénèse spontanée}} \times 100$$

Tant le jour que la nuit, en hiver, l'insuline (1 mUI/ml) accroît significativement la biosynthèse des lipides à partir de l'acétate ; en revanche en été l'action stimulante de l'insuline ne se manifeste qu'en période nocturne et en outre c'est à ce moment là que ses effets sont les plus amples (+ 179 %).

Les effets de l'insuline sur la lipogénèse à partir du glucose sont moins systématiques. Compte tenu de la discrétion de la synthèse des acides gras à partir de ce substrat, le sens des stimulations insuliniques que nous observons est peu significatif. Par contre la triglycérogénèse est stimulée en fin de nuit et en période diurne.

Le fait le plus remarquable est l'existence d'un cycle circadien des effets lipogéniques de l'insuline à partir de l'acétate comme substrat précurseur en été ; à ce moment là l'insuline n'agit que la nuit et avec une grande efficacité.

POURCENTAGE DE STIMULATION PAR L'INSULINE 1 mUI/ml

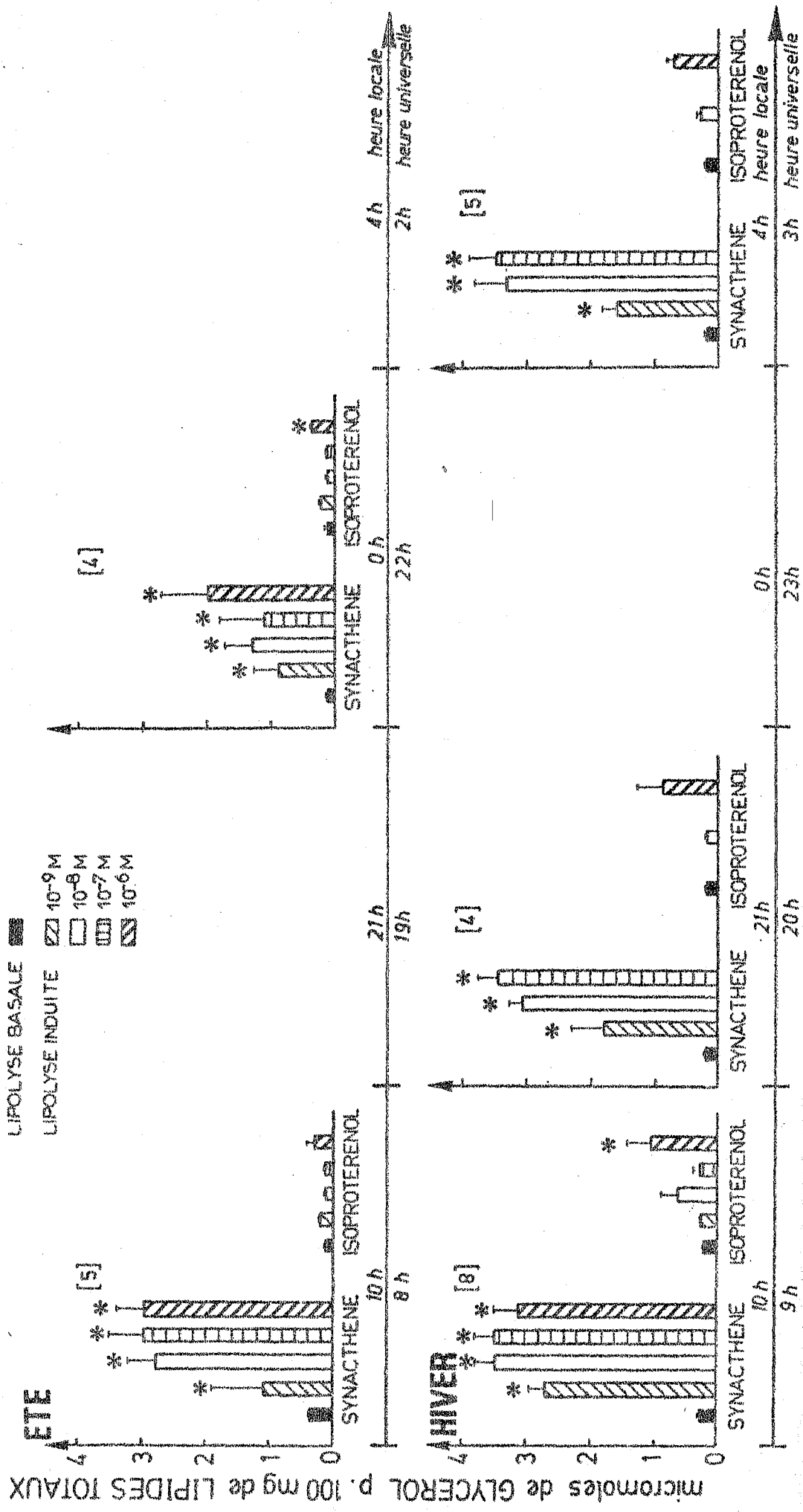
LIPIDES TOTAUX				ACIDES GRAS			
JOUR	NUIT			JOUR	NUIT		
10 h	21 h	0 h	4 h	10 h	21 h	0 h	4 h

	PRECURSEUR			ACETATE		
ETE	NS		+ 179	NS		+ 44
HIVER	+ 46	+ 26	+ 20	+ 31	+ 34	+ 24

	PRECURSEUR			GLUCOSE		
ETE	+ 25		NS	+ 32		NS
HIVER	+ 55	NS	+ 73	NS	+ 33	NS

NS = variation non significative

Figure XIII - Cycles circadien et circannuel de l'activité lipolytique de l'adipocyte isolé du tissu adipeux péri-rénal de lapin de 60 jours nourri "ad libitum" - Influence hormonale.



[] Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0.05.

TABEAU IX - Cycles circadien et circannuel de la lipolyse spontanée et induite par le synacthène et l'isoprotérénol des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal de lapins de 60 jours nourris "ad libitum"

LIPOLYSE exprimée en Glycérol micromoles p. cent mg lipides totaux											
Témoins		Synacthène M				Témoins		Isoprotérénol M			
0		10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	0		10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
ETE											
JOUR [5] (10 h)	0,37* ±0,05	1,16* ± 0,70	2,77* ± 0,44	2,94* ± 0,50	2,93 ± 0,40	0,37 ± 0,05	0,42 ± 0,09	0,36* ± 0,04	0,42 ± 0,05	0,47* ± 0,04	
NUIT [4] (0 h)	0,13 ± 0,02	0,85 ± 0,42	1,32 ± 0,37	1,10 ± 0,74	2,03 ± 0,66	0,13 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,13 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,35 ± 0,06	
HIVER											
JOUR [8] (10 h)	0,25 ± 0,04	2,71** ± 0,24	3,52** ± 0,26	3,50* ± 0,31	3,15 ± 0,33	0,25 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,64* ± 0,26	0,31 ± 0,10	1,05 ± 0,40	
NUIT [4] (21 h)	0,22 ± 0,06	1,77* ± 0,49	3,07* ± 0,16	3,45 ± 0,22		0,22 ± 0,06		0,22 ± 0,05		0,86 ± 0,36	
NUIT [5] (4 h)	0,20 ± 0,04	1,59* ± 0,22	3,29* ± 0,48	3,44* ± 0,43		0,20 ± 0,04		0,28 ± 0,06		0,65 ± 0,15	

[] Nombre d'animaux

☐ Valeurs significativement différentes de la valeur témoin sans "hormones" correspondantes au seuil de 0,05

* Valeurs "jour" significativement plus élevées de la valeur "nuit" correspondante au seuil de 0,05

• Valeurs "lipolyse induite" en hiver significativement plus élevées de la valeur d'été correspondantes au seuil de 0,05

Nous observons des cycles circadiens de la lipolyse basale et induite par le synacthène et l'IPR avec un maximum diurne.

Il existe aussi un cycle circannuel de la lipolyse induite par le synacthène, elle est maximale en hiver.

b) *Cycles de l'activité lipolytique et des influences hormonales (synacthène et isoprotérénol) (tableaux analytiques 22 et 23) résumés dans le tableau IX et la figure XIII.*

- Effets du synacthène

Il existe un cycle circadien des effets lipolytiques du synacthène. En effet en phase diurne, le synacthène, analogue synthétique de l'ACTH, augmente la lipolyse de manière considérable ; la dose minimale efficace est de 10^{-6} en hiver et de 10^{-8} M en été et les pourcentages de stimulation sont respectivement de + 649 et de + 984 %.

L'adipocyte ne présente qu'une faible réactivité bêta-lipolytique ; toutefois on peut déceler une variation circadienne. Si, en été dans la journée même à forte concentration (10^{-6} M) l'IPR n'a aucun effet sur la lipolyse basale, par contre toujours dans la journée, mais en hiver, à cette même dose (10^{-6} M) nous observons un pourcentage de stimulation de + 320 %. De même la nuit, seule la forte concentration de 10^{-6} M stimule efficacement la lipolyse basale (+ 169 % en été et + 225 % en hiver).

Ainsi l'adipocyte a une réactivité lipolytique maximale au synacthène en phase diurne et ce phénomène circadien est plus exagéré l'hiver que l'été. Les effets lipolytiques de l'IPR ne se manifestant qu'à des doses certainement pharmacologiques ne peuvent être pris en considération.

II - LES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCANNUELS

A - LA DISPONIBILITE PLASMATIQUE EN SUBSTRATS ENERGETIQUES (TABLEAU VI, figure X).

Les principaux constituants plasmatiques varient non seulement au cours du nyctémère mais aussi en fonction des saisons ; nous observons pour les lipides totaux plasmatiques, l'hiver, la nuit, un taux de 693 ± 66 mg p. cent ml de plasma à 4 heures pour, l'été, à minuit une valeur de 215 ± 85 ; ceci se retrouve au niveau des triglycérides (+ 30 %) et du cholestérol total (+ 71 %) et même de la glycémie (294 ± 13 mg p. cent ml de plasma contre 139 ± 17).

B - LES RESERVES ENERGETIQUES AU NIVEAU DU FOIE (TABLEAU VI, FIGURE X).

Au niveau du foie il n'y a pas de variations circannuelles très remarquables pour le taux des réserves énergétiques. Le poids du

foie semble plus élevé en hiver qu'en été, bien que cette différence ne soit pas significative statistiquement ; toutefois cet accroissement est probable car le rapport poids du foie/poids du corps augmente lui significativement, ce phénomène est surtout remarquable en période nocturne.

Les réserves lipidiques diurnes du foie ne présentent pas de variations significatives entre l'été et l'hiver ; en revanche, en phase nocturne l'hiver nous notons une surcharge lipidique très supérieure à celle observée l'été (5 g p. cent g de foie frais contre 2,30) quant au cholestérol total et au glycogène hépatiques ils ne varient pas de façon remarquable au cours du cycle saisonnier.

Il ressort de cette analyse quantitative des réserves énergétiques du foie du jeune lapin de deux mois au cours du cycle saisonnier l'existence d'une surcharge lipidique nocturne hivernale.

C - MOBILISATION ET ELABORATION DES RESERVES ENERGETIQUES AU NIVEAU DE L'ADIPOCYTE

1 - Cycles circannuels de l'activité lipogénique et des effets de l'insuline (Tableau VIII, figure XII)

Rappelons que chez le lapin nous avons montré un cycle circadien de la lipogénèse de l'adipocyte avec un maximum nocturne.

Lorsque le substrat donneur de carbones est l'acétate, on n'observe pas de variation circannuelle des lipogénèses diurnes basale et induite par l'insuline (1 mUI/ml). Par ailleurs si la lipogénèse est plus élevée la nuit que le jour, dans l'état actuel de notre expérimentation nous ne pouvons pas déceler de variations saisonnières. En revanche l'ampleur des effets lipogéniques de l'insuline présente, elle, un cycle circannuel ; ainsi la stimulation insulinique est particulièrement intense l'été comparativement à l'hiver.

L'étude des variations saisonnières de la lipogénèse nocturne à partir du glucose au niveau de l'adipocyte du tissu adipeux périrénal montre qu'en été l'incorporation des carbones marqués de ce substrat dans les lipides totaux (élaboration de l'alpha-glycérophosphate des triglycérides) est légèrement mais significativement supérieure à celle observée en hiver (722 ± 96 nmoles p. heure à minuit contre 654 ± 136 et 423 ± 54 respectivement à 21 heures et 4 heures en hiver).

L'effet lipogénique de l'insuline est significatif le jour tout au long du cycle annuel, par contre la nuit, cette hormone n'est stimulante qu'en hiver ; on note toutefois une variation quantitative de cette stimulation.



2 - Cycles circannuels de l'activité lipolytique et des influences hormonales (synacthène et isoprotérénol) (tableau IX, figure XIII)

Rappelons que la lipolyse de l'adipocyte isolé est circadienne avec un maximum diurne. La sensibilité de l'adipocyte au synacthène est plus élevée en hiver qu'en été tant le jour que la nuit. Dès la dose de 10^{-6} M le synacthène est deux fois plus lipolytique l'hiver que l'été, le jour comme la nuit et il en est de même avec la dose de 10^{-8} M.

Ainsi il apparaît que l'activité lipolytique induite par le synacthène est maximale en hiver.

En revanche l'isoprotérénol, dont les effets lipolytiques sont discrets même à forte dose (10^{-6} M), ne présente pas d'effets variables au cours du cycle saisonnier.

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous avons vu que le jeune lapin de deux mois a un rythme circadien de la prise alimentaire et qu'environ 70 % de la ration sont consommés la nuit, il en est de même chez le lapin adulte (GEISELMAN et alii, 1980 ; CHEVILLARD et alii, 1939 ; SANDERSON et VANDER WEBLE, 1975). Chez le rat, ce cycle de la prise alimentaire est connu quantitativement depuis les travaux de RICHTER (1927) confirmés par BASH (1939) et BAKER (1953) ; la quantité d'aliments ingérés la nuit est considérable avec des pourcentages de 61, 67, 70, 85 et 91 selon les auteurs (BALAGURA et alii, 1968 ; GOLD et alii, 1975 ; LE MAGNEN et alii, 1966 ; SIEGEL et alii, 1947 ; ZUCKER, 1971). LE MAGNEN et alii, (1966) attribuent cette ingestion maximale nocturne chez le rat à une dépense métabolique supérieure au cours de la nuit, ce qui a été vérifié par divers auteurs ; en outre, ARMS-STRONG (1980) pense que l'excédent de nourriture est utilisé par l'animal pour réaliser ses propres synthèses en particulier les réserves lipidiques alors que dans la journée, le rat mobiliserait ces graisses synthétisées durant la nuit précédente (LE MAGNEN et alii, 1970 ; 1973).

Le problème qui est posé tant aux comportementalistes qu'aux endocrinologistes et chercheurs sur le métabolisme est la définition des relations circadiennes entre les observations sur le comportement alimentaire, l'activité générale du sujet, et la mobilisation et l'élaboration des réserves énergétiques du foie et du tissu adipeux. Le cycle circadien de la prise alimentaire conditionnant les gains énergétiques du sujet est-il la cause des mises en réserves et des mobilisations qui ne seraient alors que des effets de ce cycle alimentaire ou bien existerait-il un rythme des mises en réserve et mobilisation qui conditionnant les disponibilités intracellulaires en substrats énergétiques disponibles, commanderait à la prise alimentaire ? La question est donc de passer de l'observation des coïncidences à l'affirmation des relations causales.

Pour notre part nous rapportons des observations de coïncidence et l'objet de nos prochains travaux sera d'appréhender les relations causales.

A - DES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCAIDIENS

1 - Des disponibilités énergétiques

Au niveau plasmatique (glucose et lipides) nous mettons en évidence un rythme circadien avec des maxima nocturnes. Des variations nycthémérales de la glycémie ont déjà été observées chez le rat (PITTS, 1943 ; PAULY et alii, 1967) et la vache allaitante (ALCROFT, 1933). Selon PITTS (1943) ce rythme serait indépendant de la prise alimentaire chez le rat puisqu'il persiste pendant 48 heures chez l'animal à jeun, par ailleurs on le retrouve chez des animaux nourris seulement pendant 8 heures en phase diurne. En revanche, chez l'homme le rythme de la glycémie serait intimement lié à la prise alimentaire (LAKATUA et alii, 1974). En ce qui concerne les lipides plasmatiques il a été montré chez le rat une étroite relation avec la photopériode (SCOTT et alii, 1970 ; LE MAGNEN et alii, 1970).

Selon FULLER et alii (1970), l'évolution du glycogène hépatique et des acides gras libres plasmatiques (A.G.L.) est diamétralement opposée au cours du nycthémère chez des rats nourris "ad libitum", ainsi quand les A.G.L. plasmatiques sont à leur maximum diurne le glycogène hépatique est à son plus bas niveau. Chez le lapin nous observons aussi une chute du glycogène hépatique en phase diurne accompagnée d'un accroissement très important de la lipolyse des adipocytes déversant les acides gras dans la circulation générale. Pour FULLER et alii (1970) le rat de la période nocturne est complètement différent de celui de la phase diurne, d'un point de vue métabolique, quant à l'origine et au devenir des disponibilités énergétiques plasmatiques. Nous pensons qu'il en est de même chez le lapin. Inversement chez l'homme à activité générale diurne le taux maximum des A.G.L. plasmatiques est rencontré pendant la nuit (BARTER et alii, 1971).

Des variations dans la charge lipidique et glucidique du foie ont été observées au cours du nycthémère chez le rat et elles sont synchrones de la prise alimentaire (EKMAN et alii, 1949 ; FULLER et alii, 1970 ; PERET et alii, 1973) ; il en est de même chez la souris (HAUS et alii, 1966) ; toutefois la notion de cycle circadien n'est pas encore exprimée en 1949 chez EKMAN. Pour notre part, nous mettons aussi en évidence, mais chez le lapin des cycles circadiens des réserves énergétiques (lipides et glycogène) au niveau du foie avec une surcharge nocturne c'est-à-dire en coïncidence avec la prise alimentaire maximale. La description d'un rythme circadien de la charge en glycogène a été aussi observé par AGREN et alii dès 1931 chez la souris, le rat et le lapin, chez ce dernier il semblerait que l'amplitude du cycle au niveau du muscle soit la plus élevée. Selon ARMSTRONG (1980) l'accumulation nocturne du glycogène hépatique aurait

pour origine les sucres de la digestion mais aussi une néoglucogénèse à partir d'acides aminés provenant de la digestion des protéines alimentaires. Les causes de l'élévation du taux de glycogène sont encore débattues, pour certains les précurseurs sont les nutriments provenant de la prise alimentaire mais AGREN et alii (1931) et HAUS et alii (1966) qui observent cette surcharge hépatique chez des souris et des rats à jeun mettent en doute cette affirmation.

2 - Des cycles lipogénèse-lipolyse et des effets de l'insuline au niveau de l'hépatocyte et de l'adipocyte

- De la Lipogénèse de l'hépatocyte

Des variations des équilibres hormonaux conjointement à la prise alimentaire et aux rythmes métaboliques ont largement été décrites chez plusieurs espèces de mammifères. Selon la littérature, chez le rat au pic d'ingestion nocturne correspondent une insulïnémie et une intense lipogénèse hépatique (PERET et alii, 1973) ; et une importante glycogénèse (FULLER et alii, 1970). Chez le rat, PERET et alii (1973) décrivent une forte glycogénolyse matinale et une mobilisation des acides gras libres en fin de journée a été observée par BORTZ (1973), FULLER et alii (1970), LE MAGNEN et alii (1970) et LE MAGNEN et DEVOS (1973), suivie d'une néoglucogénèse (SUDA et alii, 1973). Diverses recherches ont montré qu'il existe une variation circadienne des activités enzymatiques du foie (FULLER, 1971 ; PERET et alii, 1976) impliquées dans les mécanismes précédents.

Pour notre part, au niveau de l'hépatocyte, nous mettons en évidence des variations circadiennes de la lipogénèse qui est minimale la nuit alors qu'au même moment il y a une activité de stockage importante en graisses et en glycogène. Ainsi nous mettons en évidence une dissociation dans l'activité de l'hépatocyte : la nuit l'hépatocyte, chez le lapin, stocke des lipides mais ne les synthétise pas ; il est donc nécessaire chez cet animal d'envisager l'existence d'un autre site de la synthèse des lipides en phase nocturne et nous avons vu que c'est l'adipocyte.

Ainsi nos résultats s'ils s'opposent, dans les voies métaboliques impliquées, à ceux de PERET et alii (1973), le bilan pour l'animal, tant le lapin pour nous, que le rat pour PERET et alii (1973), reste le même, à savoir une accumulation lipidique au niveau du foie en phase nocturne lors de la prise alimentaire. Chez le rat, il s'agirait d'une lipogénèse hépatique conduisant à la surcharge graisseuse du foie en période nocturne ; ainsi PERET et alii (1973) travaillant sur des fragments de foie montrent un maximum d'activités enzymatiques de la lipogénèse (Glucose-6-P- déshydrogénase, enzyme malique et de l'acétyl-CoA) la nuit. Par ailleurs ces auteurs montrent l'augmentation nocturne de la pyruvate kinase (PK) impliquée dans la glycogénolyse, accroissement qui est concomitant de l'ingestion de nourriture (glucides) et de l'augmentation circadienne de l'insulïnémie. Ces observations divergentes peuvent être le fait de différences interspécifiques, rat-lapin, mais aussi d'approches expérimentales technologiques dissemblables. Notons par ailleurs que le rat et le lapin diffèrent l'un de l'autre au niveau de la localisation des enzymes impliquées dans la lipogénèse, néoglucogénèse

cogénèse et glycogénolyse ; ces enzymes sont cytoplasmiques chez le rat et à la fois cytosoliques et mitochondriales chez le lapin. En outre, ces deux espèces diffèrent par la composition du régime alimentaire (FREEDLAND et SZEPESI, 1971). En effet le contrôle nutritionnel sur les activités enzymatiques joue un rôle important en particulier celui de stabiliser l'ARN messager (KENNEY, 1970) impliqué dans les mécanismes de synthèse enzymatique.

- De la Lipogénèse de l'adipocyte

L'étude "in vitro" de la lipogénèse du tissu adipeux périrénal du lapin de 60 jours, au cours du nyctémère, nous permet de confirmer en période diurne les observations de SMITH (1975), de VEZINHET (1976) et au laboratoire de ALAOUI et alii (1982) et de CATANZANO (1984) : l'acétate constitue le précurseur privilégié de la synthèse "de novo" des acides gras quelle que soit la saison (été ou hiver). L'originalité de notre travail est de démontrer pour la première fois l'existence d'un cycle nyctéméral de la lipogénèse de l'adipocyte, ainsi la biosynthèse des acides gras à partir de l'acétate est 8 fois plus intense la nuit que le jour, de même à partir du glucose c'est la nuit que le précurseur est le mieux utilisé. Chez le lapin, le glucose comme donneur de carbones au niveau de l'adipocyte n'est pas quantitativement négligeable puisque ce substrat fournit l'alpha-glycérophosphate nécessaire à la synthèse des triglycérides à partir d'acides gras préexistants dans la cellule adipeuse ; par conséquent, le glucose intervient dans l'accumulation diurne des substrats énergétiques (triglycérides) ; chez le rat pour PANKSEPP (1973) il en est de même.

Il ressort de nos investigations que le lapin, monogastrique, herbivore, coecotrophe, serait proche des ruminants, polygastriques, qui utilisent eux aussi l'acétate comme précurseur quasi-exclusif de la synthèse des acides gras (SAGGERSON, 1974 ; SMITH, 1975 ; VEZINHET, 1976) alors que les autres mammifères monogastriques utilisent préférentiellement le glucose comme source essentielle de carbones pour cette synthèse (FLATT, 1970 a). Notons en outre que la lipogénèse à partir de l'acétate comme du glucose est plus importante l'été que l'hiver.

Chez l'homme qui s'oppose au lapin et au rat par son comportement diurne, on observe des variations circadiennes des constituants hépatiques et plasmatiques avec une augmentation nocturne des triglycérides plasmatiques et des acides gras libres ; et BARTER et alii (1971) observent une lipogénèse matinale accrue et une lipolyse nocturne élevée ce qui correspond à une importante lipolyse nocturne qui sera suivie le jour d'une lipogénèse lors des prises alimentaires. Donc à des cycles d'activités générales inversés correspondent des cycles métaboliques inversés.

Les auteurs qui travaillent sur le lapin ont toujours remarqué la faible part du glucose dans la lipogénèse. Pour SHRAGO et alii (1971) et SMITH (1975) il est probable que la faible capacité du tissu adipeux à convertir le glucose en acides gras ne résulterait pas,

comme chez les ruminants, d'une déficience en enzymes de clivage du citrate (l'ATP citrate-lyase) permettant la sortie d'acétyl CoA de la mitochondrie, mais serait plutôt due à une faible activité de deux enzymes importantes de la glycolyse : l'hexokinase (glucokinase) et la pyruvate kinase, signalons que chez le rat, ces deux enzymes subissent des variations circadiennes (PERET et alii, 1976). La lipogenèse maximale nocturne que nous décrivons chez l'adipocyte à partir du glucose serait en accord avec des activités maximales nocturnes des enzymes de la lipogenèse, par conséquent, la nuit, l'adipocyte de lapin pourrait convertir le pyruvate en acides gras à des taux comparables à ceux observés chez des animaux "non ruminants". La convergence métabolique du lapin et des ruminants dans l'utilisation préférentielle de l'acétate pourrait trouver son explication dans le fait que le lapin est aussi un herbivore ayant, outre son comportement coecotrophique, une importante flore microbienne intestinale qui pourrait produire de fortes quantités d'acides acétique, propionique et butyrique lors de la digestion. Les travaux de HENNING et HIRD (1972) iraient en faveur d'une telle hypothèse et tendraient à présenter le lapin comme un animal plus proche, à cet égard, des ruminants que des monogastriques si l'on compare la production d'acides gras volatils résultant de la digestion dans le coecum du lapin et dans le rumen des ruminants. Cependant, cette hypothèse ne peut être considérée à notre sens qu'avec une certaine circonspection car l'hépatocyte du lapin est incapable d'utiliser l'acétate et le propionate dans la biosynthèse des lipides.

Pour sa part SZAS (1982) chez le blaireau et le renard, tous deux monogastriques, a aussi constaté que leurs adipocytes transformaient mal le glucose en graisses. Toutefois il s'agit là d'expériences effectuées en période diurne chez les animaux à comportement nocturne. Il serait nécessaire d'évaluer chez ces animaux l'utilisation nocturne du glucose par l'adipocyte afin de vérifier l'influence de la composante circadienne dans ces résultats. Il semblerait donc que chez les monogastriques le patrimoine génétique d'enzymes intervenant dans la lipogenèse puisse être qualitativement modifié par des activités enzymatiques plus ou moins réprimées (surtout en phase diurne chez le lapin) en réponse à une adaptation métabolique vis-à-vis du régime et du comportement alimentaire de l'espèce.

- Des effets de l'insuline

Au niveau du foie, la nuit, l'insuline stimule tout à la fois la biosynthèse des acides gras comme le montre l'utilisation du tritium et surtout l'incorporation des carbones, provenant du glucose, dans la biosynthèse des lipides dans l'hépatocyte isolé. En revanche, en phase diurne l'insuline n'a pas d'influence significative sur l'incorporation des carbones du glucose impliqué dans cette même voie.

Au niveau de l'adipocyte, les effets lipogéniques et antilipolytiques de l'insuline sont bien connus chez le rat (DESAI et ANGEL, 1973) et l'homme (JACOBSSON, 1976). WINEGRAD et RENOLD

(1958), MEHLMAN et HANSON (1972), CAYGILL et STEIN (1972), TROSPER et alii (1977) et WIERINGA et alii (1978), sur le tissu adipeux de rat, ont montré que ces effets de l'insuline résultent d'actions cellulaires multiples: augmentation de la captation globale adipocytaire du glucose, formation accrue d'alpha-glycérophosphate, synthèse et réestérification des acides gras (GLIEMANN, 1968), diminution du catabolisme des triglycérides consécutives à la baisse du taux intracellulaire de l'AMPcyclique.

En opposition aux autres espèces de mammifères, chez le lapin la plupart des auteurs mettent en exergue le peu d'effet de l'insuline sur la lipogenèse des adipocytes. Or en étudiant l'action de cette hormone au cours du cycle circadien nous démontrons qu'en fait l'insuline est lipogénique mais la nuit, cette observation originale explique désormais la lipogenèse chez le lapin ce qui était difficilement compréhensible à partir des travaux effectués en période diurne. Ainsi si nous confirmons, en été, que la lipogenèse diurne de l'adipocyte à partir de l'acétate est peu sensible aux effets de l'insuline comme l'ont montré DI GIROLAMO et RUDMAN (1966), VEZINHET (1976), ALAOUI et alii (1982) et CATANZANO (1984), par contre, pendant la nuit, nous décrivons alors des effets lipogéniques de l'insuline très significatifs sur la biosynthèse des lipides dans les adipocytes tant l'été que l'hiver.

L'utilisation d'espèces différentes et d'âges différents mais toujours étudiés en période diurne (SCOTT, 1971 ; VEZINHET, 1976 ; ROUS, 1977) est à l'origine de la controverse sur les effets lipogéniques de l'insuline au niveau du tissu adipeux. Pour notre part, nous montrons que l'insuline a une activité lipogénique circadienne et que par suite en tenant compte de cette propriété il est possible que les controverses cessent.

Quant à l'utilisation du glucose comme donneur de carbone, contrairement à DI GIROLAMO et RUDMAN (1966) mais en accord avec SAGGERSON (1974) et CATANZANO et alii (1986), nous avons pu mettre en évidence, chez le lapin, une action de l'insuline sur la lipogenèse diurne à partir de ce substrat ; l'insuline a donc un effet lipogénique non seulement dans la triglycérogenèse comme l'a montré CATANZANO (1984) mais aussi dans la biosynthèse d'acides gras au niveau de l'adipocyte.

- De l'adipocyte et lipolyse spontanée et induite par divers agents lipolytiques

L'étude de la lipolyse basale et induite par les hormones et divers agents lipolytiques a fait l'objet de nombreux travaux chez différentes espèces ; ont été étudiés, le rat (WHITE et ENGEL, 1958;

CAHILL et alii, 1960 a ; RUDMAN et alii, 1963 ; RUDMAN et DEL RIO, 1969 a), le cobaye (RUDMAN et alii, 1963 ; RUDMAN et DEL RIO, 1969 a, 1969 b), le Hamster (RUDMAN et alii, 1963 ; RUDMAN et DEL RIO, 1969 a), le porc (RUDMAN et alii, 1963 ; 1969), le chien (RUDMAN et alii, 1963 ; BERLAN, 1977), le mouton (VEZINHET, 1976), l'homme (RUDMAN et DEL RIO, 1969 a ; FAULHABER et alii, 1969 ; OSTMAN et EFFENDIC, 1970 ; GRIES, 1970 ; BURNS et alii, 1971 ; LAFONTAN et BERLAN, 1978 ; LAFONTAN, 1979), le canard (DESBALS et alii, 1970 b), le blaireau et le renard (PEJOAN et DESBALS, 1973), le hérisson (CHRAIBI, 1980) et des espèces désertiques comme le rat des sables et la gerbille (DAHMANI, 1981).

Chez le lapin, notre expérimentation met en évidence un cycle circadien de la réactivité lipolytique de l'adipocyte dans le sens d'une intense lipolyse diurne opposée à une activité nocturne réduite. Si de nombreux auteurs ont aussi rapporté les effets lipolytiques diurnes très puissants de l'ACTH (RUDMAN et alii, 1967 ; DESBALS et alii, 1970 a ; PEJOAN, 1976 ; RAMACHANDRAN et alii, 1976 b ; LAFONTAN, 1979) pour notre part nous décrivons un cycle circadien de la réactivité au synacthène qui induit une très intense mobilisation lipidique en phase diurne comparativement à la réponse nocturne.

Les effets bêta-lipolytiques de l'isoprotérénol (IPR) ne se manifestant qu'à de fortes doses ne peuvent être analysés qu'avec circonspection. En phase diurne, l'IPR n'exerce pas ses effets lipolytiques comme l'ont déjà signalés chez le lapin DESBALS et alii (1970 a) et PEJOAN (1976). Toutefois à la dose de 10^{-6} M, l'IPR stimule efficacement la lipolyse en été, la nuit et, en hiver le jour et la nuit. Par ces résultats, nous rapportons des variations de la réceptivité adrénérgique du tissu adipeux du lapin comme l'a observé en d'autres circonstances LAFONTAN (1979). Cet auteur pense que la réceptivité adrénérgique de l'adipocyte du lapin varie en fonction de l'âge et des conditions nutritionnelles. Nous démontrons qu'effectivement la réponse lipolytique, à l'IPR, maximale la nuit est synchronisée de la prise alimentaire. D'autres auteurs ont montré l'influence de l'alimentation sur la lipolyse basale ou stimulée (JUNGAS et alii, 1963 ; 1964 ; GORMAN et alii, 1973 ; SMITH et alii, 1974).

Des variations nycthémérales de la lipolyse basale des adipocytes de rat ont été observées par BORTZ (1973) et FULLER et alii (1970) ; pour eux, le niveau lipolytique élevé le jour permet l'élévation du taux des acides gras libres plasmatiques observée dans la phase diurne.

B - DES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCAIENS

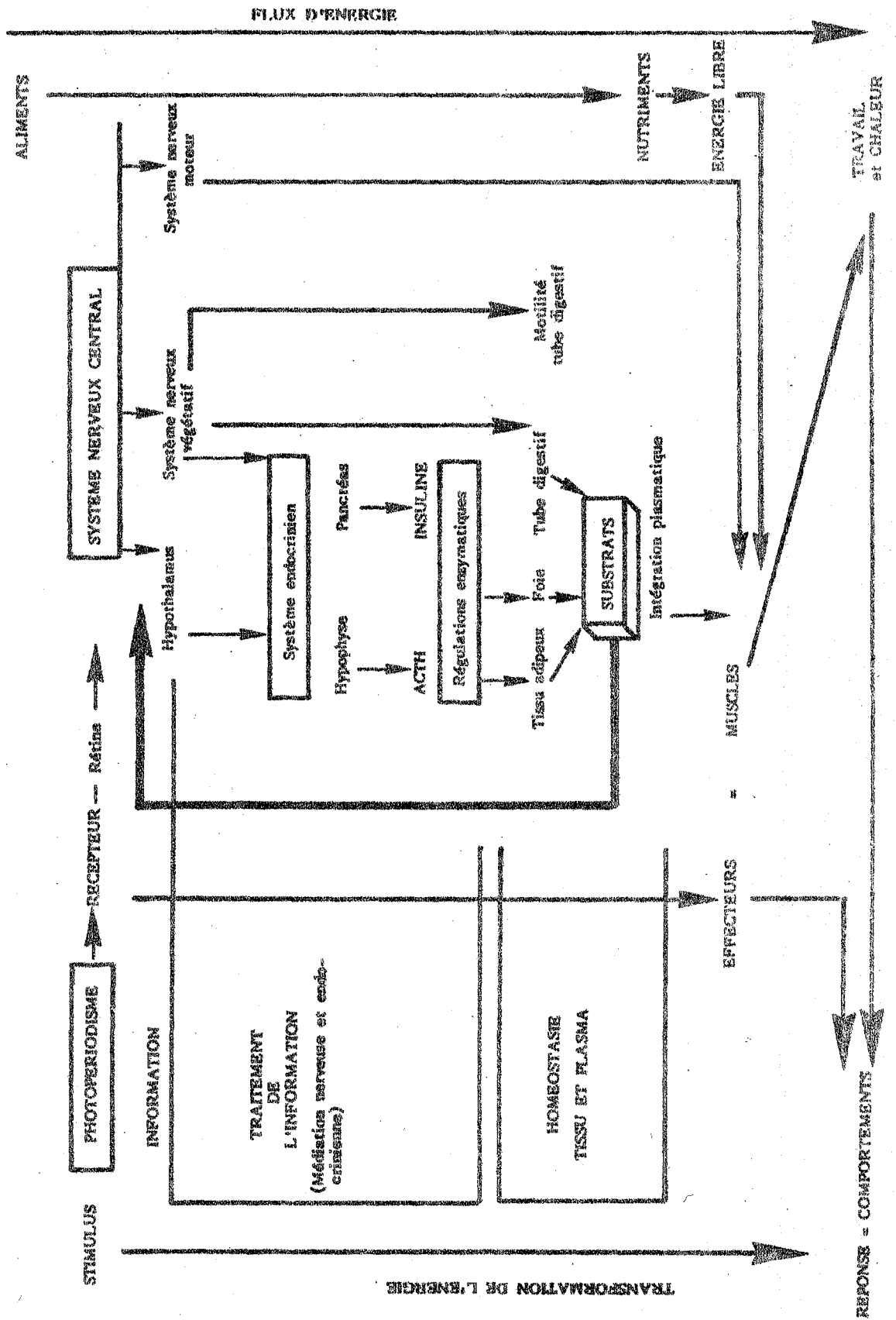
Il apparaît nettement, au vu de nos résultats que des différences métaboliques existent entre l'hiver et l'été chez le lapin. Ainsi il y a des variations saisonnières du niveau des réserves énergétiques au niveau du foie (lipides) et des nutriments plasmatiques (lipides et glucose).

En été, l'accumulation des réserves énergétiques est considérable pendant la nuit ; en effet nous observons une intense lipogénèse nocturne au niveau de l'adipocyte avec simultanément une efficacité lipogénique très importante de l'insuline. Cette synthèse des graisses au niveau du tissu adipeux permet certainement l'accumulation lipidique que nous observons aussi au niveau du foie en cette même saison d'été. En revanche toujours en été, nous notons une faible activité lipolytique des adipocytes ce qui témoigne que l'été est la saison de l'engraissement.

Ainsi par cette expérimentation, nous mettons en évidence chez le lapin l'existence d'une lipogénèse nocturne, estivale et d'une lipolyse diurne hivernale au niveau de l'adipocyte. Nos résultats d'une part complètent ceux du laboratoire ; ALAOUI et alii (1982) et CATANZANO et alii (1986) avaient décrit une lipogénèse de l'adipocyte maximale en hiver et minimale au printemps en phase diurne ce que nous confirmons. En outre nous démontrons que pour l'adipocyte, le maximum d'activité lipogénique se situe au cours du cycle saisonnier annuel la nuit en été et cela tant à partir de l'acétate que du glucose comme précurseurs. Notre étude au cours du cycle annuel saisonnier des variations nycthémerales permet désormais d'interpréter plus justement la gestion de réserves énergétiques chez le lapin. Nos résultats quant à l'activité lipolytique de l'adipocyte en phase diurne sont conformes à ceux de la littérature chez le lapin, si LAFONTAN (1979) décrit sur l'adipocyte du lapin une lipolyse basale maximale en décembre-janvier, donc en hiver, par notre étude, nous mettons en outre en évidence l'existence d'un cycle circannuel de l'influence hormonale et ainsi nous avons constaté que les effets lipolytiques du synacthène sont bien plus élevés en hiver qu'en été, il en est de même pour les effets bêta-lipolytiques discrets de l'IPR.

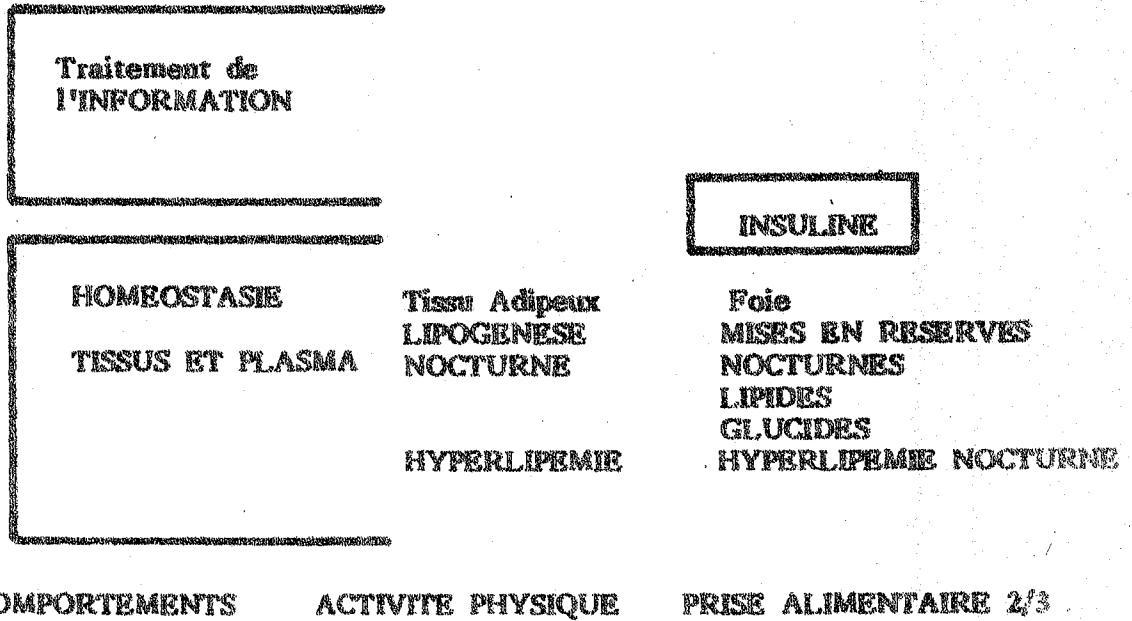
Nous avons donc observé, au niveau de l'adipocyte, une lipogénèse estivale nocturne insulino-dépendante et une lipolyse hivernale diurne ACTH-dépendante ; au niveau de l'hépatocyte il y a une mise en réserve lipidique et glucidique nocturne et une lipogénèse diurne ; tout ceci en coïncidence avec un rythme circadien de la prise alimentaire à dominante nocturne.

On peut s'interroger sur la signification de ces observations ; les réponses se trouvent dans l'évolution de l'espèce confrontée aux conditions physico-chimiques du milieu. La photopériode commandant à la végétation apparaît comme le facteur externe synchronisant les horloges biologiques internes fruits de l'évolution des espèces sur notre planète. Ces comportements rythmiques d'activités nutritionnelle et métabolique persistent dans les élevages, donc hors des contraintes écologiques. L'existence de tels comportements métaboliques cycliques chez le lapin qui persistent dans les élevages tant domestique qu'industriel, c'est-à-dire chez des animaux soumis toute l'année à la neutralité thermique, recevant une alimentation "ad libitum" en permanence, exprime le résultat de l'évolution en une régulation intrinsèque capable d'ajuster les activités au cours du nycthémer et au cours des variations saisonnières écologiques.

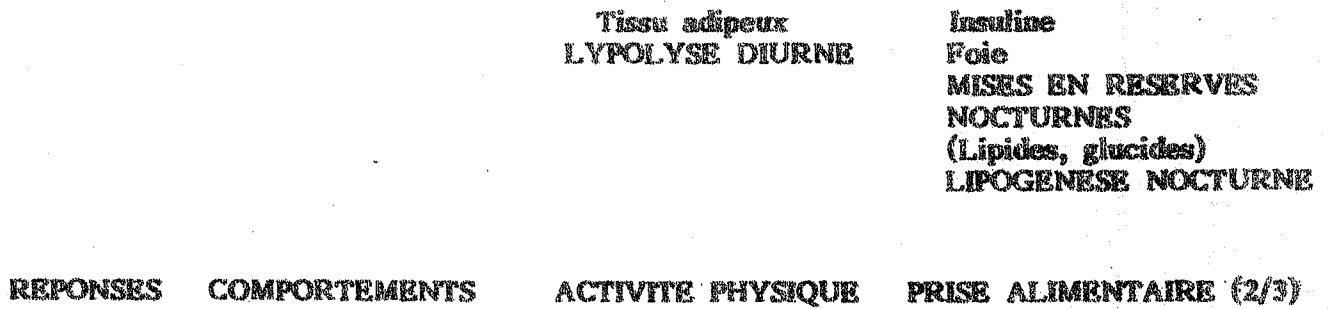


NOS RESULTATS

ETE : JOURS LONGS



HIVER : JOURS COURTS



L'autre question est celle du transfert des informations entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. En effet, les travaux d'ARMSTRONG (1980), chez le rat, rapportent le rôle primordial du contrôle nerveux (probablement par l'intermédiaire du système nerveux autonome) sur les activités enzymatiques du foie ; par ailleurs SHIMAZU (1976) a mis en évidence le rôle du lobe ventro-médian de l'hypothalamus sur la déplétion du glycogène hépatique chez le lapin lors des variations saisonnières. A la lumière de ces résultats, il est incontestable que le régulateur cyclique intrinsèque est une composante du système nerveux. Les travaux de BRANDENBURG et alii, 1981 ont basé le rythme circadien de la sensibilité de la rétine du lapin sur l'existence d'une boucle "Rétine - Hypothalamus - Rétine" dont le centre et l'horloge biologique seraient modulés par la rétine (BRANDENBURG et alii, 1983). Le schéma suivant tente d'interpréter les différentes voies de régulation des relations chez les mammifères.

Voulant découvrir les relations causales déterminant les variations cycliques des activités métaboliques du lapin tant circadiennes que circannuelles que nous venons de décrire, nos prochains travaux se consacreront à l'étude de leurs déterminismes nerveux et endocriniens et à la mise en évidence des synchroniseurs externes, par exemple le photopériodisme.

CHAPITRE III

CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT DU LAPEREAU

I - ETUDE QUANTITATIVE DE LA CROISSANCE DU LAPEREAU

II - ETUDE METABOLIQUE DE LA CROISSANCE DU LAPEREAU

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

CHAPITRE III

I - ETUDE QUANTITATIVE DE LA CROISSANCE DU LAPEREAU

A - ETUDE DE LA CROISSANCE PONDERALE DU LAPEREAU

B - EVOLUTION QUANTITATIVE DES CONSTITUANTS HEPATIQUES

a) Développement du foie,

b) Evolution des constituants hépatiques

C - EVOLUTION QUANTITATIVE DES CONSTITUANTS PLASMATIQUES

D - EVOLUTION DES CONSTITUANTS ENERGETIQUES HEPATIQUES ; APPROCHE HISTOCHIMIQUE

II - ETUDE METABOLIQUE DE LA CROISSANCE DU LAPEREAU

A - CROISSANCE ET HEPATOCYTE

1 - Evolution pondérale

2 - Lipogenèse de l'hépatocyte

B - CROISSANCE ET LIPOGENESE ET LIPOLYSE DE L'ADIPOCYTE

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A - DE LA CROISSANCE PONDERALE

B - DES MODIFICATIONS QUANTITATIVES AU NIVEAU DU FOIE ET DU PLASMA
LORS DE LA CROISSANCE

C - DES MODIFICATIONS METABOLIQUES AU NIVEAU DE L'HEPATOCYTE ET
DE L'ADIPOCYTE AU COURS DE LA CROISSANCE.

Les recherches sur la croissance pondérale chez le lapin sont déjà anciennes. Citons KIBLER et alii (1943) pour les thyroïdes, les surrénales et les gonades ; GIROD (1960) pour les surrénales ; CANTIER et alii (1969) traitant de l'allométrie de croissance en étudiant la croissance relative des différents organes et tissus (reins, tube digestif, glandes endocrines, organes sexuels, encéphale, ensemble des muscles, dépôts adipeux ...etc) et enfin BARON et alii (1970) sur le développement du thymus. Antérieurement, HAMMAR (1932) a présenté de très nombreux résultats de dissections de lapins communs suédois de divers âges, à partir desquels il effectue une analyse anatomique ainsi qu'une étude de la croissance pondérale des principaux organes et du tissu musculaire. Enfin ROBB (1928) étudie la croissance relative des glandes endocrines et de certains organes de lapins géants et pygmées et de leurs métis ; et HRACHOVEC (1956) donne pour certains organes les courbes d'évolution du poids relatif en fonction du logarithme de l'âge et celles du logarithme du poids en fonction du logarithme du poids corporel.

Pour notre part, il nous a paru intéressant de caractériser la croissance des lapereaux en étudiant l'évolution métabolique des réserves énergétiques au niveau de trois tissus : le foie, le tissu adipeux et le plasma ; par ailleurs nous avons cherché l'existence d'une éventuelle variation de cette évolution en relation avec l'état nutritionnel de l'animal. Dans cet objectif, nous avons considéré le lapereau à la naissance, à 10, 20, 28, 38, 60 jours après la naissance et enfin à l'âge adulte dont le poids est alors d'environ 3 kg.

A la naissance, les réserves lipidiques totales sont variables selon les espèces : si le rat nouveau-né est dépourvu de réserves lipidiques, en revanche, le lapin comme l'homme possèdent à la naissance des réserves importantes de graisses (6 % du poids corporel chez le lapin et 16 % chez l'homme) selon WIDDOWSON (1950, 1968) ; HUDSON et HULL (1975) ; Mc CANCE et WIDDOWSON (1977) chez le lapin nouveau-né les graisses qui représentent 6 % du poids corporel de l'animal sont surtout du tissu adipeux brun situé au niveau du cou et dans la région interscapulaire ; une semaine après la naissance et durant une période de 90 jours, on assiste à la transformation progressive de ce tissu brun en tissu adipeux blanc (DAWKINS et HULL, 1964 ; HULL et SEGAL, 1965 ; DERRY et alii, 1972). En effet, ce tissu adipeux brun joue un rôle fondamental dans la thermorégulation du nouveau-né. Etant donné cette évolution morphologique du tissu adipeux, nous avons étudié son métabolisme au cours de la croissance. Un ensemble d'auteurs (VEZINHET et PRUD'HON, 1969 ; TEBIBEL, 1983) ont montré une augmentation pondérale intense des tissus adipeux internes au cours de la croissance du lapereau ; le tissu adipeux périrénal par exemple double de poids entre 10 et 180 jours après la naissance et nous l'avons retenu pour nos investigations.

COMPOSITION CHIMIQUE DU LAIT DE LAPINE AUX DIVERS STADES DE LACTATION ET DE L'ALIMENTATION SOLIDE.

CONSTITUANTS	Composition en % du lait frais selon				Composition en % de l'aliment solide SANDERS
	COATES et alii (1964)	COWIE et alii (1969)	LEBAS et alii (1971)	PÉRRET et alii (1977)	
Colostrum 1er jour					
Matières sèches	32,6		31,4		
Matières protéiques		11	13,5	12,3	
Matières grasses	17,7	25 - 32	14,7	13,1	
Lactose	1,32	1,8 - 2	1,63	0,99	
Cendres			1,65		
Lait du 1er au 21ème jour					à partir du 15ème jour
Matières sèches	25,7		26,7		
Matières protéiques	11,9	11	13,1	12,7	16
Matières grasses	12,3	15 - 17	10,3	15,6	2
Lactose	1,12	1,8 - 2	0,95	1,09	Cellulose = 16
Cendres			2,36		
Lait du 21ème au 28ème jour					
Matières sèches			37,4		
Matières protéiques		18 - 20	16,9		
Matières grasses		25 - 30	17,5		
Lactose		0,59	0,20		
Cendres			2,78		

Par ailleurs chez le lapin, les tissus foetaux oxydent peu les acides gras qui sont stockés sous forme de triglycérides dans le foie et le tissu adipeux (GIRARD et alii, 1979) ; par ailleurs les réserves de glycogène hépatique sont épuisées juste après la naissance (10 à 12 h) selon SHELLEY (1961) et dans ces conditions le nouveau-né devrait posséder une néoglucogenèse active afin d'assurer la production de glucose. Nous avons donc choisi d'étudier simultanément l'adipocyte mais aussi les activités métaboliques de l'hépatocyte (lipogenèse) au cours de la croissance du lapereau.

Pour le lapereau, comme les autres mammifères, le lait maternel constitue le seul aliment du tout jeune âge et la croissance est fonction de la quantité de lait ingérée et de sa qualité (LEBAS, 1971). A la naissance, les apports nutritionnels d'origine maternelle cessent et le lapereau nouveau-né, après une courte période de jeûne, est alimenté avec un lait riche en lipides et relativement pauvre en glucides (LUCKEY et alii, 1954 ; GIRARD et alii, 1980). Au cours de la lactation, le lait passe d'un stade riche en matière sèche à dominante lipidique, 25 à 32 % selon COWIE (1969) et 13 à 15 % selon COATES et alii (1964) ; LEBAS (1971), PERRET et alii (1977) durant la phase colostrale pour se stabiliser à un taux plus faible en matière sèche durant trois semaines (COWIE, 1969) ; période pendant laquelle le lait est plus riche en protéines (14 %) alors que le taux en lipides chute à 15 - 17 % (COWIE, 1969). Dans le courant de la quatrième semaine, le lait maternel de la lapine s'enrichit en lipides et en protéines tandis que le lactose a tendance à disparaître (LEBAS 1971) parallèlement à la diminution de la quantité de lait produite (COWIE, 1969). Dès la fin de la deuxième semaine, selon ZARROW et alii (1965) le lapereau commence à compléter son alimentation lactée par des aliments solides alors que pour VENGE (1963) l'ingestion d'aliments solides est plus tardive et se situe entre le 22ème et le 25ème jour.

La coecotrophie (MOROT, 1882) entraînée par la lumière et obéissant à un rythme endogène (horloge) dépendant sans doute d'autres événements comme le repas (GALLOUIN, 1983) n'apparaît chez le lapereau qu'au moment du sevrage (MYERS, 1955) vers le 28ème jour, c'est-à-dire après l'implantation d'une flore coecale autochtone stable. DEMAUX et alii (1980) ont étudié l'influence de la coecotrophie sur la croissance du lapereau et montré qu'une privation prolongée de coecotrophie modifie les taux plasmatiques des acides lactique, acétique, propionique et butyrique ralentissant la croissance. Par suite nous avons choisi les temps suivants : la naissance, puis 10 jours, 20 jours, 28 jours (jour du sevrage), 38 jours, 60 jours et l'âge adulte (3 kg de poids corporel).

I - ETUDE QUANTITATIVE DE LA CROISSANCE DU LAPEREAU
(Tableaux analytiques 24, 25, 26, 27, 28, 13, 16 et 29) résumés dans le tableau X et figures XIV, XV, XVI et XVII.

A - ETUDE DE LA CROISSANCE PONDERALE DU LAPEREAU (Tableau X, figure XIV).

Durant la période d'allaitement le poids moyen du lapereau passe de 56 ± 3 g à la naissance à 720 ± 51 g lors du sevrage à 28 jours et à 1723 ± 45 g, 60 jours après la naissance. Si en première analyse (figure XIV) l'évolution semble régulière, le gain de poids quotidien montre deux ruptures dans la vitesse de croissance : une diminution de la croissance le 10^{ème} et le 20^{ème} jour et l'autre entre le jour du sevrage et le 38^{ème} jour. Ensuite à partir de la 5^{ème} semaine la vitesse de croissance reprend normalement? L'évolution pondérale du lapereau Solam solaf (I 59 -Toulouse) montre que la vitesse de croissance marque deux temps d'arrêt, l'un après la première semaine, l'autre après le sevrage. Globalement, au cours de l'allaitement (de la mise bas au sevrage), le lapereau multiplie son poids vif de naissance par 13.

La croissance en hiver est comparable à celle de l'été. Toutefois nous notons une différence significative de poids à 38 jours ; le poids vif des lapereaux d'hiver étant plus élevé de 17 %.

B - EVOLUTION QUANTITATIVE DES CONSTITUANTS HEPATIQUES

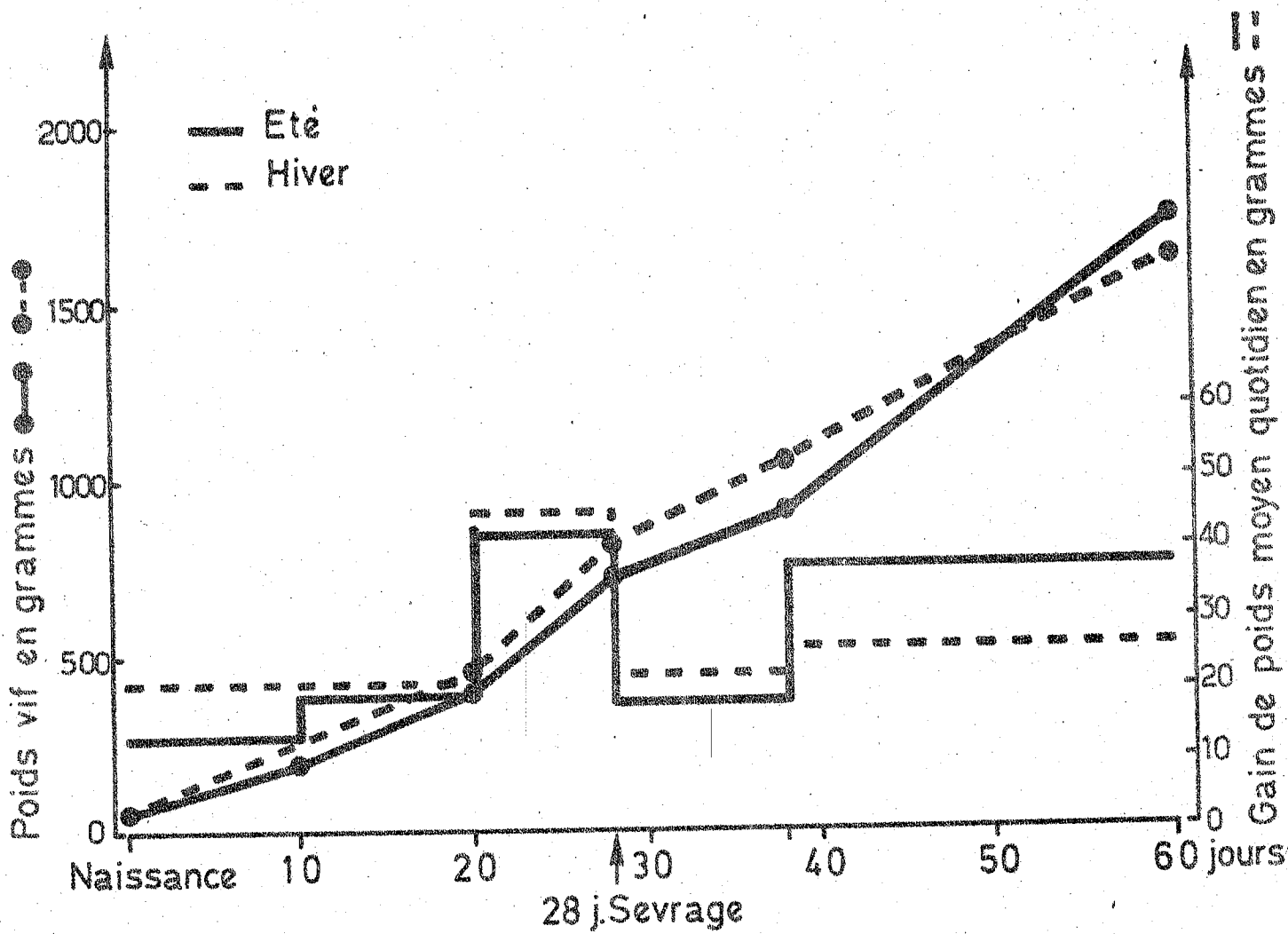
1 - Développement du foie (tableau X, figure XV).

En été, les résultats consignés dans le tableau X (colonnes 1, 2, 3) montrent que les croissances pondérales du corps et du foie ne sont pas directement proportionnelles. Avant le sevrage jusqu'au 20^{ème} jour, nous notons un retard de croissance hépatique (allométrie minorante). Toutefois au sevrage le rapport observé à la naissance est récupéré. La masse du foie croît ensuite plus rapidement que celle du corps pendant au moins les 10 jours suivant le sevrage (allométrie majorante). A 60 jours, la masse du foie n'a pas suivi la croissance du corps (figure XV, Eté).

En hiver, les croissances pondérales du corps et du foie sont directement proportionnelles ; avant le sevrage, jusqu'au 20^{ème} jour, nous constatons une augmentation de la masse hépatique parallèle à celle du corps. Au sevrage, nous notons un ralentissement de la croissance hépatique qui s'accroît dans les 10 jours qui suivent le sevrage (allométrie minorante) puis à 60 jours, le rythme de la croissance du foie redevient semblable à celui observé au 20^{ème} jour (figure XV, Hiver).

En définitive, le développement du foie au cours de la croissance du lapereau n'évolue pas de façon identique, l'été et l'hiver. En été, la vitesse de croissance hépatique est retardée par

Figure XIV - Croissance pondérale moyenne des lapereaux entre la mise bas, le sevrage et l'âge de 60 jours.



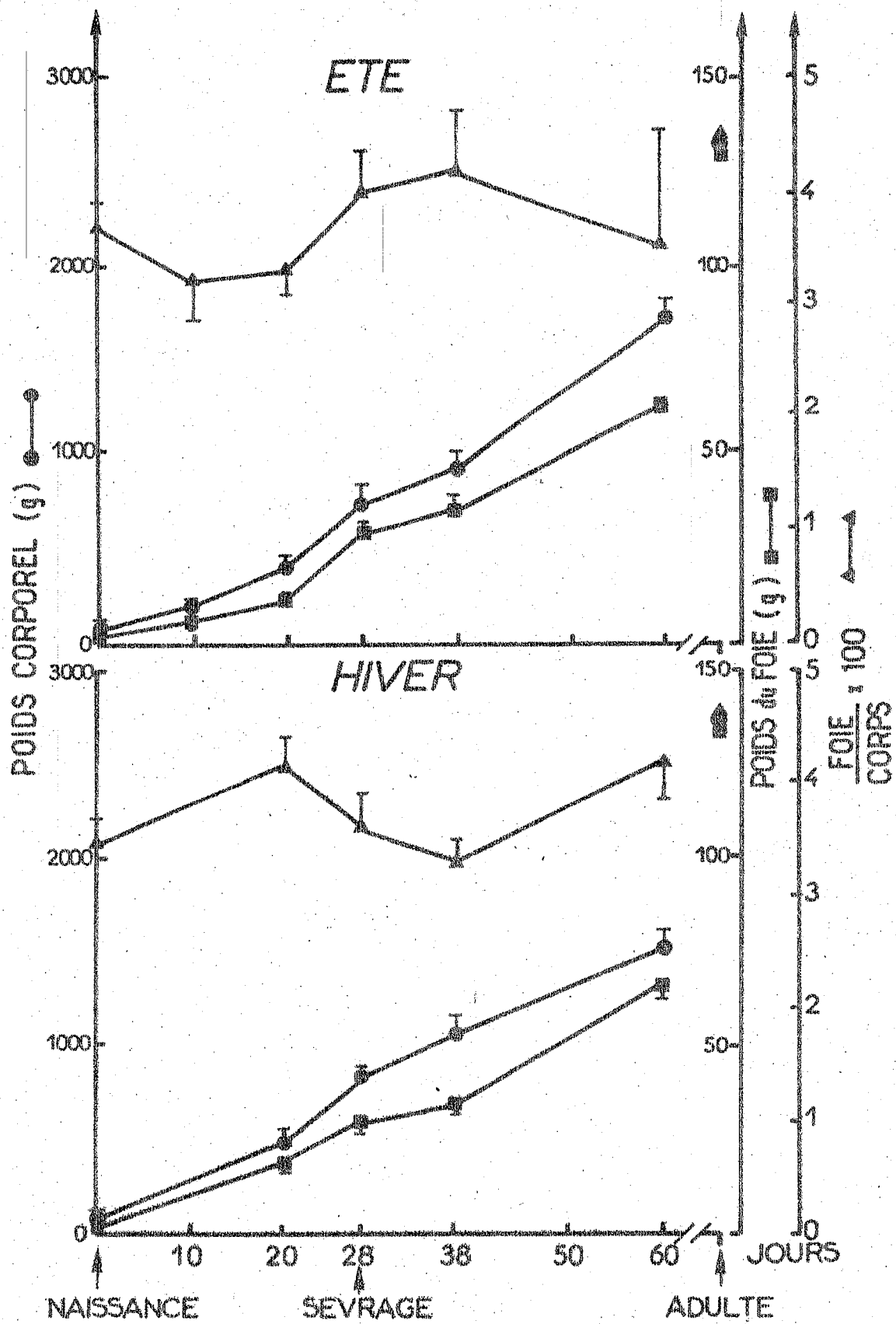


Figure XV - Cycles circannuels du poids corporel et du poids du foie - Croissance et développement.

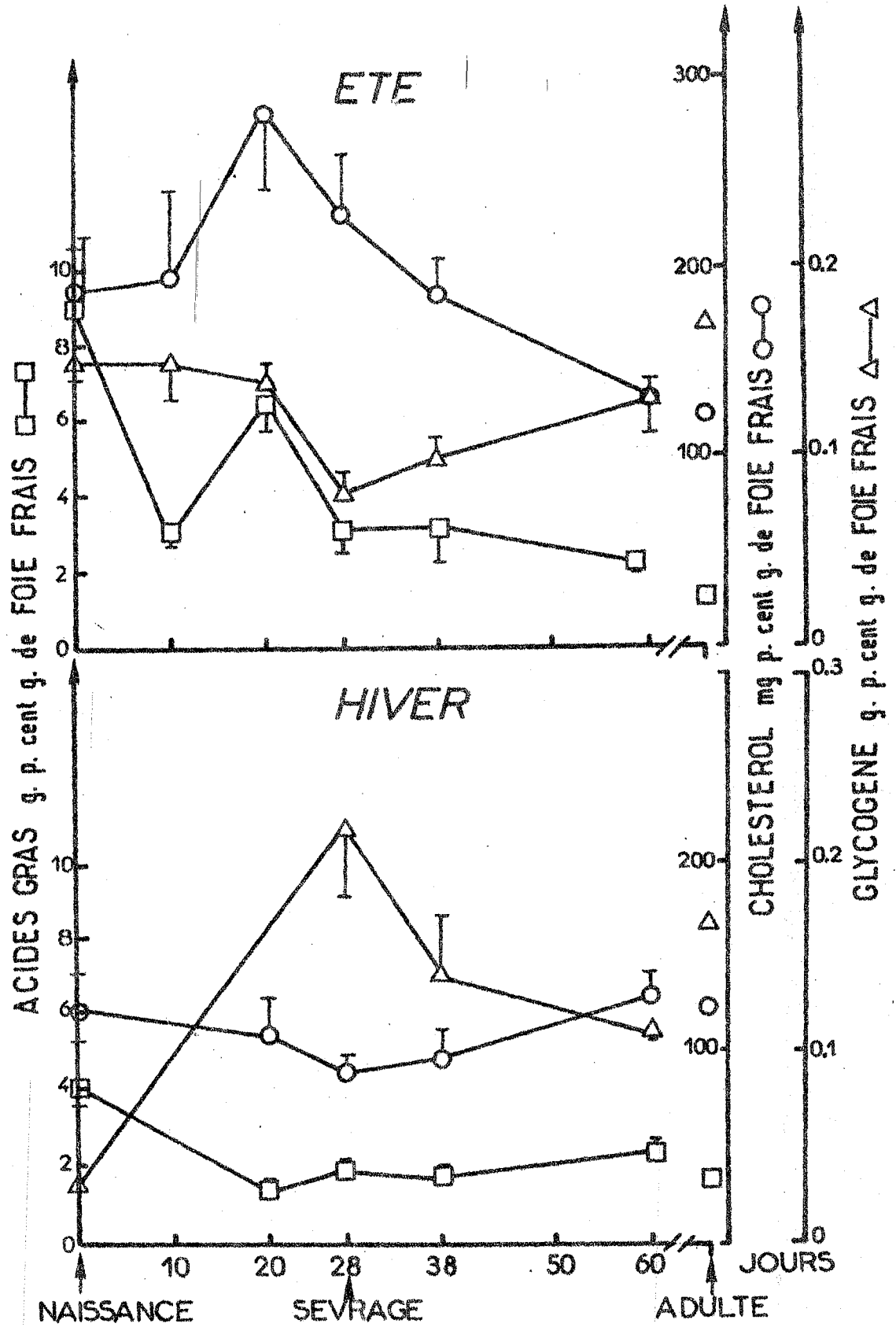


Figure XVI - Cycles circannuels des réserves énergétiques hépatiques du lapereau
Croissance et développement

Remarque : Pour les significativités se référer au tableau XI.

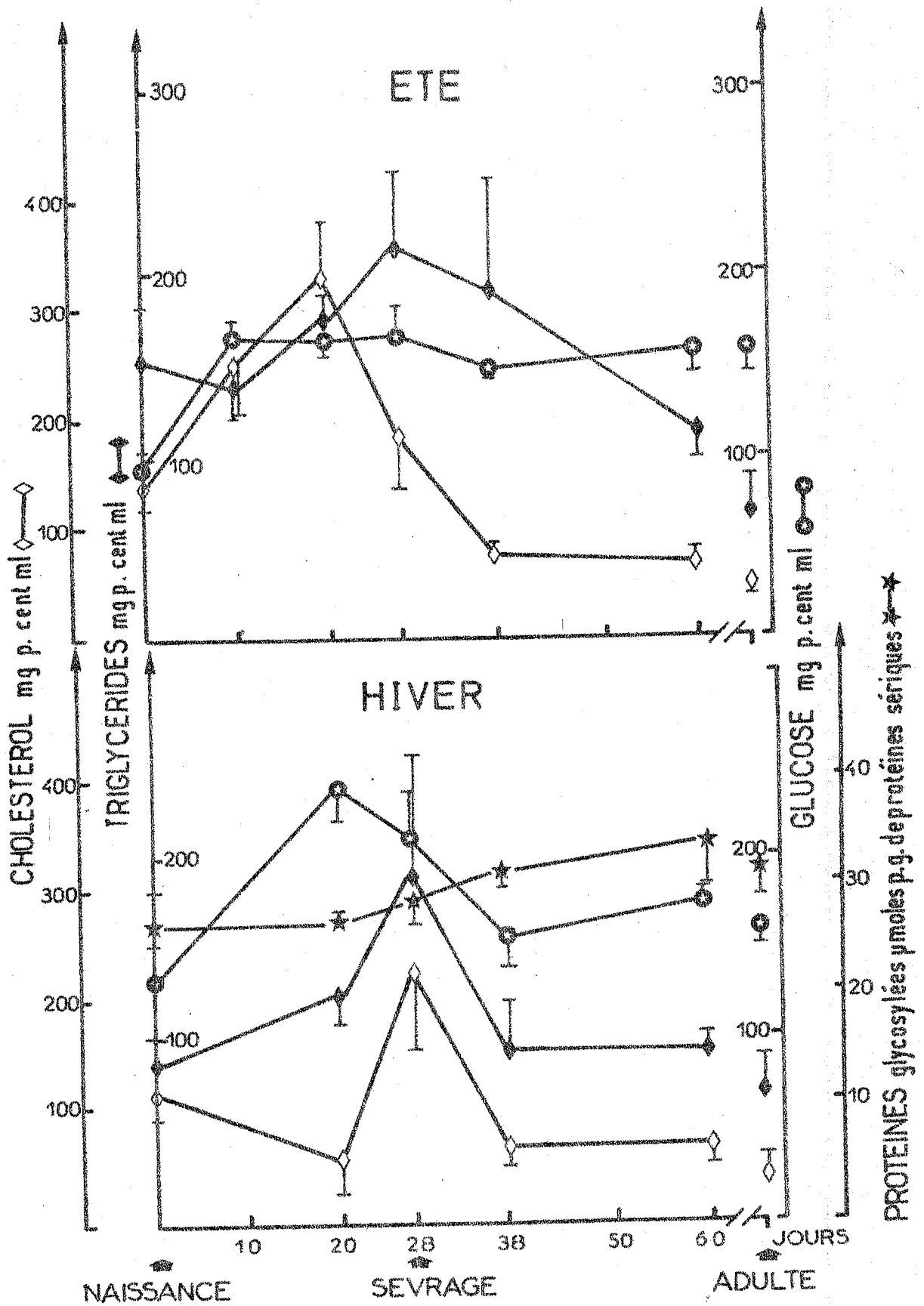


Figure XVII - Cycles circannuels des constituants plasmatiques du lapereau
Croissance et développement.

Remarque : Pour les significativités se référer au tableau XI.

rapport à la croissance pondérale du corps de la mise bas au sevrage. En revanche l'hiver, le développement du foie est parallèle à la croissance pondérale du corps jusqu'au sevrage et subit à ce moment là, un léger ralentissement.

2 - Evolution des constituants hépatiques (tableau X, figure XVI).

- En été

A la naissance, le lapereau présente un foie gras (colonnes 4, 5, 6, 7 du tableau X) caractérisé par un taux particulièrement élevé en acides gras $9,03 \pm 2,09$ g p. cent g de foie frais visible par la couleur blanchâtre de l'organe typique des foies gras.

Ce foie gras diminue de moitié en 10 jours ($3,13 \pm 0,56$ g p. cent g de foie frais) et les acides gras ne représentent alors que le tiers de ceux des animaux à la naissance ($1,01 \pm 0,22$ g p. kg d'animal à 10 jours pour $3,72 \pm 0,94$ à la naissance). Cette régression rapide du foie gras est confirmée par l'étude morphologique (figure 33).

A la fin de la troisième semaine, nous notons une augmentation de la surcharge hépatique en lipides par rapport aux animaux de 10 jours (figure XVI).

A partir du sevrage, la surcharge lipidique du foie s'atténue progressivement pour atteindre $1,67 \pm 0,54$ g p. cent g de foie frais chez l'animal adulte.

Le cholestérol hépatique (colonnes 6, 7 du tableau X) est plus élevé pendant la période d'allaitement qu'après le sevrage ; nous notons une augmentation vers le 20ème jour qui persiste jusqu'au sevrage et puis la charge hépatique en cholestérol diminue jusqu'à l'âge adulte (122 ± 37 mg p. cent g de foie frais).

Le glycogène hépatique (colonnes 8, 9 du tableau X) ne présente pas de variations notables au cours de la croissance du lapereau.

La teneur en eau du foie (tableaux 30 et X), rapportée à 100 g de foie frais, au cours de la croissance du lapereau montre une remarquable constance aussitôt après la naissance où il semble que la proportion de matière sèche soit à son niveau le plus élevé bien que peu différent de la normalité (30 % de matière sèche).

L'évolution des constituants hépatiques en hiver présente par rapport à l'été les différences suivantes :

1) - le foie gras à triglycérides bien que remarquable est toutefois moins important ; comme en été, il disparaît après le sevrage

2) - le cholestérol hépatique est bien moins élevé et dès la naissance le taux est semblable à celui de l'adulte

3) - le glycogène reste, comme en été, toujours très faible ; c'est donc bien une réserve énergétique labile.

C - EVOLUTION QUANTITATIVE DES CONSTITUANTS PLASMATIQUES (tableau X, figure XVII).

Au niveau des constituants énergétiques du plasma il n'y a pas de différences remarquables selon la saison où sont étudiés les lapereaux, été ou hiver ; ceci illustre bien le rôle intégrateur du plasma au niveau de l'homéostasie de l'organisme. Par contre au cours du développement nous observons quelques évolutions caractéristiques.

Ainsi à la naissance nous notons une hypoglycémie (colonne 13, tableau X) qui disparaît dès le 10ème jour, la glycémie se stabilisant alors au niveau de 150 mg p. 100 ml. Pour leur part, les protéines glycosylées voient leur taux s'élever jusqu'après le sevrage puis se stabiliser aussi.

Les triglycérides et le cholestérol plasmatiques sont plus élevés pendant la période d'allaitement qu'après le sevrage et à l'âge adulte.

D - EVOLUTION DES CONSTITUANTS ENERGETIQUES HEPATIQUES : APPROCHE HISTOCHIMIQUE

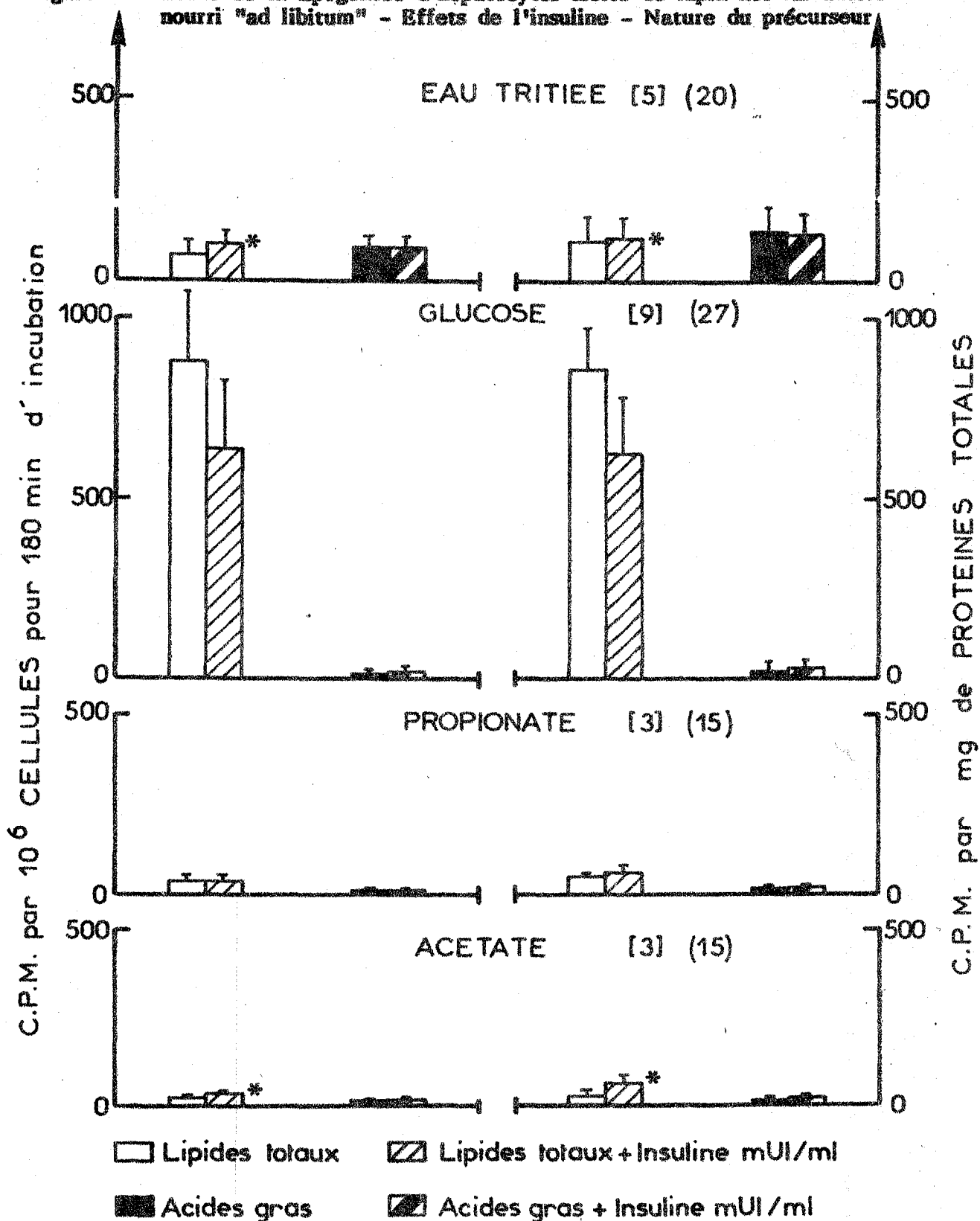
Au cours de la croissance du lapereau des prélèvements de foie permirent la recherche des lipides et du glycogène révélés par des procédés histochimiques et examinés en microscopies optique et électronique.

En microscopie optique, la recherche des lipides se fait après fixation au formol à 10 % et coloration à l'huile rouge ; la recherche du glycogène a lieu après fixation au Dubosq -Brasil et traitement à l'acide périodique Schiff. La structure générale est étudiée après fixation au Bouin et coloration à l'hémalum-éosine.

En microscopie électronique, les fragments de foie sont fixés à la glutaraldéhyde et les imprégnations sont assurées par le citrate de plomb et l'acétate d'uranyle.

Cette étude cytologique du foie confirme de façon démonstrative notre approche quantitative de l'évolution des substrats énergétiques au cours de la croissance du lapereau. Ainsi nous mettons en évidence le foie gras du lapereau à la naissance ; à ce stade, les inclusions lipidiques sont volumineuses et occupent la presque totalité de l'hépatocyte. Par suite, nous voyons la diminution de cette surcharge lipidique dès le 10ème jour après la naissance et enfin l'absence totale de ces réserves lipidiques dans le foie à partir

Figure V - Etude de la lipogenèse d'hépatocytes isolés de lapin normal adulte nourri "ad libitum" - Effets de l'insuline - Nature du précurseur

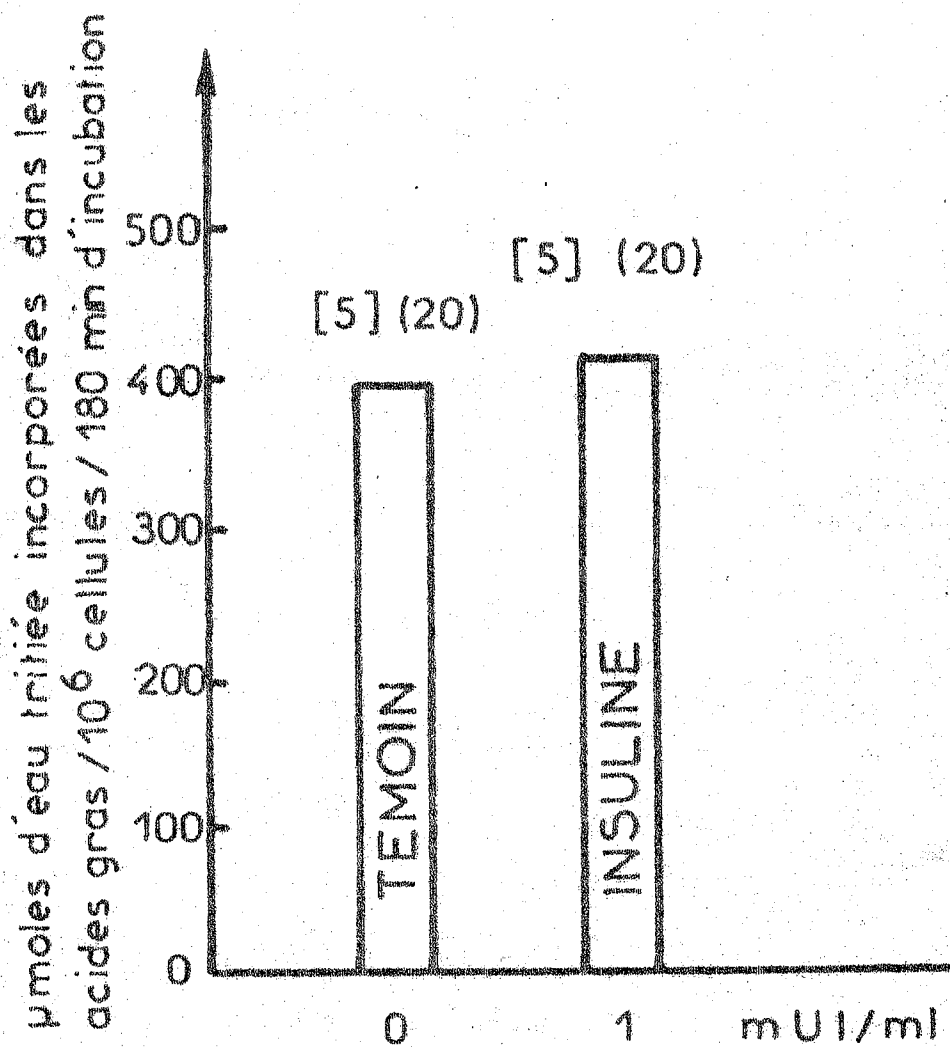


[] nombre d'animaux

() nombre d'essai

La lipogenèse de l'hépatocyte de lapin est effective comme le montre l'incorporation du tritium et éventuellement le glucose qui fournit les carbones de cette biosynthèse.

Figure VI - Synthèse "de novo" des acides gras à partir d'une incorporation d'eau tritiée (250 microcuries) dans les hépatocytes isolés de lapin normal adulte nourri "ad libitum".

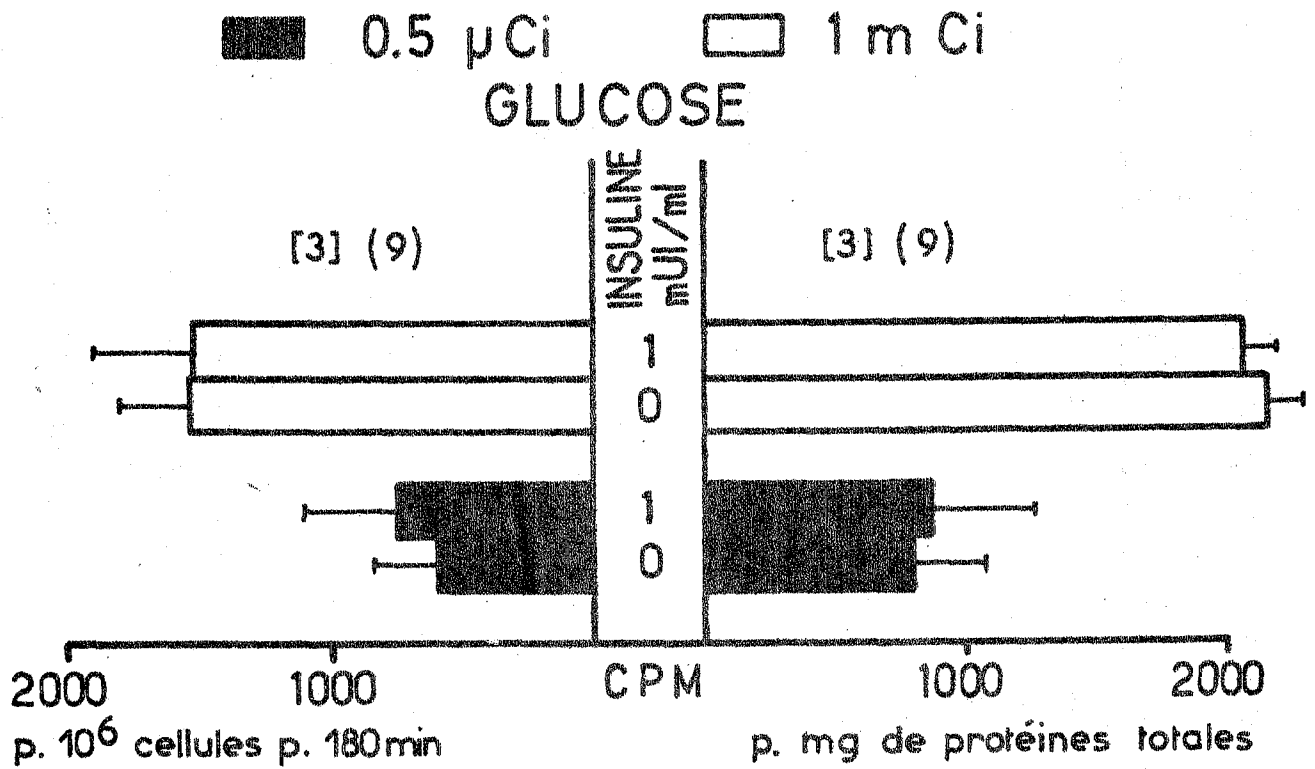


[] nombre d'animaux

() nombre d'essais

L'incorporation du tritium dans les acides gras de l'hépatocyte démontre leur aptitude à la lipogénèse. Remarquons que l'insuline n'influence pas cette voie métabolique dans nos conditions expérimentales.

Figure VII - Biosynthèse de lipides totaux dans les hépatocytes isolés du lapin adulte nourri "ad libitum"



[] Nombre d'animaux

() Nombre d'essais

Lorsque la disponibilité en carbones radioactifs s'accroît, leur incorporation dans les lipides totaux s'accroît aussi.

De cette étude comparative il ressort que l'hépatocyte du lapin adulte nourri comme à jeun pendant 48 heures, n'utilise que très faiblement l'acétate et le propionate comme précurseurs de la triglycérogenèse et de la néoformation d'acides gras "in vitro" (tableau IV, figure V et tableau 10, figure VIII).

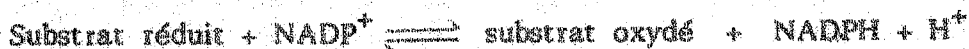
Quant au glucose (figure VII), si on augmente sa quantité dans le milieu d'incubation, l'incorporation de la radioactivité dans les lipides totaux est augmentée ; elle passe de 816 ± 261 cpm p. mg de protéines totales en présence de 0,5 microcurie de glucose à 2151 ± 137 pour une millicurie de ce même précurseur et ce, en absence de toute stimulation hormonale.

CONCLUSION

Il ressort de nos observations que : chez le lapin, l'eau tritiée est l'isotope privilégié pour mettre en évidence la biosynthèse d'acides gras "de novo" au niveau de l'hépatocyte isolé ; le glucose donneur de carbone permet l'élaboration de l'alpha-glycérophosphate conduisant à la synthèse des triglycérides. Nous remarquons une tendance au stockage des triglycérides tant par l'hépatocyte que par l'adipocyte chez le lapin (ALAOUI et alii, 1982 ; CATANZANO, 1984). En revanche, en présence d'acétate ou de propionate l'hépatocyte est presque incapable de synthétiser "de novo" des acides gras et des lipides totaux comparativement à ce que l'on observe avec l'eau tritiée (participation de 75 % dans les acides gras) et le glucose dont le tritium et le carbone radioactif se retrouvent abondamment dans les triglycérides. Au contraire l'adipocyte "in vitro" utilise préférentiellement l'acétate comme précurseur de la synthèse "de novo" d'acides gras (VEZINHET, 1976 ; ALAOUI et alii, 1982 ; CATANZANO, 1984).

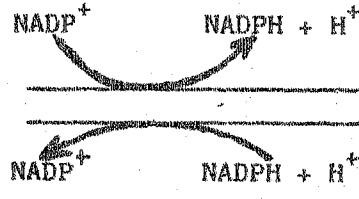
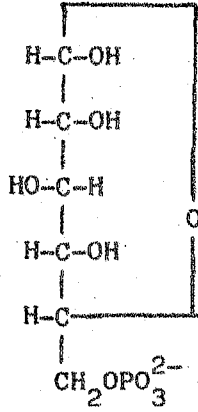
L'étude de l'utilisation de ces précurseurs, glucose, acétate, propionate et eau tritiée dans la lipogenèse chez le lapin pose la problématique fonctionnelle de l'hépatocyte au niveau du métabolisme des graisses ; y-a-t-il synthèse d'acides gras comme peut le prouver l'incorporation du tritium dans les graisses, ou stockage comme le montre l'incorporation quasi exclusive des carbones du glucose dans les lipides totaux ?

Selon FOSTER et alii (1966) l'incorporation des ions tritium de l'eau tritiée dans les lipides se fait dans une étape intermédiaire de la biosynthèse des acides gras par la cellule ; d'après cet auteur il y aurait un échange entre les ions ^3H du NADPH et des ions $^3\text{H}^+$ de l'eau tritiée. Ce coenzyme nucléotidique indispensable à la synthèse des acides gras dans une cellule comme l'hépatocyte ou l'adipocyte est formé par les processus de la voie des pentoses par un ensemble de réactions d'oxydo-réduction selon le schéma suivant :



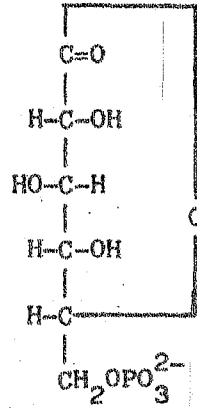
* Formation du NADPH + H⁺

glucose 6 phosphate

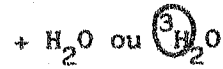


glucose-6-phosphate
déshydrogénase

6-phosphoglucono- δ -lactone

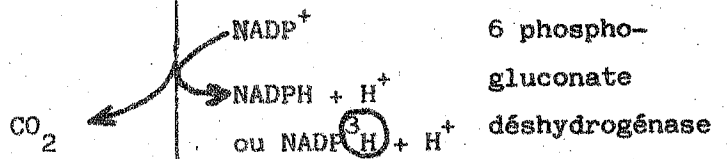
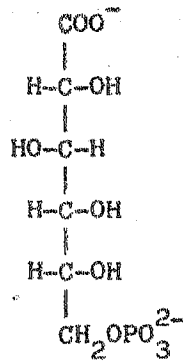


EAU TRITIEE



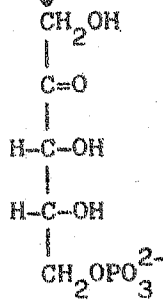
lactonase

6 phospho-gluconate



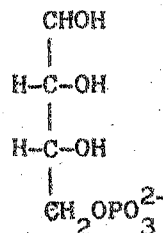
6 phospho-gluconate
déshydrogénase

D-ribulose-5 phosphate



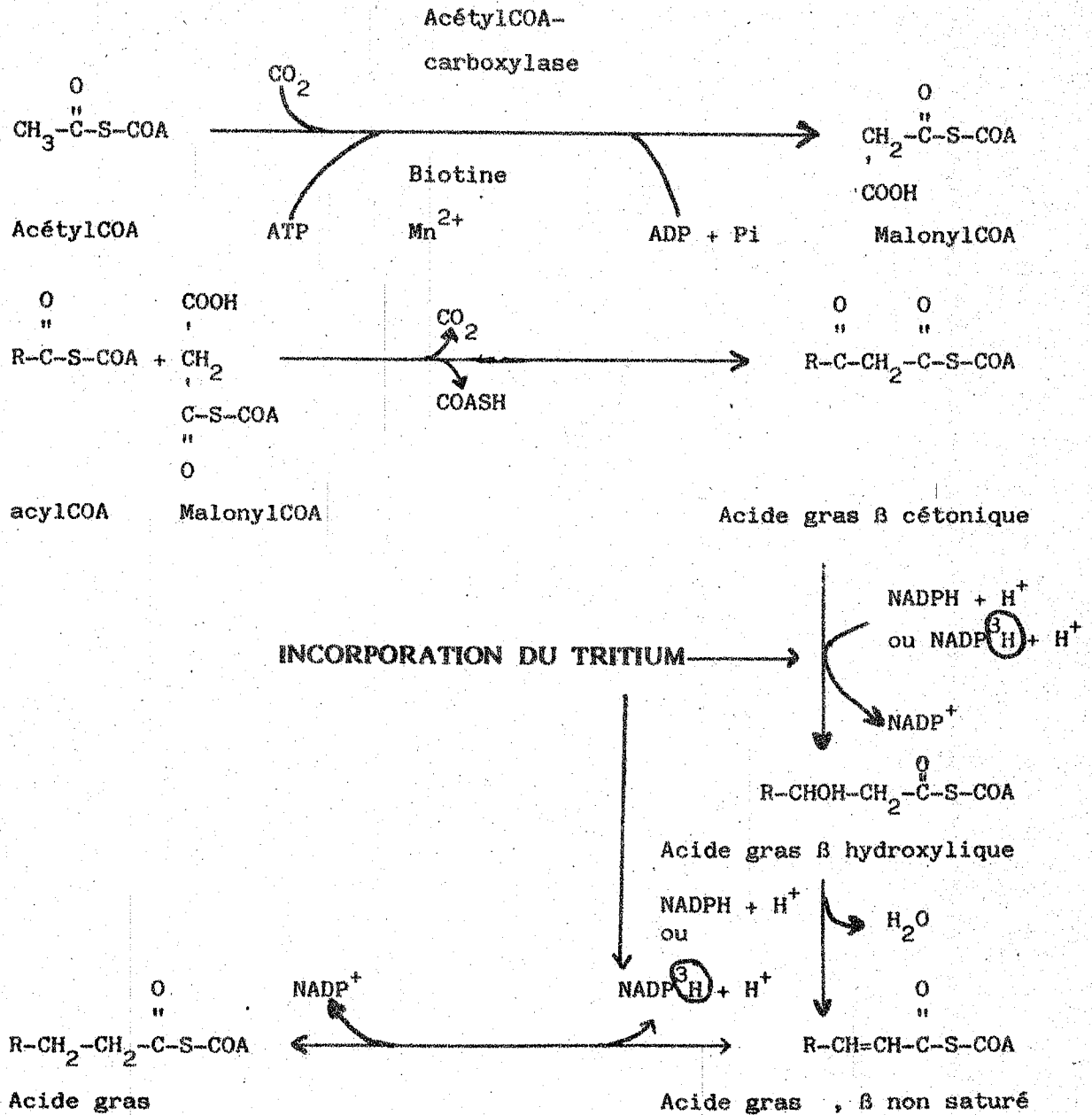
phosphopentose isomérase

D-ribose-5 phosphate



* Intervention du coenzyme NADP⁺ dans la synthèse d'acides gras

Dans la synthèse d'acides gras, le système cytoplasmique d'une cellule a besoin: d'ATP, NADP⁺, des ions Mn²⁺, du bicarbonate (source de CO₂) et de la biotine qui agit comme coenzyme de l'acétylCOA-carboxylase, enzyme fixant le CO₂.



Lorsqu'on fournit à la cellule hépatique de l'eau tritiée ($^3\text{H}_2\text{O}$) il y a un échange d'atome d'hydrogène (H^+) et de tritium ($^3\text{H}^+$) lors de la production du coenzyme réduit NADPH qui peut alors être radioactif (NADP^3H). Or lors de la synthèse d'acides gras le système cytoplasmique de la cellule a besoin de NADPH, d'ATP, d'ions Mn^{++} , de bicarbonate (comme source de CO_2) et de la biotine qui agit comme coenzyme de l'acétyl-CoA-carboxylase, enzyme qui fixe le CO_2 . Ainsi le tritium porté par le NADPH est impliqué dans la chaîne d'acides gras formée, ce qui représente pour nous un témoin de l'incorporation de ces ions tritium que nous avons fournis sous forme d'eau tritiée à la cellule hépatique. De plus selon FAIN et alii (1965) l'eau tritiée est un traceur dont l'activité spécifique est relativement constante ; par ailleurs FOSTER et alii (1966) ont montré qu'au niveau du tissu adipeux il y a incorporation de 2 ions tritium ($^3\text{H}^+$) pour les 2 carbones d'acétyl-CoA servant à l'élongation de la chaîne d'acides gras.

B - EFFET DE L'INSULINE SUR LA LIPOGENESE DE L'HEPATOCYTE
(tableaux analytiques 7, 11 et 12 ; tableaux récapitulatifs IV et V ; figures V et IX).

Remarquons tout d'abord que l'état nutritionnel influe sur le niveau de la lipogenèse. Ainsi nous avons observé chez l'animal à jeun une incorporation, dans les lipides totaux, de glucose très significativement supérieure à celle mesurée chez l'animal nourri, 3270 ± 292 cpm p. mg de protéines totales chez l'animal à jeun contre 901 ± 147 chez le lapin nourri, soit une augmentation de la lipogenèse de 260 % au bout de 48 heures de jeûne.

Nous constatons sur les hépatocytes du lapin à jeun depuis 48 heures que l'insuline aux concentrations de 0,1 et de 1 mUI/ml accroît la biosynthèse des lipides totaux respectivement de 60 et 98 % par rapport au témoin sans hormones, à partir du glucose exogène apporté aux cellules. Cette incorporation des carbones du glucose exogène dans les lipides cellulaires témoigne donc d'un accroissement de la pénétration du glucose sous l'effet de l'insuline ; cette entrée intensive de glucose dans le milieu intracellulaire déclenche, au travers de la glycolyse, la formation d'alpha-glycérophosphate permettant la triglycérogenèse. Chez l'animal nourri, nous constatons que l'insuline exerce une légère stimulation de la biosynthèse des triglycérides comme le montre l'augmentation de 9 % de l'incorporation du tritium de l'eau tritiée par rapport à la valeur témoin sans hormone. Dans les mêmes conditions, nous notons une légère augmentation de la biosynthèse des lipides totaux à partir de l'acétate (bien que celle-ci soit très faible) en présence d'insuline à la dose de 1 mUI/ml.

En revanche, au niveau de la biosynthèse des acides gras, l'insuline n'exerce aucun effet lipogénique et cela quel que soit le précurseur utilisé (tableau IV, figure V).

TABLEAU V - Biosynthèse des lipides totaux dans les hépatocytes isolés de lapin adulte - Influence de l'insuline.

Préculture	G L U C O S E											
	c p m p. 10 ⁶ cellules p. 180 min.		c p m p. mg de protéines totales		c p m p. 10 ⁶ cellules p. 180 min.		c p m p. mg de protéines totales		c p m p. mg de protéines totales		c p m p. mg de protéines totales	
Etat nutritionnel	Témoins	Insuline 0,1 mUI/ml	Témoins	Insuline 0,1 mUI/ml	Témoins	Insuline 1 mUI/ml	Témoins	Insuline 1 mUI/ml	Témoins	Insuline 1 mUI/ml	Témoins	Insuline 1 mUI/ml
A jeun 48 h [13]	1141 ± 94	1828* ± 287	3270 ± 292	3247 ± 844	1083 ± 203	2009 ± 660	2770 ± 672	5492 ± 1894				
Nourri [4] et [13]	715 ± 75	392 ± 49	901 ± 147	482 ± 60	884 ± 199	639 ± 186	856 ± 108	625 ± 165				
Accroissement Animal à jeun / nourri	60 %	366 %	263 %	989 %	51 %	214 %	224 %	778 %				
% de stimulation LS - LB x 100 LB		+ 60 % (1) - 45 % (2)		+ 60 % (1) - 47 % (2)		+ 86 % (1) - 28 % (2)		+ 98 % (1) - 27 % (2)				

[] Nombre d'animaux

LB = Lipogénèse basale

LS = Lipogénèse stimulée par l'insuline

(1) = % de stimulation chez l'animal à jeun

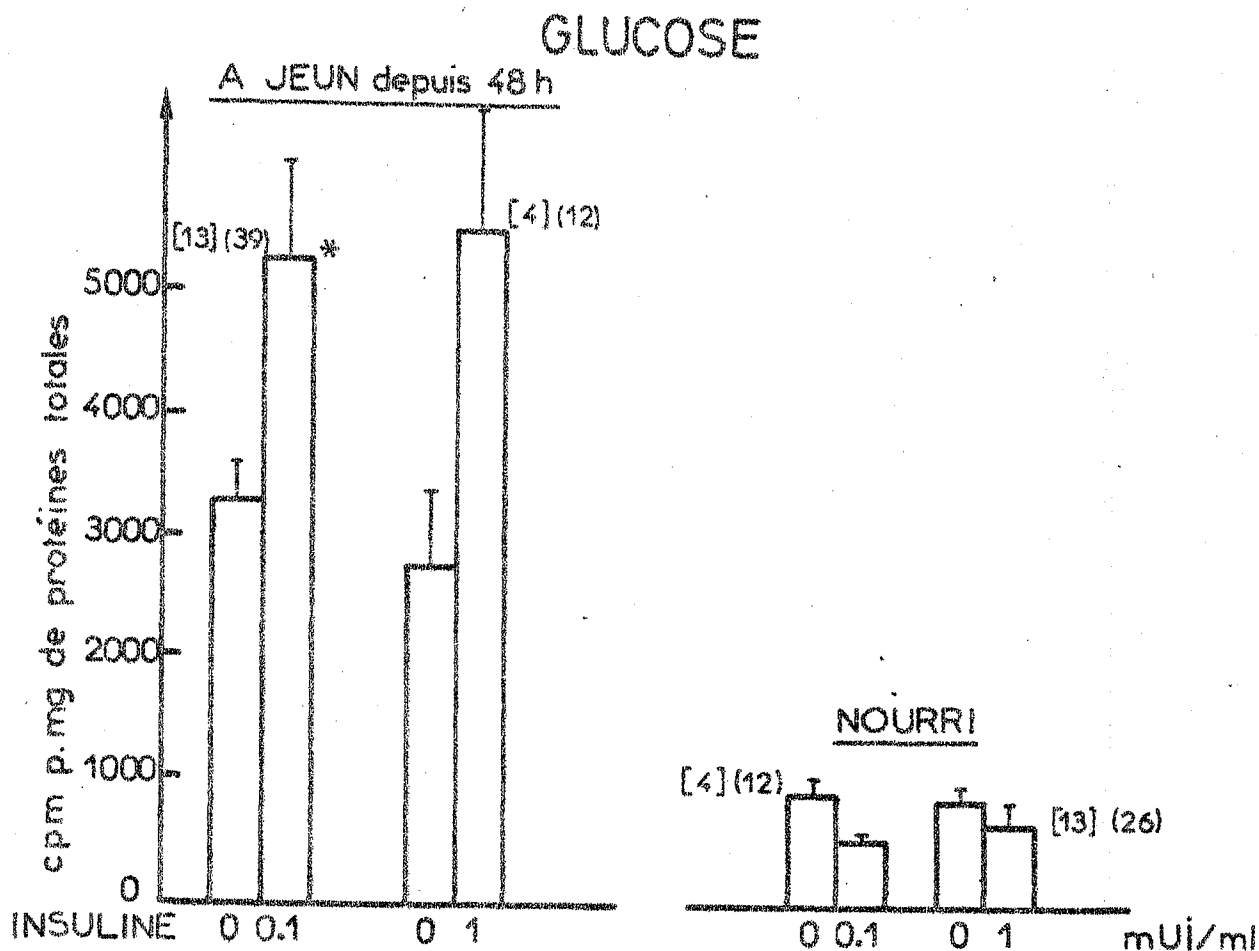
(2) = % de stimulation chez l'animal nourri

+ = Stimulation

- = Inhibition

Chez le lapin à jeun, l'insuline a une action stimulante sur la biosynthèse des lipides totaux dès la dose de 0,1 mUI/ml. Cet effet n'augmente pas lorsque la dose est multipliée par 10 (1 mUI/ml). Chez l'animal nourri, il n'y a pas de stimulation de cette biosynthèse. La lipogénèse est beaucoup plus faible et semble réduite par l'insuline.

Figure IX - Biosynthèse des lipides totaux à partir du glucose dans l'hépatocyte isolé de lapin adulte - Influence de l'insuline.



[] Nombre d'animaux

() Nombre d'essais

Chez le lapin à jeun, l'insuline a une action stimulante sur la biosynthèse des lipides totaux dès la dose de 0,1 mUI/ml. Cet effet n'augmente pas lorsque la dose est multipliée par 10 (1 mUI/ml). Chez l'animal nourri, il n'y a pas de stimulation ; la lipogénèse est beaucoup plus faible et semble réduite par l'insuline.

C - CONCLUSION

Il ressort de ces observations que chez le lapin à jeun, l'insuline à 0,1 mUI/ml a une action stimulante sur la biosynthèse des lipides totaux à partir du glucose et cet effet n'est pas augmenté lorsque la dose d'insuline est multipliée par 10 (tableau V, figure IX). Chez le lapin nourri dont l'hépatocyte est de ce fait riche en glycogène nous ne relevons aucun effet lipogénique de l'insuline sur la lipogenèse basale quelle que soit la dose utilisée. Au contraire, il semblerait que l'insuline inhibe la lipogenèse spontanée de l'hépatocyte à partir du glucose (réduction de 28 à 45 %). Tout se passe comme si chez l'hépatocyte riche en glycogène, l'entrée de glucose exogène sous l'effet de la stimulation par l'insuline serait réduite. L'insuline à la dose de 1 mUI/ml exerce une action stimulante très modérée sur la triglycérologénèse "de novo" à partir de l'acétate et comme le montre l'utilisation du tritium chez l'animal nourri (tableau IV). Nous n'observons pas d'effet lipogénique de cette hormone sur la biosynthèse des acides gras quel que soit le précurseur utilisé et cela indépendamment de l'état nutritionnel de l'animal.

Comme l'ont déjà remarqué VEZINHET (1976), ALAOUI et alii (1982), CATANZANO (1984), le lapin se caractérise par une faible réponse lipogénique à l'insuline. Nous verrons dans le chapitre II comment nos travaux répondront à ce paradoxe.

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous venons de rapporter notre mise au point de la technique d'isolement des hépatocytes tant chez le lapin adulte que chez le lapereau ; chez ce dernier, surtout dans la période postnatale, lapereau de "un jour", il a fallu affiner notre technique de perfusion et nous avons réussi à perfuser jusqu'à quatre lapereaux de "un jour" en "parallèle". Nous avons développé cette technique des hépatocytes isolés car dans notre laboratoire, il a été montré que l'activité lipogénique de l'adipocyte isolé du lapin, à partir de précurseurs radioactifs tels que le glucose et l'acétate, est quantitativement peu importante. Nous avons donc recherché un autre site possible de la lipogenèse et par suite avons envisagé le rôle de l'hépatocyte.

Pour notre part nous avons essayé de savoir si l'hépatocyte du lapin joue quantitativement et qualitativement un grand rôle dans la biosynthèse des lipides comparativement à l'adipocyte. Nous voulions donc répondre à la question : dans quel tissu ou organe s'effectue la lipogenèse chez le lapin ?

L'examen de la lipogenèse de l'hépatocyte nous a conduit à évaluer les effets de l'insuline sur cette voie métabolique en fonction des précurseurs envisagés et des conditions nutritionnelles de l'animal.

Nos résultats nous permettent d'affirmer la qualité de la technique mise au point chez le rat par BERRY et FRIEND (1969) transposée et adaptée à la séparation des hépatocytes du lapin et du lapereau. Cette méthode est le moyen d'étude des mécanismes et régulation métaboliques qui sont difficilement accessibles sur un foie

entier. En outre, comme nous l'avons vérifié, elle permet de conserver l'organisation cellulaire et l'intégrité de la structure des membranes et elle assure l'homogénéité de la suspension en hépatocytes comme l'avaient remarqué dès 1974 CAPUZZI et alii, chez le rat.

BERRY et FRIEND (1969) sont les premiers auteurs à introduire une méthodologie basée sur la perfusion du foie à 37°C par un milieu contenant de la collagénase permettant l'hydrolyse de la trame conjonctive sans altération des cellules. Les hépatocytes ainsi préparés ont pu être utilisés pour des études de synthèses de protéines (SCHREIBER et alii, 1972), de néoglucogénèse (JOHNSON et alii, 1972 ; MARTIN, 1979 ; CALLIKAN, 1980 ; EL MANOUBI, 1981 ; AZZOUT, 1984) et de métabolisme des acides gras (ONTKO, 1972, 1973 ; FELTS et alii, 1971 ; NILSSON et alii, 1974 ; CLARK et alii, 1974) chez le rat et le lapin. Remarquons que l'étude du métabolisme lipidique de l'hépatocyte de lapin et de lapereau n'a à ce jour jamais été abordée.

L'avantage de cette technique que nous avons adaptée à la préparation des hépatocytes de lapin, est la simplicité du processus par lequel les cellules sont obtenues sur l'animal anesthésié. Cependant en utilisant le système du circuit de perfusion fermé pratiqué par la plupart des auteurs ci-dessus cités, la dissection est plus longue, ce qui ne peut être que dommageable à la bonne viabilité des cellules (CAPUZZI et alii, 1974). Nous avons ainsi perfusé le foie de l'animal en circuit ouvert, sans recycler le milieu par la veine cave inférieure à l'entrée de l'oreillette droite, en récupérant le milieu de perfusion au niveau de la cavité abdominale. Nous avons pu démontrer que les préparations cellulaires ainsi obtenues étaient de bonne qualité tant au niveau structural (test au bleu trypan, réfringence des cellules) que métabolique. En effet nos cellules sont capables de synthétiser jusqu'à 118 ± 5 micromoles de glucose p. g de poids sec de 10^6 cellules à partir du lactate 10 mM pendant la première heure d'incubation chez l'animal à jeun depuis 48 heures. Ce critère métabolique est un témoin de la qualité de nos préparations cellulaires puisqu'y sont impliquées des activités enzymatiques à la fois mitochondriales et cytoplasmiques (HANSON, 1973). Ces mesures de néoglucogénèse chez l'animal à jeun sont tout à fait comparables à celles de MARTIN (1979) qui travaille lui aussi sur le lapin adulte à jeun. A l'occasion de ces vérifications, nous confirmons l'influence de l'état nutritionnel sur la néoglucogénèse rapportée par ailleurs par EL MANOUBI et alii (1983). En effet, dès 1965, KREBS et EGGLESTON ont montré qu'un excès de glucose déprime l'activité de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) chez le rat ; EL MANOUBI et alii (1983) l'ont aussi remarqué chez le lapin. Dans le même sens, pour notre part, chez le lapin nourri, les hépatocytes isolés ne produisent que 32 micromoles de glucose p. g de poids sec de 10^6 cellules lors de la première heure d'incubation avec le lactate (10 mM) comparativement à l'animal à jeun dont l'hépatocyte produit 118 micromoles.

Cependant les avis sont partagés quant à l'influence de l'alimentation sur la néoglucogénèse ; ZALESKI et BRYLA (1978) pensent que la participation de la PEPCK cytoplasmique est aussi importante chez le lapin nourri que chez le lapin à jeun ; par contre

ARINZE et alii (1973 a, 1973 b) rapportent une faible activité de la PEPCK chez le lapin et le chat nourris, en revanche la participation de cette enzyme augmente considérablement lors du jeûne.

Nous avons choisi de travailler avec des échantillons de 10^6 hépatocytes par ml de milieu compte tenu du niveau métabolique mesuré. Le poids sec de ces 10^6 hépatocytes chez le lapin adulte est comparable à celui rapporté par MARTIN (1979) chez la même espèce. En revanche le poids sec de 2 à 3 mg pour 10^6 cellules est très inférieur à la valeur observée chez le rat (18 à 20 mg) et légèrement supérieur à celle (1,8 à 1,9 mg) rencontrée chez le poulet (CAPUZZI et alii, 1974).

La quantité moyenne de protéines totales (804 ± 53 microgrammes pour 10^6 cellules) mesurée chez le lapin est bien inférieure à celle mesurée chez le rat (5600 à 5900 microgrammes) et supérieure à celle observée dans les hépatocytes de poulet (380 à 400 microgrammes) selon CAPUZZI et alii (1974).

Le diamètre moyen de 13 à 15 microns de l'hépatocyte de lapin adulte est plus petit que celui des hépatocytes de rat (21 à 25) et presque semblable à celui du poulet (11 à 12,5) observé par CAPUZZI et alii (1974).

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que nos préparations cellulaires sont bien constituées d'hépatocytes et seulement de cellules parenchymales (morphologie, activité métabolique néoglucogénique), que ces cellules ont gardé une bonne intégrité et qu'elles sont intactes et peuvent donc être utilisées pour des investigations sur le métabolisme.

A - L'HEPATOCYTE EST-IL UN SITE DE LA BIOSYNTHESE "DE NOVO" D'ACIDES GRAS CHEZ LE LAPIN ?

Nos résultats sur la lipogenèse "in vitro" de l'hépatocyte isolé nous permettent d'affirmer que cette cellule incorporant l'hydrogène de l'eau tritiée dans les lipides a une capacité incontestable de biosynthèse des acides gras. De même les carbones radioactifs du glucose se retrouvant dans la fraction "lipides totaux" et non ou peu dans la fraction "acides gras" indiquent que le glucose, par la glycolyse anaérobie, fournit du glycérophosphate permettant l'estérification des acides gras et conduisant aux triglycérides de la fraction "lipides totaux". Les carbones offerts par les molécules d'acétate et de propionate ne se retrouvent pas ou peu dans les fractions lipidiques. La synthèse d'acides gras par l'hépatocyte est incontestable comme le montre l'incorporation du tritium et le stockage des triglycérides est mis en évidence par la présence dans l'extrait lipidiques total des carbones radioactifs venant du glucose, molécule polaire par excellence.

Compte tenu de l'absence de données bibliographiques chez le lapin quant à l'étude de la lipogénèse de l'hépatocyte, nous confronterons nos résultats à ceux obtenus avec l'hépatocyte de rat et nous élargirons notre étude comparative aux mesures obtenues sur l'adipocyte de lapin.

Nous pouvons affirmer que le glucose constitue le précurseur privilégié, parmi les substrats envisagés, de la synthèse "de novo" des lipides totaux ; ainsi l'hépatocyte ne semble pas pouvoir utiliser l'acétate ni le propionate pour synthétiser "de novo" des acides gras et des lipides totaux.

Chez le rat selon BERRY et alii (1973 b) la synthèse d'acides gras "de novo" par l'hépatocyte isolé est équivalente à celle observée dans le foie "in vivo" à partir de l'eau tritiée et de l'acétate. Au contraire NILSSON et alii (1973) pensent que l'hépatocyte de rat incorpore moins d'acétate marqué dans les acides gras qu'un foie perfusé "in situ" avec un milieu contenant de l'acétate ; ils rapportent que l'incorporation d'acétate et d'eau tritiée implique l'utilisation d'une grande quantité de groupements acétyl CoA dans la synthèse d'acides gras, et ces groupements auraient une origine autre que l'acétate, même à de fortes concentrations. Selon CLARK et alii (1974), le foie et le tissu adipeux ont une grande capacité lipogénique chez le rat ; pour ces auteurs l'hépatocyte synthétise des acides gras en quantité supérieure ou égale à celle du foie perfusé "in vitro". Par ailleurs, chez le rat, le glucose aurait un rôle mineur dans la lipogénèse hépatique ; pour CLARK et alii (1974), l'incorporation de ^3H à partir de substrats exogènes n'est pas une preuve de la mesure quantitative de la lipogénèse, le meilleur critère serait selon eux l'incorporation de protons à partir de l'eau comme l'ont déjà remarqué FAIN et alii (1965) ; FOSTER et alii (1966) et WINDMUELLER et alii (1966).

Il apparaît alors que notre observation, selon laquelle l'hépatocyte isolé de lapin incorpore le tritium de l'eau, s'accorde avec celles faites sur l'hépatocyte et l'adipocyte de rat (FOSTER et alii, 1966 ; JUNGAS, 1968).

L'acétate est bien utilisé par l'hépatocyte de rat (NILSSON et alii, 1973) pour la synthèse "de novo" d'acides gras mais l'origine de tous les carbones qui entrent dans les groupes acétyl CoA n'est pas très claire ; par contre l'hépatocyte de lapin ne semble pas utiliser ou très peu l'acétate comme substrat tant dans la synthèse "de novo" d'acides gras que dans la triglycérogénèse alors que l'adipocyte de cet animal incorpore aisément les carbones de l'acétate dans les acides gras néoformés (VEZINHET, 1976 ; ALAOUI et alii, 1982 ; CATANZANO et alii, 1986).

Le glucose, qui chez le rat, a un rôle mineur dans la lipogénèse hépatique selon CLARK et alii (1974) semble pour nous être le précurseur privilégié pour la triglycérogénèse "in vitro" de l'hépatocyte isolé de lapin. Selon les travaux de MASORO et alii (1949), le foie de souris synthétise "de novo" des acides gras à partir du glucose ; chez le jeune rat de dix-neuf jours, ces auteurs notent une forte incorporation de

l'hydrogène de l'eau tritiée "in vivo" dans les acides gras du foie comparativement à celle observée dans le cerveau et l'intestin de l'animal du même âge.

En revanche, le tissu adipeux du lapin est caractérisé par une très faible capacité à synthétiser les acides gras à partir du glucose (SMITH, 1975 ; CATANZANO, 1984).

Chez l'hépatocyte de lapin, la néolipogenèse d'acides gras est, à partir des substrats envisagés, quantitativement faible mais incontestable (eau tritiée). L'hypothèse de FELTS et alii, (1974) pourrait rendre compte de cette situation ; ils pensent que les triglycérides ne sont pas métabolisés par les hépatocytes mais sont probablement issus de l'hydrolyse des lipoprotéines par des lipases au niveau des capillaires sanguins. La réaction produit du glycérol et des acides gras libres qui retournent dans les hépatocytes à travers la membrane cellulaire (dans le prochain chapitre nous donnerons des arguments morphologiques à cette hypothèse puisque nous observons une accumulation nocturne d'inclusions lipidiques dans l'hépatocyte du lapin nourri "ad libitum").

B - REMARQUES SUR LES ROLES RESPECTIFS DU FOIE ET DU TISSU ADIPEUX DANS LA SYNTHÈSE ET LE STOCKAGE DES LIPIDES.

A partir de mesures faites "in vivo" VEZINHET (1976) conclut que le foie et le tissu adipeux participeraient de façon quasi équivalente à la biosynthèse d'acides gras chez les jeunes lapins (âgés de 35 jours), mais la participation du foie dans la lipogenèse serait ensuite prédominante chez le lapin à maturité (âgé de 6 mois). Cependant ces résultats ne s'accordent pas avec les études elles aussi "in vivo" de LEUNG et BAUMAN (1975) chez le lapin qui rapportent, pour la lipogenèse, une prédominance hépatique comparativement au tissu adipeux chez le jeune lapin en croissance (voir chapitre III), puis une inversion de ce rapport chez le lapin à maturité avec alors une prédominance du tissu adipeux.

"In vitro" sur l'hépatocyte isolé, nous observons une triglycéro-rogénèse chez le lapin adulte normal et la synthèse "de novo" d'acides gras est pratiquement absente quel que soit le précurseur utilisé. Au contraire, l'adipocyte du lapin adulte synthétise "de novo" des acides gras à partir de l'acétate. Ces contradictions, liées certainement aux approches différentes des études "in vivo" et "in vitro", se retrouvent aussi lors des comparaisons entre espèces ; en effet, si pour toutes les espèces, le foie et le tissu adipeux sont les sites majeurs de la conversion d'énergie excédentaire en acides gras, leur importance relative dans cette participation à la lipogenèse varie selon les espèces. C'est ainsi que LEUNG et BAUMAN, (1975) tendent à les classer en trois catégories :

- celles avec prédominance du foie, le tissu adipeux fonctionnant seulement comme un site de stockage des acides gras préformés,

par exemple, les oiseaux (GOODRIDGE et BALL, 1967 ; O'HEA et LEVEILLE, 1969 c) et l'homme (SHRAGO et alii, 1971).

- celles avec une contribution du tissu adipeux plus importante comparativement au foie, par exemples, la souris (JANSEN et alii, 1966; MUIRURI et LEVEILLE, 1970) et le rat (LEVEILLE, 1967).

- celles, enfin, avec prédominance du tissu adipeux, par exemples, les porcins (O'HEA et LEVEILLE, 1969 a et b), les ovins (INGLE et alii, 1972 a et b) et les bovins (INGLE et alii, 1972 a ; HOOD et alii, 1972).

C - DES EFFETS DE L'INSULINE SUR LA LIPOGENESE HEPATIQUE

La triglycérogénèse à partir du glucose par l'hépatocyte isolé du lapin adulte est sensible aux effets de l'insuline. Chez l'animal à jeun, l'insuline (0,1 et 1 mUI/ml) stimule la lipogénèse à partir du glucose, en revanche, chez l'animal nourri "ad libitum" nous enregistrons une diminution de l'effet stimulant de l'insuline en présence de glucose ; il y a même en outre chez cet animal nourri, diminution de la lipogénèse basale sans insuline. Ceci va dans le sens des observations de LARDY et alii (1965) qui montrent que l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxykinase chez le rat est augmentée par le jeûne et par le diabète alloxanique. En revanche, pour notre part chez le lapin nourri, l'insuline stimule l'incorporation du tritium qui révèle une lipogénèse incontestable bien que de faible amplitude, il en est de même pour l'incorporation de l'acétate dans les lipides.

Remarquons que chez le lapin au niveau du tissu adipeux la littérature souligne l'aspect contradictoire du rôle de cette hormone. SAGGERSON (1974) et CATANZANO et alii (1986) décrivent une augmentation du stockage des triglycérides par l'adipocyte sous l'influence de l'insuline contrairement aux conclusions de DI GIROLAMO et RUDMAN (1966). La cellule adipeuse répondrait à l'insuline en augmentant l'entrée du glucose et en favorisant l'incorporation de ses carbones dans les lipides. Il s'en suit une réponse graduée de ce tissu à l'hormone (BALL et alii, 1959 ; FLATT et BALL, 1964 ; HAVEL, 1974).

CHAPITRE II

MOBILISATION ET ELABORATION COMPAREES DES RESERVES ENERGETIQUES DE L'ADIPOCYTE ET DE L'HEPATOCYTE CHEZ LE LAPIN. CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCADIENS ET CIRCANNUELS

I - LES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCADIENS

II - LES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCANNUELS

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

CHAPITRE II

I - LES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCADIENS

A - LA DISPONIBILITE PLASMATIQUE EN SUBSTRATS ENERGETIQUES

B - LES RESERVES ENERGETIQUES AU NIVEAU DU FOIE

C - MOBILISATION ET ELABORATION COMPAREES DES RESERVES ENERGETIQUES AU NIVEAU CELLULAIRE

1 - Cycles circadiens et hépatocyte

a) *Aspects histochimiques : cycle de la morphologie de l'hépatocyte*

b) *Aspects métaboliques : cycle de l'activité lipogénique*

2 - Cycles circadiens et adipocyte

a) *Cycles de l'activité lipogénique et des effets de l'insuline*

b) *Cycles de l'activité lipolytique et des influences hormonales (synacthène et isoprotérénol)*

II - LES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCANNUELS

A - LA DISPONIBILITE PLASMATIQUE EN SUBSTRATS ENERGETIQUES

B - LES RESERVES ENERGETIQUES AU NIVEAU DU FOIE

C - MOBILISATION ET ELABORATION DES RESERVES ENERGETIQUES AU NIVEAU DE L'ADIPOCYTE

1 - Cycles circannuels de l'activité lipogénique et des effets de l'insuline

2 - Cycles circannuels de l'activité lipolytique et des influences hormonales (synacthène et isoprotérénol)

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A - DES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCADIENS

1 - Des disponibilités énergétiques

2 - Des cycles lipogénèse-lipolyse et des effets de l'insuline au niveau de l'hépatocyte et de l'adipocyte

B - DES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCANNUELS

Le lapin dit domestique n'en est pas moins un animal sauvage comme le montre son comportement d'activité physique qui reste nocturne même après des générations en situation d'élevage. Ce cycle physiologique est en coïncidence avec le photopériodisme circadien et il est possible de distinguer en première analyse d'autres rythmes comportementaux de même période. Ainsi le comportement alimentaire du lapin a-t-il été étudié par de nombreux auteurs (CHEVILLARD, GASNIER et MAYER, 1939 ; PRUD'HON et alii, 1972 ; SANDERSON ET VANDERWEELE, 1975). Chez cet animal, il existe un rythme nyctéméral d'ingestion régulier, selon lequel environ deux tiers de la ration alimentaire sont consommés la nuit. Toutefois, la fréquence des prises, leur amplitude et leur répartition au cours du nyctémère varient en fonction de nombreux paramètres : l'âge (PRUD'HON et alii, 1975 a) ; la température ambiante (PRUD'HON, 1976), le jeûne préalable (HORNICKE et alii, 1976), les conditions d'abreuvement (PRUD'HON et alii, 1975 b), et enfin l'état physiologique de l'animal (REYNE et alii, 1977 ; GEISELMAN et alii, 1960).

Au sevrage, le lapin complète ses repas par l'ingestion des coecotrophes (MYERS, 1955) dont le phénomène est connu depuis MOROT (1882) ; ce sont des fécalomes mous dont la morphologie rappelle celle d'un épi de graminées constitué d'amas de petites sphères collées entre elles par du mucus. Ces coecotrophes sont riches en acides aminés, en complexes vitaminiques B et en eau ; leur valeur énergétique est voisine de celle d'un glucide (GALLOUIN et alii, 1978). Ces éléments nutritifs sont élaborés par les microorganismes du coecum et du colon (vitamines) et de fait, l'animal en les ingérant prévient les avitaminoses, ils représentent donc pour lui un processus de défense dépendant d'une autorégulation. HORNICKE et BATSCH (1977), LAPLACE (1978) pensent que la coecotrophie résulte d'un ensemble de phénomènes digestifs, mécaniques et chimiques qui la provoquent environ 8 heures après le début d'un repas. Ainsi selon (LAPLACE, LEBAS, RIOPEREZ, 1974 et 1975 ; LAPLACE et LEBAS, 1975) les coecotrophes sont réingérés par le lapin très tôt le matin en période d'activité minimale. D'après les travaux de MOROT (1882) la quantité et la nature des coecotrophes émises sont directement liées à la ration alimentaire de l'animal ; elles aussi sont donc soumises à un rythme circadien (BEAUVILLE et RAYNAUD, 1963 ; GALLOUIN, 1972 ; GALLOUIN et alii, 1979 ; HORNICKE et BATSCH, 1977 ; JILGE, 1980 a et b, 1983). La coecotrophie est une conduite de défense et d'épargne aidant l'homéostasie de l'espèce ; elle exprime sans doute un besoin qui peut être lié au métabolisme cérébral et plus particulièrement à celui de certains centres, qui sont à la fois anatomo-fonctionnels des intégrations endocrino-métaboliques du sommeil et des régulations alimentaires (FAURE, VINCENT et BENSCH, 1966).

En rapport avec ces cycles comportementaux de la prise alimentaire du lapin à activité nocturne, il nous a paru intéressant

CYCLE CIRCADIEN DE LA PRISE ALIMENTAIRE DU LAPIN DE 60 JOURS NOURRI "AD LIBITUM"

L = light = jour D = dark = nuit	Eau bue (ml/h)		Aliments consommés (g/h)	
	JOUR	NUIT	JOUR	NUIT
HIVER (L/D - 10/14) Moyennes ± ESM	8,0 ± 1	25,5 ± 7	4,1 ± 0,4	9,0 ± 0,3
ETE (L/D - 16/8) Moyennes ± ESM	5,0 ± 0,6	44,6 ± 12,3	3,6 ± 0,2	8,8 ± 0,5
L/D - 12/12	Mesures de GEISELMAN et alii (1980)		4,8	10,48
HIVER L/D - 10/14	Calcul rapportant les valeurs mesurées de GEISELMAN et alii (1980) à des photopériodes d'hiver et d'été		5,7	9,0
ETE L/D - 16/8			3,6	15,7

La consommation alimentaire du lapin est cyclique, l'ingestion nocturne est environ deux fois plus élevée que l'ingestion diurne.

d'aborder l'étude des cycles métaboliques de la mobilisation et de l'élaboration des réserves énergétiques au niveau de l'hépatocyte et de l'adipocyte isolés afin d'évaluer une éventuelle corrélation avec l'état nutritionnel de l'animal. Dans notre étude, seules des relations de coïncidences seront décrites, le déterminisme causal de ces différents cycles fera l'objet de prochains travaux.

I - LES CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCADIENS

L'étude a porté sur 60 lapins mâles, âgés de 60 jours. La mesure de la prise alimentaire (aliments et eau de boisson) au cours du nycthémère (tableau ci-après), montre que l'ingestion nocturne est prépondérante. Ainsi, en hiver, $9,0 \pm 0,3$ g d'aliment par heure sont consommés pendant la nuit pour $4,1 \pm 0,4$ g par heure dans la journée ; en été l'ingestion est tout à fait comparable et le rythme subsiste, de l'ordre de 1/3 diurne pour 2/3 nocturnes.

A₁ - LA DISPONIBILITE PLASMATIQUE EN SUBSTRATS ENERGETIQUES (TABLEAUX ANALYTIQUES 13, 14, 15, 16 ; FIGURE X ET TABLEAU VI)

Il est possible de distinguer une variation circadienne du taux plasmatique des lipides et du glucose ; toutefois celle-ci n'est perceptible qu'en hiver. Ainsi en hiver, le taux des lipides totaux en fin de nuit est accru de 140 p. cent par rapport au taux diurne (693 ± 66 mg p. cent ml contre 305 ± 25) ; de même les triglycérides et le cholestérol total augmentent de 40 p. cent en fin de nuit. La glycémie est aussi plus élevée la nuit que le jour (294 ± 13 mg p. cent ml à 4 heures contre 173 ± 5 mg p. cent ml à 10 heures) soit 70 p. cent d'augmentation en fin de nuit. Les protéines glycosylées qui sont le reflet à court terme (quelques jours) du niveau glycémique ne présentent pas de variations sur cette trop courte période qu'est le nycthémère.

B - LES RESERVES ENERGETIQUES AU NIVEAU DU FOIE (TABLEAUX ANALYTIQUES 13, 14, 15, 16 ; FIGURE X et TABLEAU VI).

Au cours du nycthémère il existe une remarquable et importante variation de la masse du foie qui est maximale en fin de nuit (+ 34 %) ; ceci ne s'observe qu'en hiver. Malgré l'accroissement du poids corporel, le rapport poids foie/poids du corps augmente (+ 44 %) en fin de nuit ce qui souligne l'importance de la variation de la masse du foie au cours de la nuit. Cette élévation de la masse hépatique et du rapport poids du foie/poids du corps est progressive pendant la nuit, 27 % d'augmentation entre 21 heures et 4 heures du matin.

Figure X - Disponibilités énergétiques du foie de lapin de 60 jours nourri "ad libitum" - Cycles circadien et circannuel.

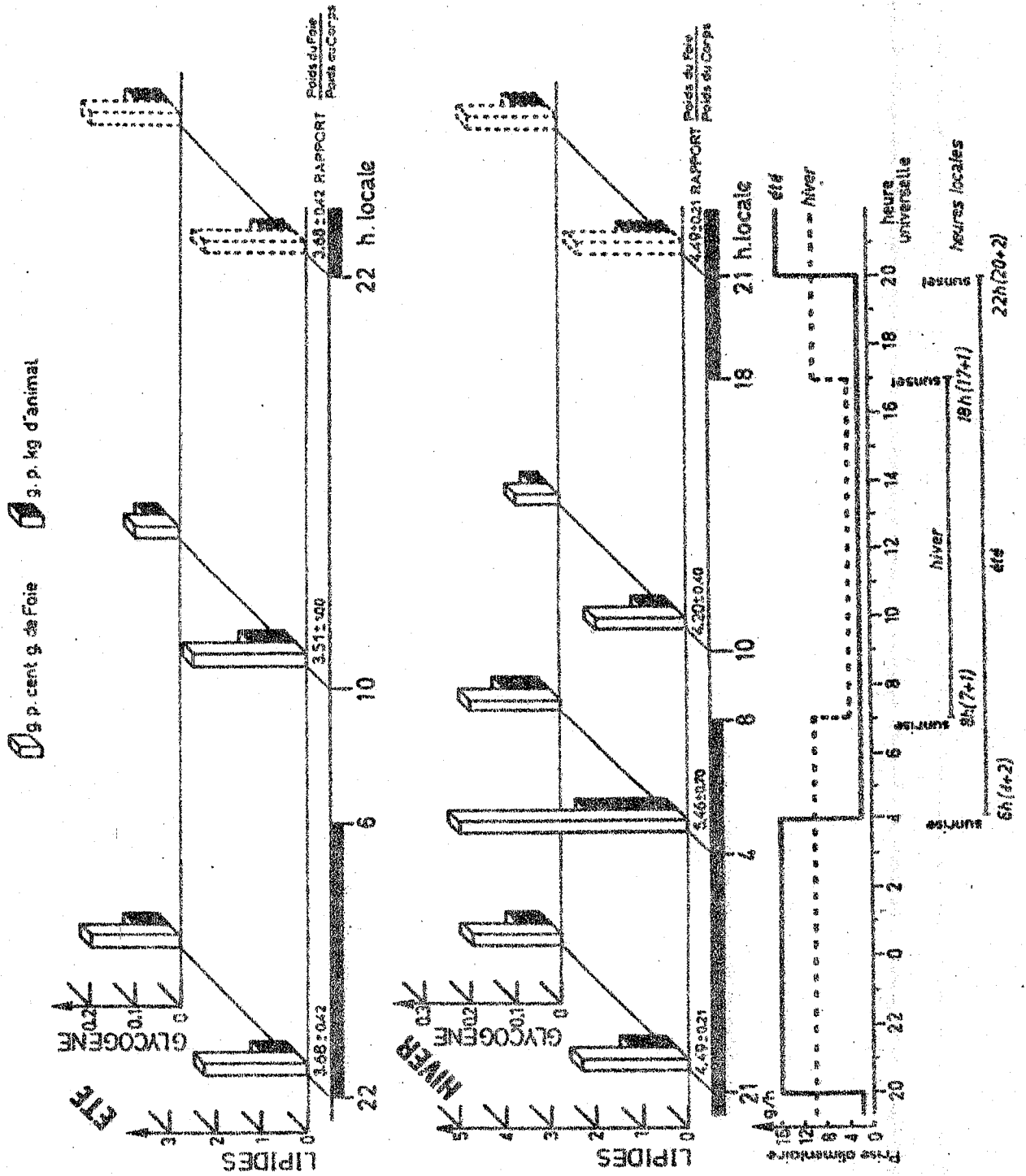


TABLEAU VI - Cycles physiologiques circadiens et circasadiens des réserves énergétiques hépatiques et des constituants plasmatiques de lapins de 60 jours nourris "ad libitum".

Heure locale	Poids Corporel (g)	Poids du Foie (g)	FOIE		PLASMA									
			Lipides totaux (poids sec)	Cholestérol total	Glycogène	Lipides totaux	Triglycérides	Cholestérol total	Glucose	Protéines glycosylées				
			mg p. cent g de foie animal	mg p. cent g de foie animal	g de foie animal	g p. cent g de foie animal	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml		
ETE (L/D - 16/8)														
JOUR (14 h)	1723 ± 43	64,78 ± 1,86	3,51 ± 1,00	2,84 ± 0,11	0,92 ± 0,07	121 ± 10	48 ± 3	0,13 ± 0,03	0,04 ± 0,01	258 ± 26	112 ± 12	64 ± 8	156 ± 7	
NUIT (0 h)	1775 ± 275	65,78 ± 2,26	3,68 ± 0,12	2,30 ± 0,40	0,84 ± 0,12	206 ± 11	76 ± 1	0,21 ± 0,01	0,08 ± 0,01	218 ± 83	100 ± 23	32 ± 15	139 ± 17	
HIVER (L/D - 10/14)														
JOUR (12 h)	1617 ± 38	67,17 ± 3,90	4,70 ± 0,40	2,07 ± 0,20	0,82 ± 0,16	129 ± 17	50 ± 10	0,110 ± 0,004	0,040 ± 0,004	289 ± 24	93 ± 9	64 ± 6	173 ± 5	34,4 ± 3,7
NUIT (21 h)	1671 ± 24	74,95 ± 3,74	4,89 ± 0,21	2,36 ± 0,36	1,06 ± 0,08	127 ± 4	37 ± 3	0,21 ± 0,03	0,09 ± 0,03	305 ± 25	98 ± 6	66 ± 6	154 ± 6	29,03 ± 4,90
NUIT (4 h)	1620 ± 86	89,71 ± 13,93	5,46 ± 0,70	5,00 ± 0,17	2,71 ± 0,31	126 ± 11	68 ± 10	0,24 ± 0,03	0,13 ± 0,02	693 ± 66	130 ± 23	89 ± 15	294 ± 13	37,45 ± 6,04

[] Nombre d'individus
 * Valeurs de la "nuit" significativement différentes de la valeur du "jour" correspondante au seuil de 0,05
 * Valeurs de "4 h du matin" significativement différentes de la valeur de "nuit" correspondante au seuil de 0,05
 * Valeurs d'"hiver" significativement différentes de la valeur d'"été" correspondante au seuil de 0,05
 En conclusion, au niveau du foie et du plasma, l'analyse quantitative des lipides et des glucides met en évidence une importante variation circadienne de ces composants dont le taux s'accroît au cours de la nuit et atteint son maximum en fin de nuit.

La teneur du foie en graisses est aussi variable au cours du nyctémère. Compte tenu de la variation circadienne du poids du foie par rapport au poids du corps, le cycle circadien de l'accumulation hépatique en lipides est beaucoup plus perceptible lorsqu'on rapporte les lipides au poids de l'animal ce qui rend compte plus justement de la réalité quantitative des réserves lipidiques dont dispose efficacement l'animal. Ainsi par rapport au poids du foie la teneur en graisses s'accroît progressivement en période nocturne de 14 % à 21 heures et de 141 % à 4 heures du matin ; rapportés au poids corporel l'augmentation est de 230 % à 4 heures du matin. Ceci souligne l'ampleur de cette surcharge nocturne du foie en graisses. Notons que lors des prélèvements l'aspect macroscopique du foie est très caractéristique, alors que le jour le foie est de couleur rouge foncé, la nuit, il est de couleur crème (aspect d'un foie "gras"). Enfin l'évaluation du cholestérol total montre aussi cette variation circadienne, la surcharge hépatique étant de 57 % en période nocturne d'été.

De même au niveau des réserves glucidiques il existe un cycle circadien ; ainsi le glycogène hépatique rapporté à 100 g de foie frais, subit une augmentation nocturne de 61 % en été et exprimé par rapport au poids corporel, cette surcharge nocturne est plus spectaculaire, elle est de 100 % ; en hiver l'accroissement nocturne atteint 225 % en fin de nuit.

Au niveau du foie l'analyse quantitative des lipides et des glucides met en évidence une importante variation circadienne des réserves énergétiques dont la quantité s'accroît au cours de la nuit et atteint son maximum en fin de nuit : il y a donc une mise en réserve nocturne au niveau du foie.

C - MOBILISATION ET ELABORATION COMPAREES DES RESERVES ENERGETIQUES AU NIVEAU CELLULAIRE

1°) Cycles circadiens et hépatocyte

a) Aspects histochimiques : cycle de la morphologie de l'hépatocyte

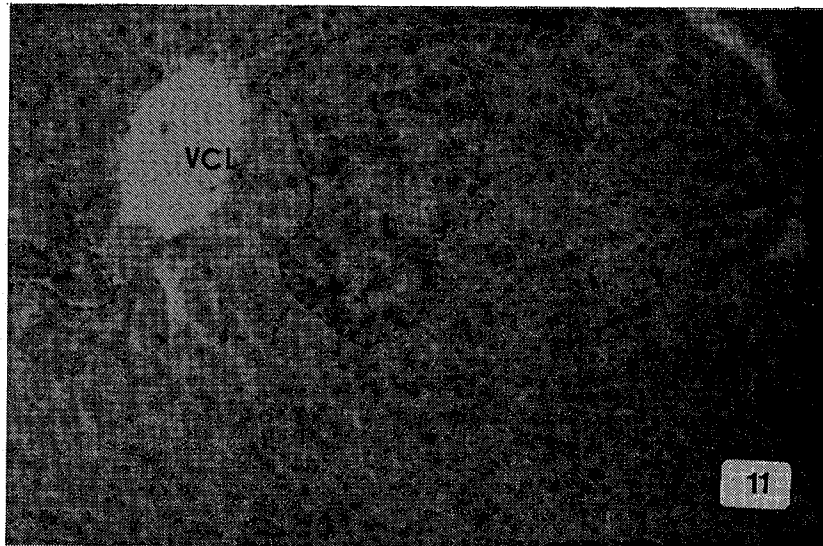
Remarque : La recherche des lipides est faite après fixation des fragments de foie dans du formol à 10 % et coloration à l'huile rouge ; le glycogène est mis en évidence après fixation au DUBOSQ-BRASIL et traitement à l'acide périodique de SCHIFF (A.P.S.).

L'analyse morphologique tant du foie que des hépatocytes isolés va confirmer les observations quantitatives précédentes. Ainsi à minuit (heure locale) nous voyons une accumulation tissulaire (figures 11 et 12) de lipides et de glycogène. La répartition géographique de ces réserves dans le lobule hépatique n'est pas homogène, lipides et glycogène se concentrant autour de la veine centrolobulaire. Remarquons l'aspect en mosaïque de la répartition du glycogène (dans le chapitre suivant ce phénomène s'observera nettement aussi chez le lapereau).

PLANCHE 5

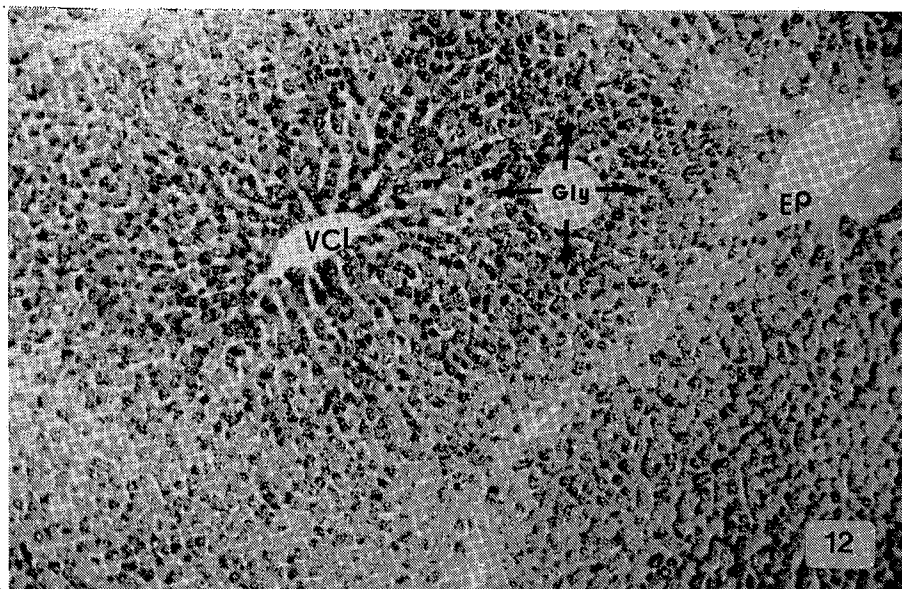
DISTRIBUTION NOCTURNE DES LIPIDES ET DU GLYCOGENE
DANS LE LOBULE HEPATIQUE DU LAPIN DE 60 JOURS NOURRI "AD LIBITUM"

CYCLE CIRCADIDIEN : Sacrifice à minuit en Eté (22 h. u.)



Lipides

X 71



Glycogène

X 36

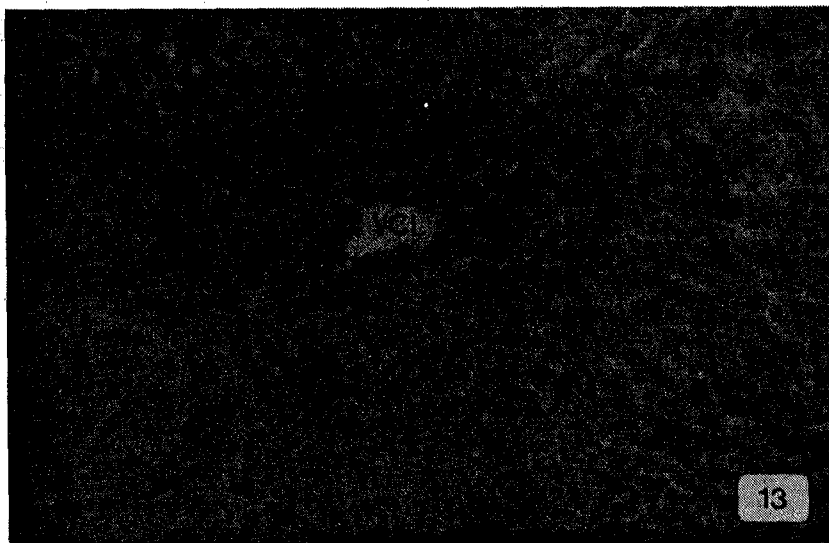
Figure 11 : Nous observons des gouttelettes lipidiques de petite taille concentrées dans le secteur centrolobulaire.

Figure 12 : Notons l'accumulation de glycogène surtout dans le secteur centrolobulaire.

PLANCHE 6

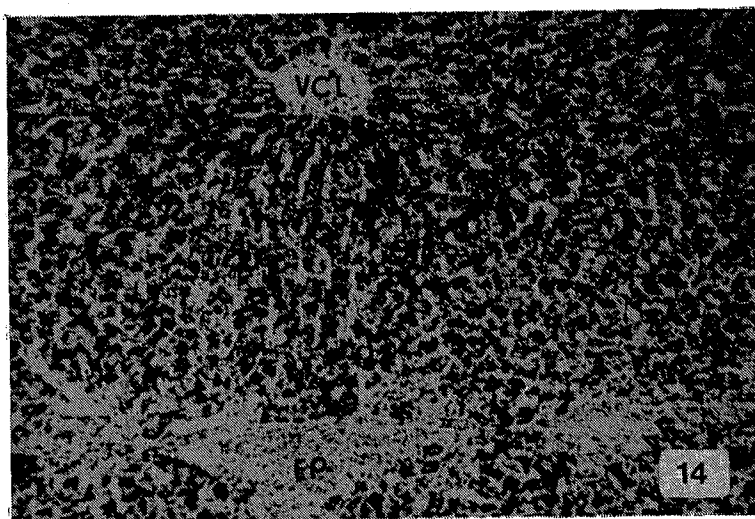
DISTRIBUTION NOCTURNE DES LIPIDES ET DU GLYCOGENE DANS
LE LOBULE HEPATIQUE DU LAPIN DE 60 JOURS NOURRI "AD LIBITUM"

CYCLE CIRCAIDIEN : Sacrifice à 4 h. du matin en Eté (2 h.u.)



Lipides

X 71



Glycogène

X 71

Figure 13 : Notons l'accumulation lipidique importante dans le lobule hépatique

Figure 14 : Observons la surcharge du lobule hépatique en glycogène.

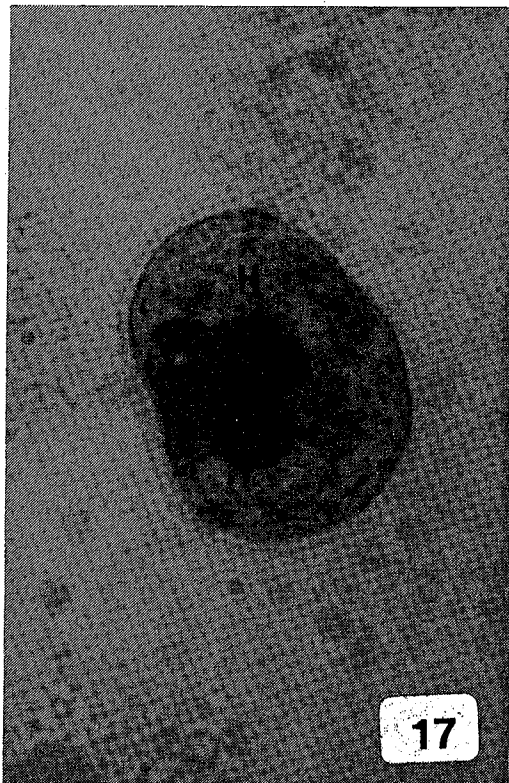
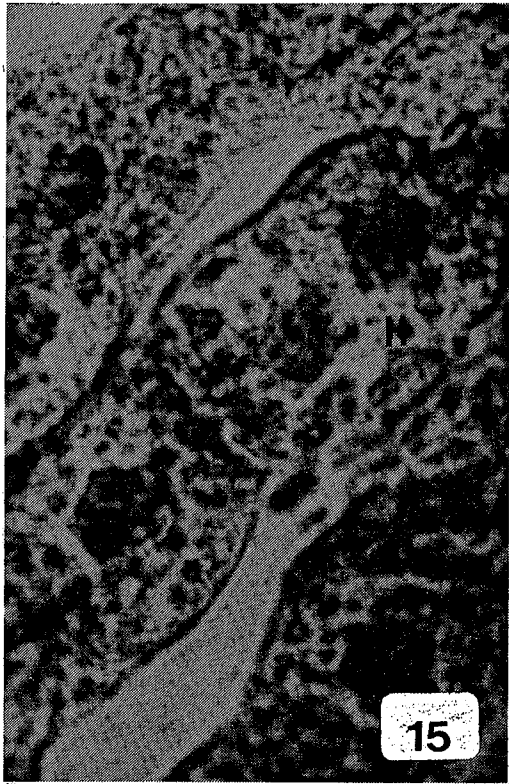
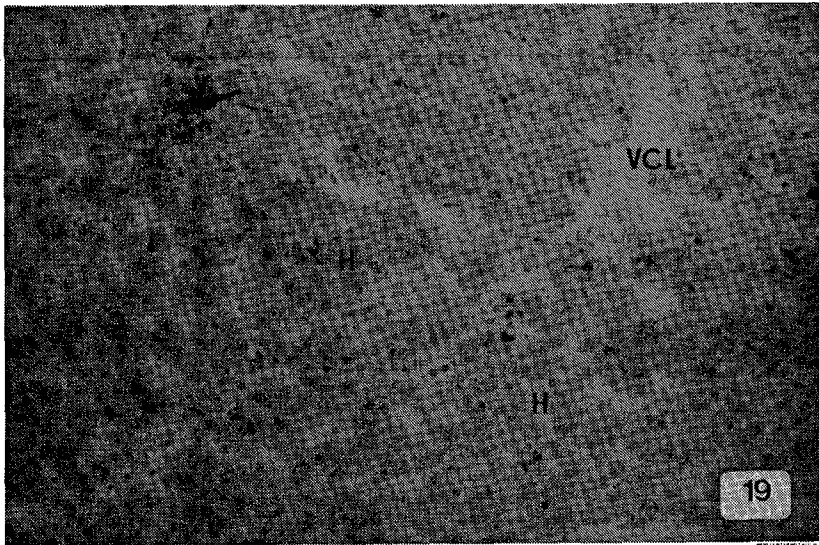


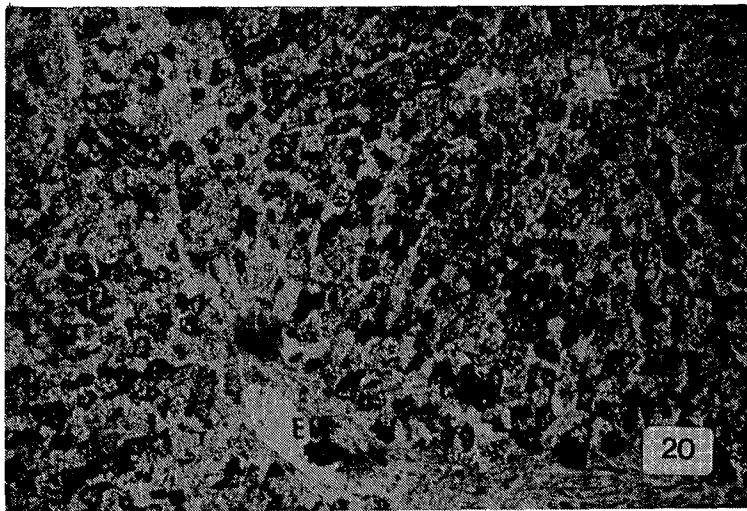
PLANCHE 8

DISTRIBUTION DES LIPIDES ET DU GLYCOGENE DANS
LE LOBULE HEPATIQUE DU LAPIN DE 60 JOURS NOURRI "AD LIBITUM"
CYCLE CIRCADYEN : Sacrifice à 10 h. du matin en Eté (8 h. u.)



Lipides

X 71



Glycogène

X 71

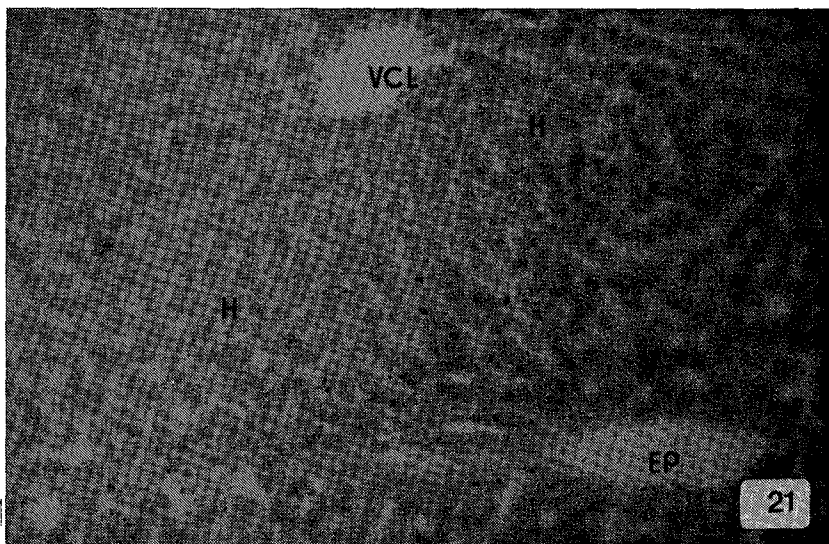
Figures 19 : Notons l'absence totale de globules lipidiques dans les hépatocytes

Figures 20 : Notons la présence modérée de glycogène par rapport à la charge nocturne.

PLANCHE 9

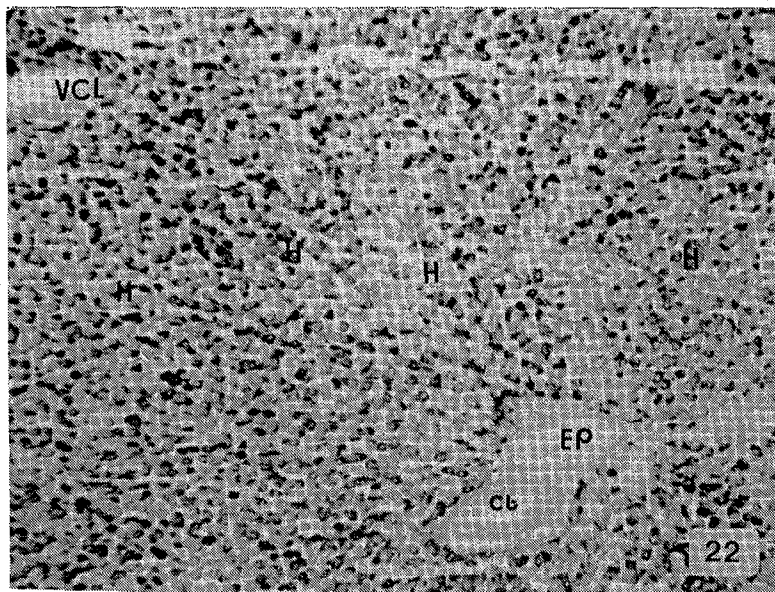
DISTRIBUTION DES LIPIDES ET DU GLYCOGENE DANS
LE LOBULE HEPATIQUE DU LAPIN DE 60 JOURS NOURRI "AD LIBITUM"

CYCLE CIRCAIDIEN : Sacrifice à 17 h. en Eté (15 h. u.)



Lipides

X 71



Glycogène

X 71

Figure 21 : Notons l'absence de globules lipidiques dans les hépatocytes

Figure 22 : Le glycogène apparaît sous forme d'une mosaïque dans les lobules hépatiques.

A 4 heures du matin (heure locale), l'accumulation tissulaire (figures 13 et 14) et cellulaires (figures 17 et 18) en lipides et en glycogène est encore plus élevée. Le jour, en revanche nous constatons la disparition des lipides (figures 15, 16, 19 et 21) et une nette régression des réserves en glycogène (figures 20 et 22).

Cette approche méthodologique différente, histochimie, confirme les analyses quantitatives et montre à l'évidence que le foie est le siège d'un cycle circadien de stockage nocturne des lipides et des glucides avec une vidange diurne importante pour les graisses et moins forte pour le glycogène.

b) Aspects métaboliques : cycle de l'activité lipogénique (tableaux 17 a, b, c et VII).

La figure XI qui rassemble nos résultats permet de retrouver chez ces animaux de 60 jours ce que nous avons décrit dans le chapitre I chez le lapin adulte plus âgé. Ainsi l'activité lipogénique de l'hépatocyte est prouvée par l'incorporation dans les acides gras et les lipides totaux du tritium de l'eau tritiée ; de même nous retrouvons des carbones du glucose radioactif mais quasi-exclusivement dans les triglycérides c'est-à-dire que ce substrat ne fournit pas de carbone pour la synthèse des acides gras ; enfin les donneurs de carbone comme l'acétate et le propionate ne sont pas impliqués, dans nos conditions expérimentales, dans la lipogenèse.

Ce qui est remarquable, dans les résultats que nous présentons ici, c'est l'existence d'un cycle circadien de la lipogenèse "in vitro" de l'hépatocyte isolé. Ainsi tant à partir de l'eau tritiée que du glucose comme donneurs d'hydrogène et de carbone il est incontestable (différences significatives à 0,05) que l'intensité de la lipogenèse varie au cours du nyctémère ; nous observons le jour une augmentation des incorporations du tritium et du carbone dans les acides gras et surtout dans les triglycérides par rapport à la nuit. Pour rapporter l'incorporation des ions tritium dans les acides gras nous avons utilisé deux modes d'expression soit en cpm p. mg de protéines totales (tableau 17 b) soit en micromoles d'eau tritiée incorporées dans les acides gras p. 180 min. (tableau 17 c). Il est évident que quel que soit le mode d'expression nos conclusions restent semblables tant en ce qui concerne la lipogenèse que la mise en évidence des cycles circadiens.

En outre l'insuline qui, sur la lipogenèse à partir du glucose, n'a pas d'influence significative en période diurne comme nous l'avons déjà signalé (chapitre I), stimule la synthèse des acides gras (+ 36 %) ainsi que le révèle l'utilisation du tritium. De plus la nuit l'insuline stimule tout à la fois l'incorporation du tritium (+ 33 %) mais aussi et surtout l'incorporation des carbones provenant du glucose (+ 17 %).

Nous observons donc tout d'abord un cycle nyctéméral de la lipogenèse de l'hépatocyte isolé avec un maximum diurne mais aussi un cycle circadien de l'effet de l'insuline, qui la nuit, agit sur l'incorporation du glucose dans les triglycérides.

TABLEAU VII - Cycle circadien de l'activité lipogénique d'hépatocytes isolés de lapins de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline.

		Cpm P. 10 ⁶ cellules p. 180 minutes														
		LIPIDES TOTAUX						ACIDES GRAS								
Pré-traitement	Eau traitée	Glucose		Acétate		Propionate		Eau traitée		Glucose		Acétate		Propionate		
		Témoin	Insuline 1 mU/ml	Témoin	Insuline 1 mU/ml	Témoin	Insuline 1 mU/ml	Témoin	Insuline 1 mU/ml	Témoin	Insuline 1 mU/ml	Témoin	Insuline 1 mU/ml	Témoin	Insuline 1 mU/ml	
JOUR (6)	250 ± 103	340 ± 80	375 ± 78	608 ± 89	44 ± 11	49 ± 14	50 ± 12	31 ± 9	71 ± 17	90 ± 16	22 ± 6	31 ± 4	27 ± 6	22 ± 6	17 ± 4	19 ± 3
NUIT (5)	86 ± 27	105 ± 24	285 ± 37	334 ± 36	11 ± 3	11 ± 2	8 ± 1	9 ± 2	17 ± 3	23 ± 4	5 ± 1	9 ± 2	5 ± 1	6 ± 1	3 ± 1	4 ± 1
Cpm p. mg de protéines totales p. 180 minutes																
JOUR (6)	190 ± 99	259 ± 86	421 ± 79	472 ± 110	33 ± 9	38 ± 12	23 ± 11	21 ± 9	48 ± 13	63 ± 18	17 ± 6	22 ± 6	21 ± 6	19 ± 6	15 ± 3	17 ± 5
NUIT (5)	63 ± 22	84 ± 25	195 ± 27	228 ± 26	9 ± 3	8 ± 2	5 ± 1	6 ± 1	12 ± 3	16 ± 4	5 ± 2	6 ± 2	4 ± 1	5 ± 1	2 ± 1	3 ± 1

[] Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0,05

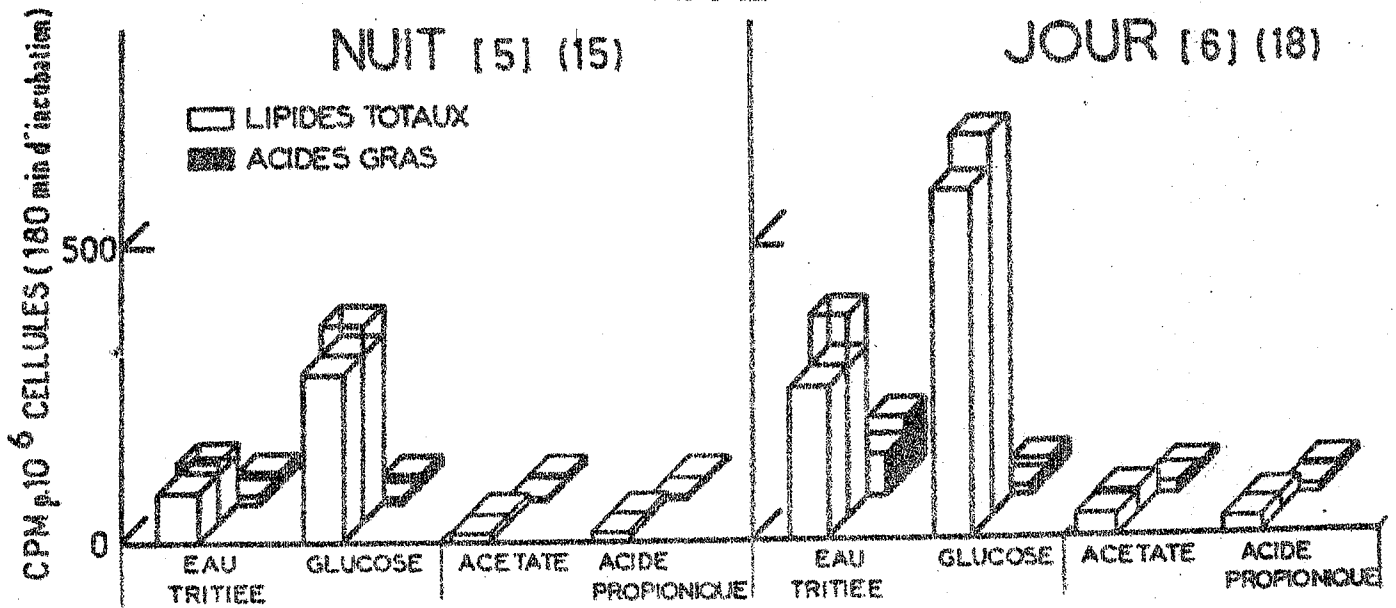
■ Valeurs de la "nuit" significativement différentes des valeurs du "jour" correspondantes au seuil de 0,05

Nous observons tout d'abord un cycle nyctéméral de la lipogénèse de l'hépatocyte isolé avec un maximum diurne mais aussi un cycle circadien de l'effet lipogénique de l'insuline, qui la nuit, agit sur l'incorporation du glucose dans les diglycérides.

Figure XI - Rythme circadien : activité lipogénique de l'hépatocyte isolé de lapin de 60 jours nourri "ad libitum" - Influence de l'insuline.

LIPOGENESE

HEPATOCYTES de LAPIN de 60 jours
HIVER



[] Nombre d'animaux

() Nombre d'essais

2°) Cycles circadiens et adipocyte

a) Cycles de l'activité lipogénique et effets de l'insuline (tableaux analytiques 18, 19, 20, 21 et figure XII, tableau VIII).

- Comparaison des propriétés lipogéniques de deux substrats, le glucose et l'acétate, au niveau de l'adipocyte :

D'après les résultats présentés dans le tableau VIII et la figure XII, on constate que l'adipocyte du tissu adipeux périrénal du lapin de 60 jours est capable de synthétiser des lipides à partir du glucose et de l'acétate. Aussi bien la nuit que le jour et l'été que l'hiver ; l'utilisation de l'acétate dans la synthèse "de novo" des acides gras est très significativement supérieure à celle du glucose, dans les mêmes conditions. Comme nous l'avons vu au niveau de l'hépatocyte (chapitre I), si l'on considère que la quantité de glucose et d'acétate exogènes apportée à la cellule est nettement excédentaire à son utilisation métabolique, on peut admettre que le pourcentage d'incorporation relatif de l'un des deux précurseurs, par exemple le glucose, pourra s'exprimer par le rapport :

$$\frac{\text{Quantité de glucose utilisé (nmoles)}}{\text{Total de l'incorporation des deux précurseurs (nmoles)}} \times 100$$

Ainsi lorsque la valeur du rapport tend vers 100 cela signifie que le précurseur envisagé est de plus en plus incorporé comparative-ment à l'autre substrat. Nous avons ainsi déterminé la contribution relative des deux précurseurs à la formation des acides gras "de novo" et des lipides totaux en dehors de toute stimulation hormonale, le jour et la nuit, été comme hiver. Nous résumons ci-dessous les résultats du pourcentage d'incorporation des deux précurseurs dans les lipides totaux et les acides gras synthétisés.

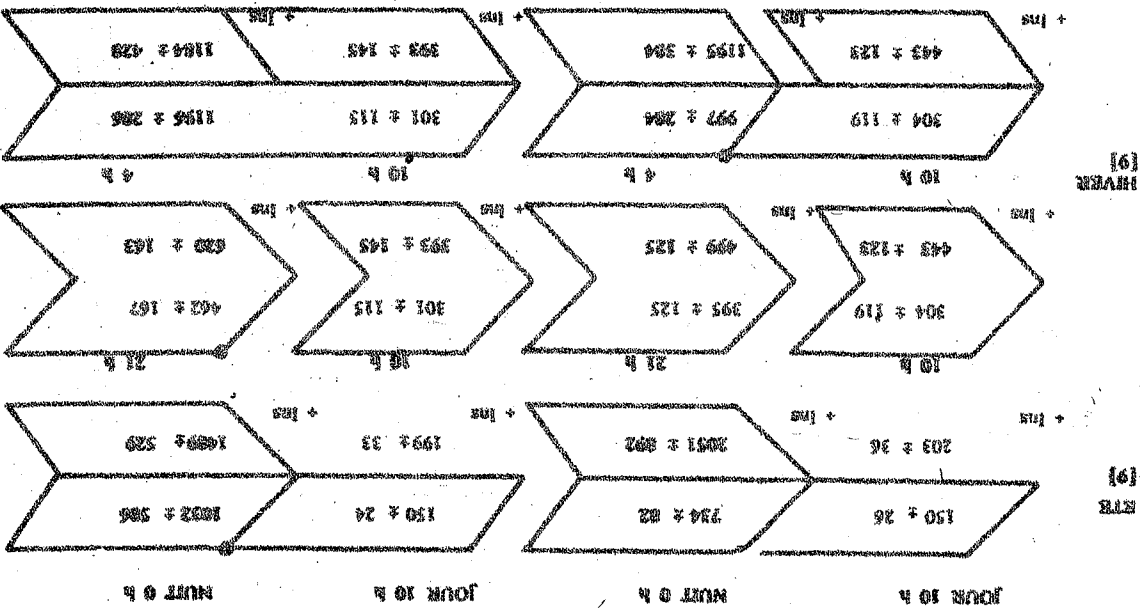
Nous constatons que la biosynthèse des acides gras s'effectue essentiellement à partir de l'acétate (rapports égaux ou supérieurs à 90) alors que le glucose est peu utilisé dans cette voie métabolique (rapports inférieurs à 10) sauf la nuit en été (rapport de 79). En revanche les carbones du glucose se retrouvent régulièrement dans les lipides totaux et non dans les acides gras synthétisés "de novo". Ainsi tant le jour, et aussi bien en été qu'en hiver (310 et 427 nmoles) que la nuit, et aussi bien en été qu'en hiver (423 et 722 nmoles) les carbones du glucose se retrouvent dans les triglycérides alors que les quantités décelées dans les acides gras restent toujours extrêmement faibles respectivement 19, 21, 25 et 82.

Par conséquent, le glucose ne participe que très faiblement à la synthèse "de novo" des acides gras, ses carbones marqués contribueraient essentiellement à la formation de l'alpha-glycérophosphate s'associant aux acides gras présents dans l'adipocyte pour participer à la triglycérogenèse.

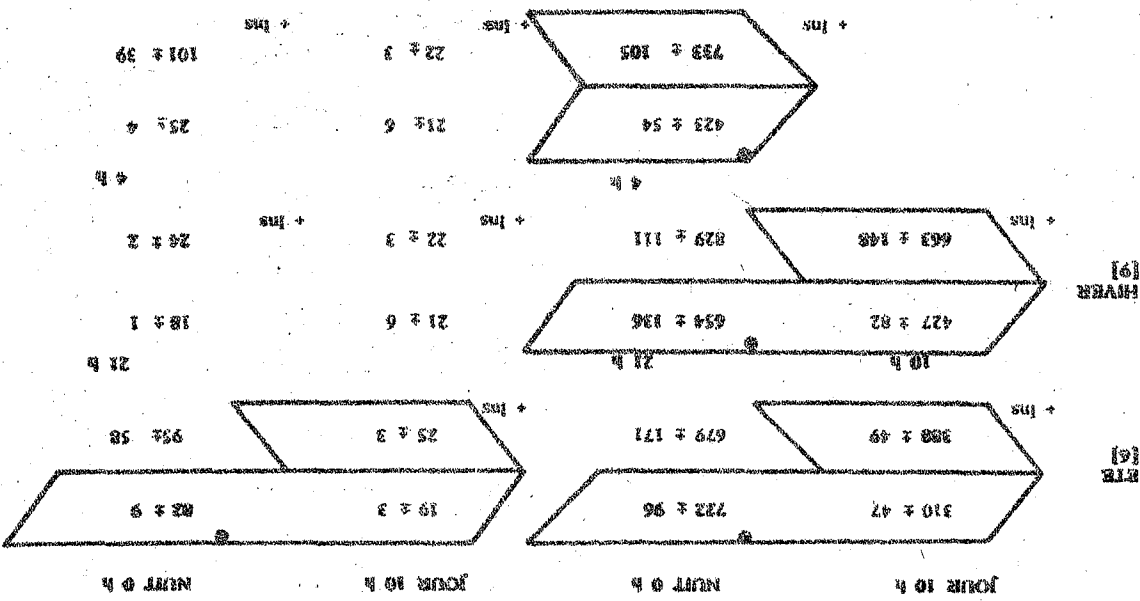
L'apogée à partir de l'ACTH en semaines p. Heures

Incorporé p. 2 de l'insuline totale

Incorporé p. 2 d'actes gram



L'apogée à partir de l'ACTH en semaines p. Heures



[] Nombre d'unitaires

Chiffres gras (•) : Valeurs significativement différentes de la valeur opposée du synchrone ou de la valeur témoin pour les effets de l'insuline

• Valeurs significativement différentes au cours du cycle circadien

Avec le précurseur glucosé nous observons un cycle nyctéméral de la triptogène de deux fois plus intense que le jour tant d'hiver que d'été, en outre l'insuline n'est efficace qu'en fin de nuit et le jour. La synthèse d'actes gras est seulement exacte en été la nuit. Avec le précurseur actés nous observons un rythme nyctéméral de la triptogène (triptogène est actés et gras) trois à quatre fois plus intense la nuit que le jour tant d'hiver que d'été, en outre l'insuline est au tout efficace la nuit. Ainsi les niveaux de l'actés et triptogène sont élevés et nocturnes : l'insuline pour sa part est le plus souvent efficace lors de l'apogée spontanée d'actés.

POURCENTAGE D'INCORPORATION DES PRECURSEURS

LIPIDES TOTAUX			ACIDES GRAS		
JOUR (10 h)	NUIT 21 h 0 h 4 h		JOUR 10 h	NUIT 21 h 0 h 4 h	

PRECURSEUR ACETATE						
EPE	LIPIDES TOTAUX			ACIDES GRAS		
		33	51		88	55
HIVER	42	38	70	93	96	98

PRECURSEUR GLUCOSE						
EPE	LIPIDES TOTAUX			ACIDES GRAS		
		67	50		11	79
HIVER	58	62	29	7	4	2

du 38ème jour après la naissance. A 28 jours (jour du sevrage) les inclusions lipidiques de très petites tailles sont distribuées dans les secteurs medio et périlobulaires, puis régressent pour ne plus exister dès le 38ème jour. Ces images nous informent donc sur la répartition intracellulaire et intralobulaire des lipides et confirment par là-même notre analyse quantitative.

Au niveau de la recherche du glycogène cette approche morphologique est plus riche d'enseignements que la simple étude quantitative. En effet, nous constatons que la distribution du glycogène suit de très près la répartition des inclusions lipidiques dans les premiers stades de développement du lapereau (de la naissance à l'âge de 20 jours). Au sevrage (28ème jour) nous observons un début de régression des réserves lipidiques commençant autour de la veine centrolobulaire alors qu'à ce stade, le glycogène est plus important et s'accumule dans les 3 secteurs du lobule hépatique ; par suite la diminution voire même la disparition des lipides dans les hépatocytes du lapereau de 38 jours s'accompagne de celle du glycogène. Chez le lapin de 60 jours si les lipides ont complètement disparu, le glycogène accumulé autour de la veine centrolobulaire à 38 jours, se désintègre en petites granulations se répartissant dans les 3 secteurs du lobule hépatique.

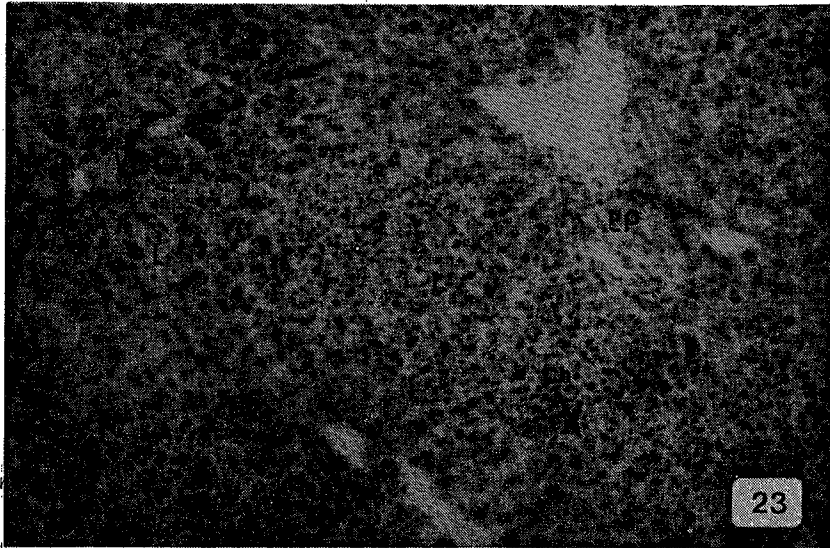
Cette approche morphologique de la recherche du glycogène au cours de la croissance du lapereau est pleine d'intérêts car elle complète les observations quantitatives ; le glycogène hépatique est extrêmement labile et dès le prélèvement son hydrolyse commence. Il apparaît que la fixation des fragments de foie au Dubosq-Brasil est très efficace, puisque nous décelons par cette méthode, du glycogène que le procédé d'analyse quantitative n'avait pu révéler.

Notre attention est attirée tout particulièrement par la présence des cellules hématopoïétiques dans le foie du nouveau-né et des lapereaux jusqu'à au moins 20 jours. Toutefois, cette lignée hématopoïétique ne s'observe plus à partir du sevrage du lapereau. Notons par ailleurs l'augmentation de la cohésion des hépatocytes au cours de la croissance ; en effet un système de jonctions intercellulaires renforçant l'adhésivité de ces cellules s'observe à partir du 28ème jour (jour de sevrage) du lapereau.

Peut-être que l'aspect le plus original révélé par cette approche morphologique du foie du lapereau au cours de la croissance serait la mise en évidence de cellules hématopoïétiques d'autant plus que chez les mammifères l'hématopoïèse est assurée dès la naissance au niveau de la rate et de la moelle osseuse. Une étude plus détaillée et approfondie de chaque catégorie de ces cellules ainsi observées permettra d'élucider leur rôle dans le foie du lapereau de la naissance au sevrage.

PLANCHE 10

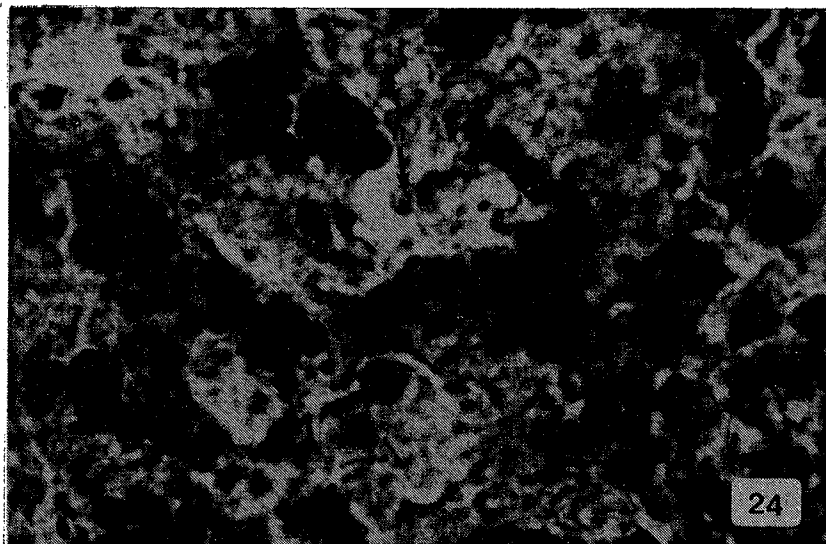
REPARTITION DES LIPIDES DANS LE LOBULE HEPATIQUE
Microscopie photonique



Naissance

Lipides

X 71



Naissance

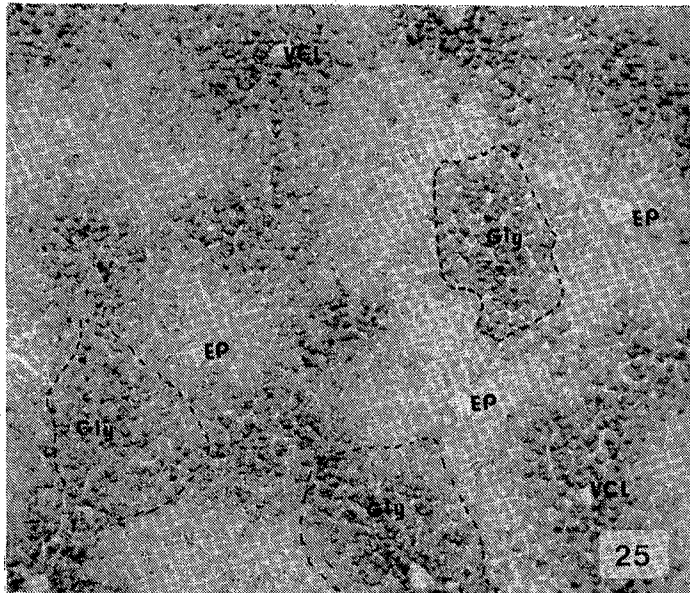
Lipides

X 710

Figures 23 - 24 : Nous observons une très forte surcharge lipidique autour de la veine centrolobulaire ; les globules lipidiques sont de grande taille. Notons la présence de cellules hématopoïétiques et d'amas de cellules sanguines (↗).

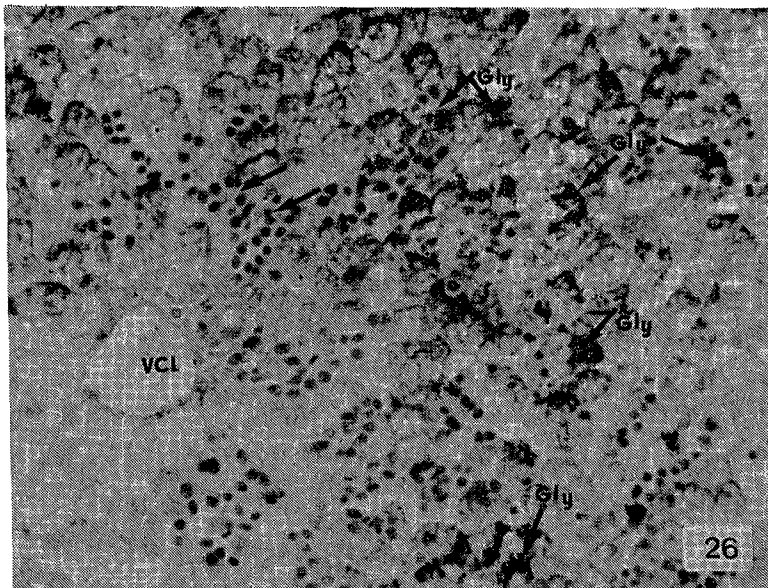
PLANCHE 11

REPARTITION DU GLYCOGENE DANS LE LOBULE HEPATIQUE
Microscopie photonique



Naissance
Glycogène

X 36



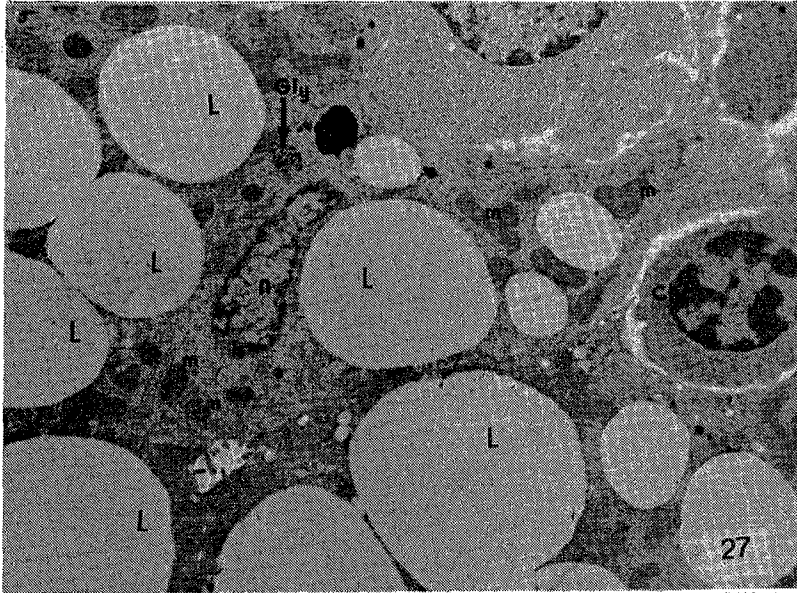
Naissance
Glycogène

X 108

Figures 25 - 26 : Le glycogène est distribué dans les mêmes secteurs que les lipides, c'est-à-dire autour de la veine centrolobulaire et non pas dans le secteur périlobulaire. Notons la présence de cellules sanguines regroupées en amas (→).

PLANCHE 12

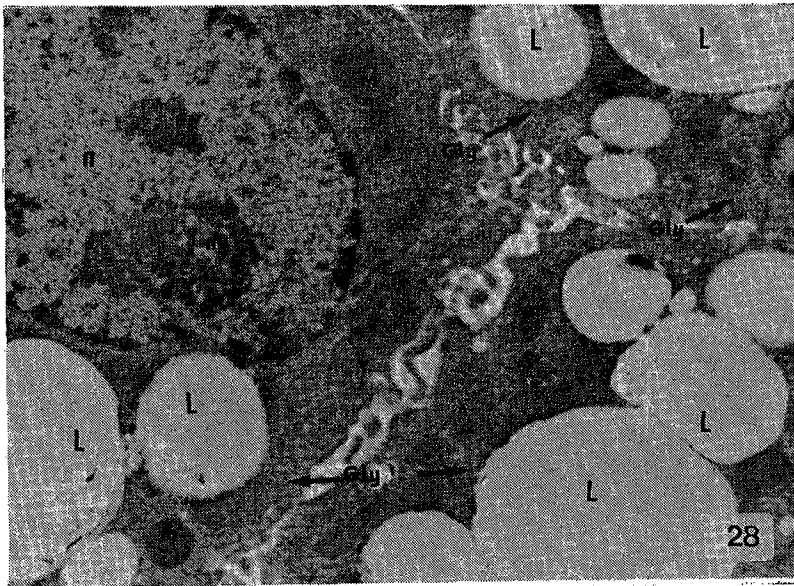
LIPIDES ET GLYCOGENE HEPATIQUES
en microscopie électronique



Naissance

Lipides et glycogène

X 5642



Naissance

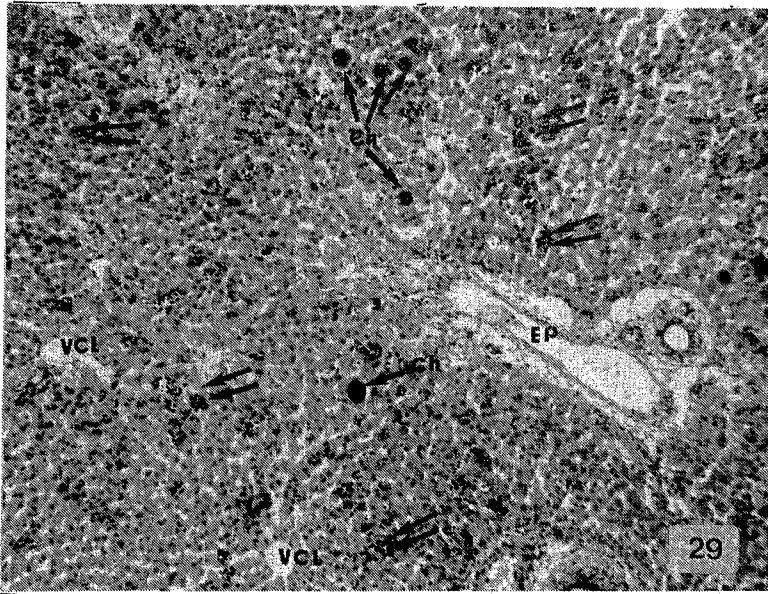
Lipides et glycogène

X 5642

Figures 27 - 28 : Nous observons de grosses inclusions lipidiques à proximité de rosettes de glycogène. Notons la présence de cellules hématopoïétiques entre les hépatocytes riches en mitochondries.

PLANCHE 13

STRUCTURE GENERALE DU FOIE



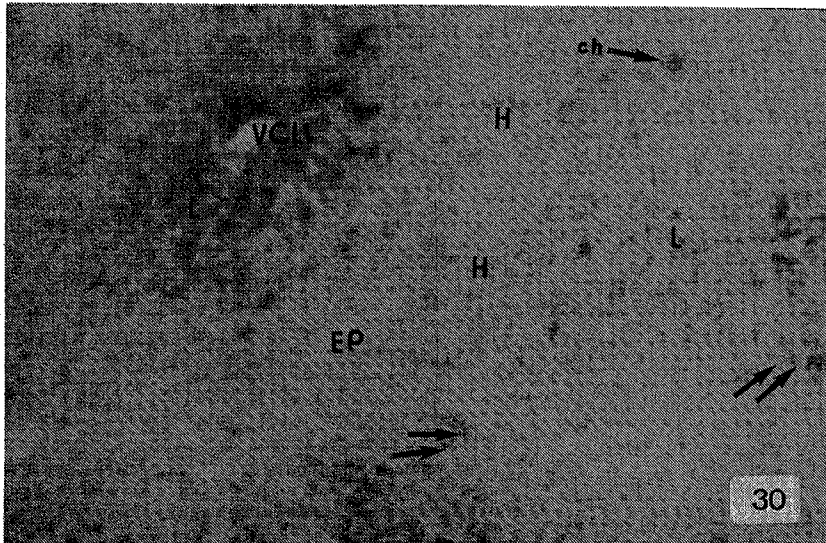
Lapereau de 10 jours

X 36

Figure 29 : Nous observons des lobules hépatiques dont le centre est occupé par la veine centrolobulaire et à la périphérie des espaces portes (veinule, artériole et canalicule biliaire). Notons la présence d'amas de cellules sanguines (⚡) et surtout de cellules hématopoïétiques.

PLANCHE 14

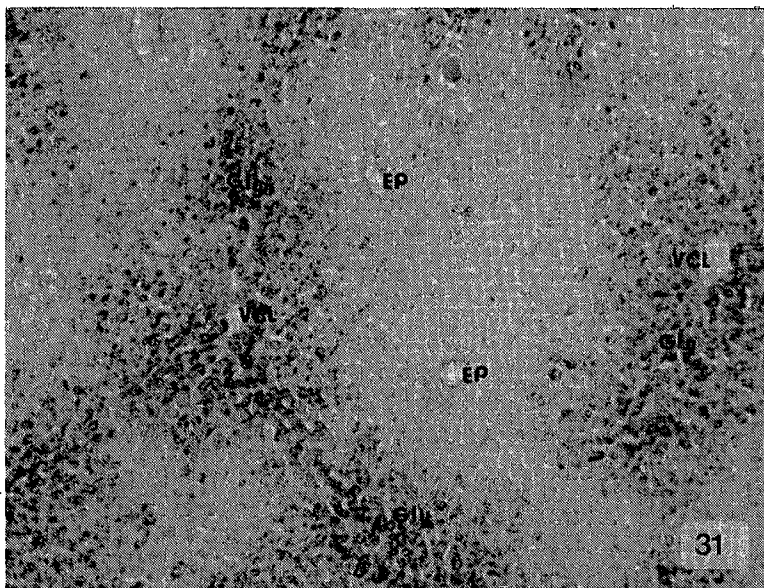
REPARTITION DES LIPIDES ET DU GLYCOGENE DANS LE LOBULE HEPATIQUE
en microscopie photonique



Lapereau de 10 jours

Lipides

X 28



Lapereau de 10 jours

Glycogène

X 36


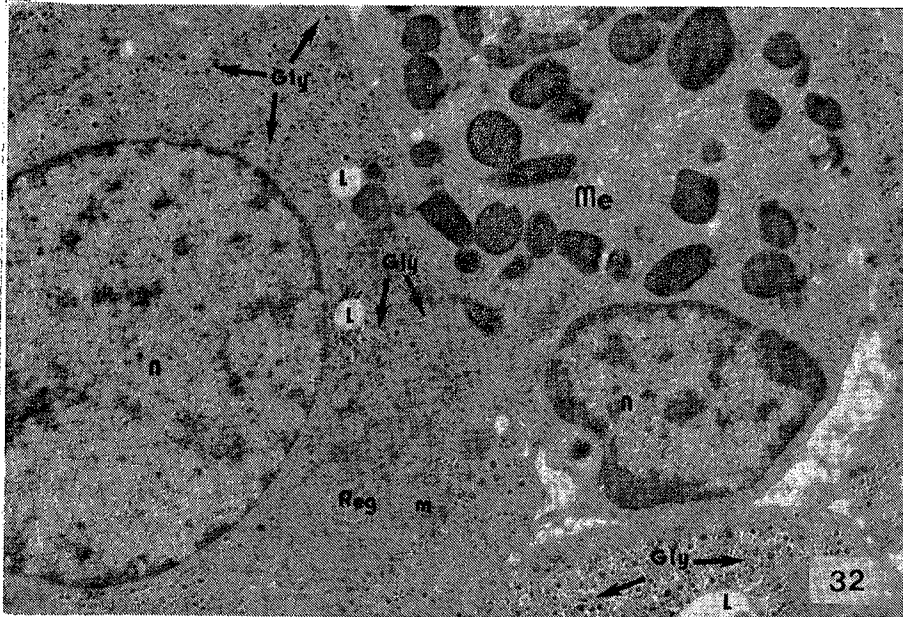
Figure 30 : Les inclusions lipidiques sont moins nombreuses qu'à la naissance mais leur distribution est similaire à celle de la naissance (autour de la veine centrolobulaire) ; nous observons des cellules hématopoïétiques et des amas de cellules sanguines ().

Figure 31 : Le glycogène est concentré autour de la veine centrolobulaire et absent dans le secteur périlobulaire.

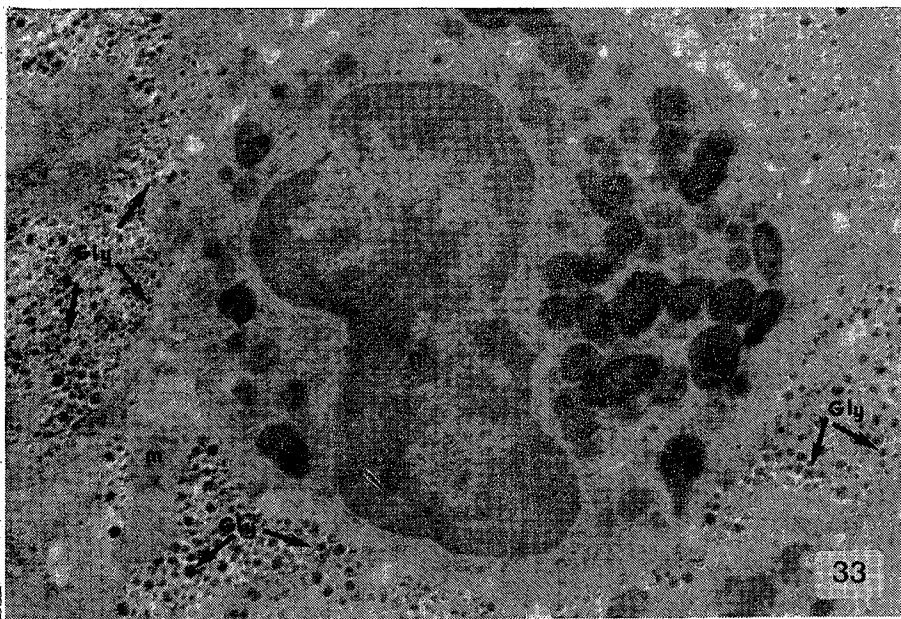
PLANCHE 15

LIPIDES ET GLYCOGENE HEPATIQUES
en microscopie électronique



Lapereau de 10 jours

X 9230



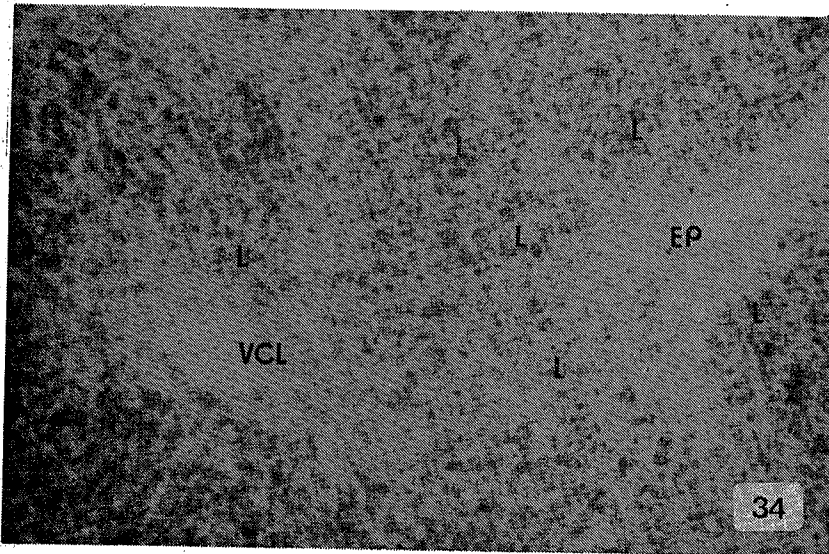
Lapereau de 10 jours

X 14378

Figures 32 - 33 : Les inclusions lipidiques et les rosettes de glycogène très répandues, occupent les mêmes compartiments intracytoplasmiques des hépatocytes. Une cellule hématopoïétique sépare des hépatocytes voisins. Notons la présence d'organites habituels dans les hépatocytes (mitochondries, réticulum endoplasmique granulaire).

PLANCHE 16

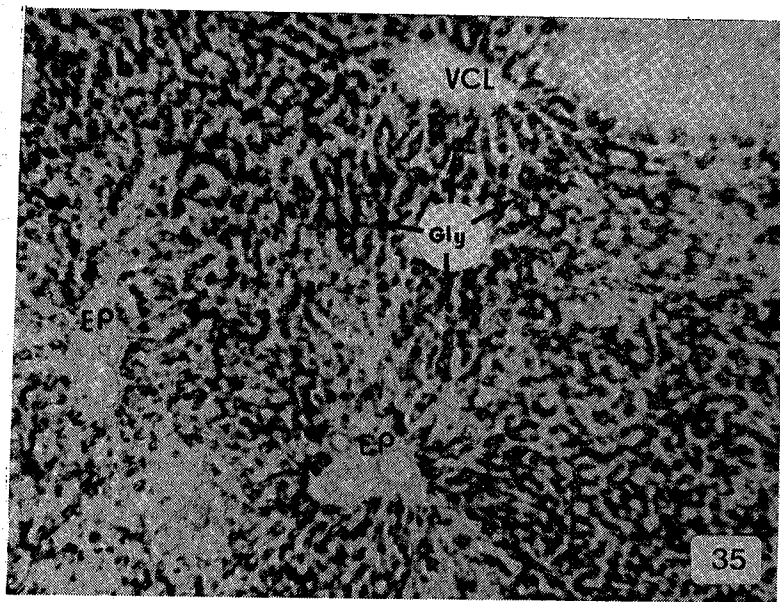
REPARTITION DES LIPIDES ET DU GLYCOGENE DANS LE LOBULE HEPATIQUE
en microscopie photonique



Lapereau de 20 jours

Lipides

X 28



Lapereau de 20 jours

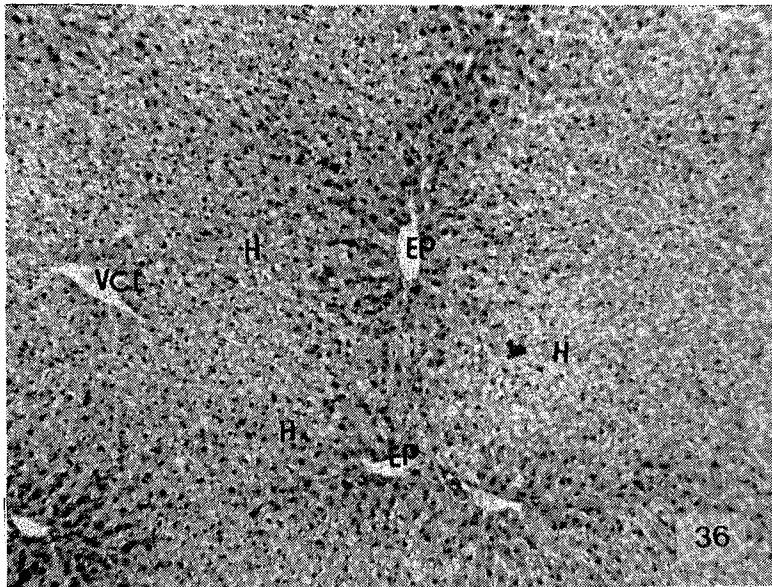
Glycogène

X 36

Figures 34 - 35 : Les inclusions lipidiques et le glycogène sont distribués dans les trois secteurs du lobule hépatique mais de façon plus importante dans la région périlobulaire.

PLANCHE 17

STRUCTURE GENERALE DU FOIE AU SEVRAGE



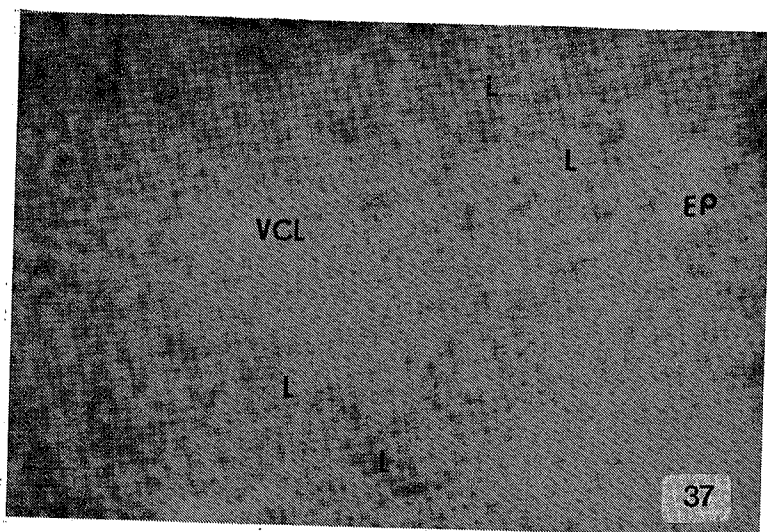
Lapereau de 28 jours

X 36

Figure 36 : Notons la disparition totale des cellules hématopoïétiques à ce stade de développement du lapereau (sevrage).

PLANCHE 18

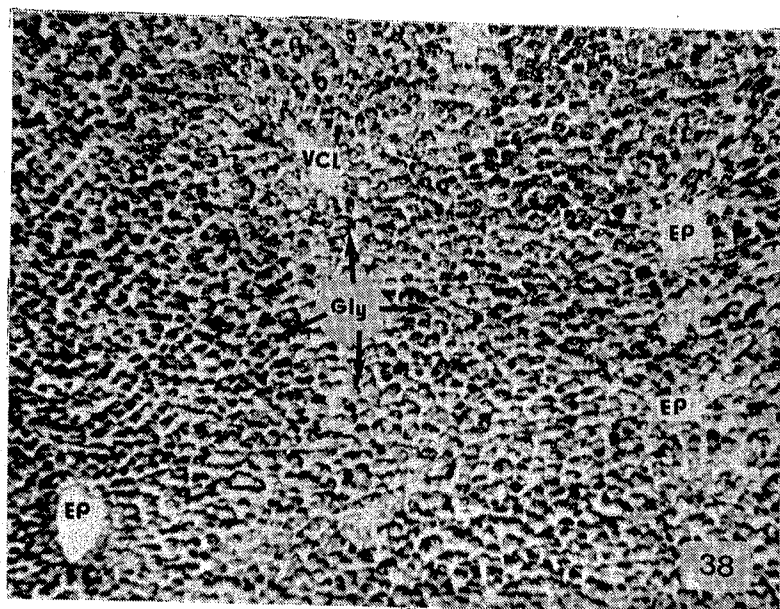
REPARTITION DES LIPIDES ET DU GLYCOGENE DANS LE LOBULE HEPATIQUE
en microscopie photonique



Lapereau de 28 jours
Jour du sevrage

Lipides

X 28



Lapereau de 28 jours

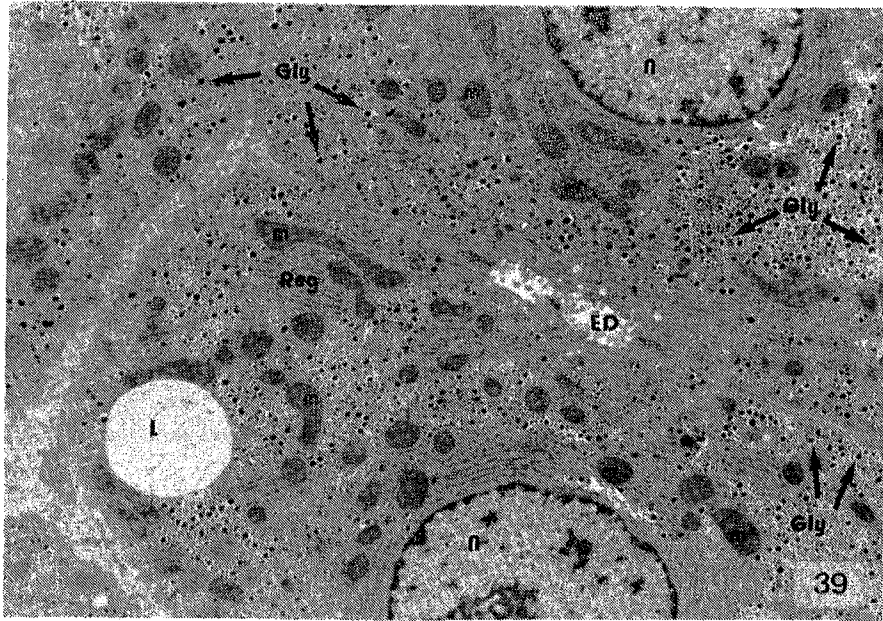
Glycogène

X 36

Figures 37 - 38 : Si le glycogène est distribué dans la totalité du lobule hépatique de façon homogène ; les lipides, pour leur part, n'occupent que les secteurs médio et périlobulaires ; ils sont absents dans le secteur centrolobulaire.

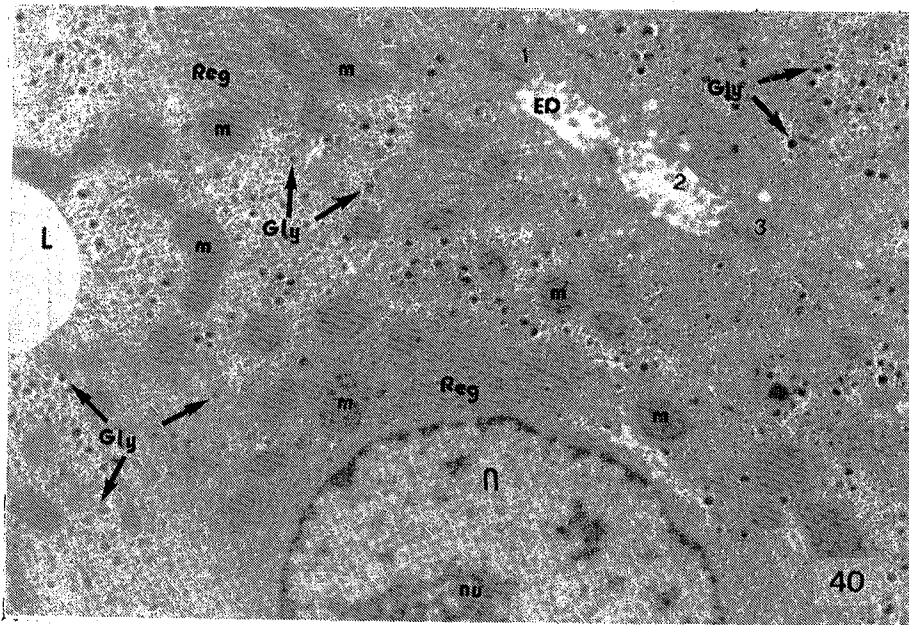
PLANCHE 19

LIPIDES ET GLYCOGENE HEPATIQUES
en microscopie électronique



Lapereau de 28 jours
Jour du sevrage

X 5642



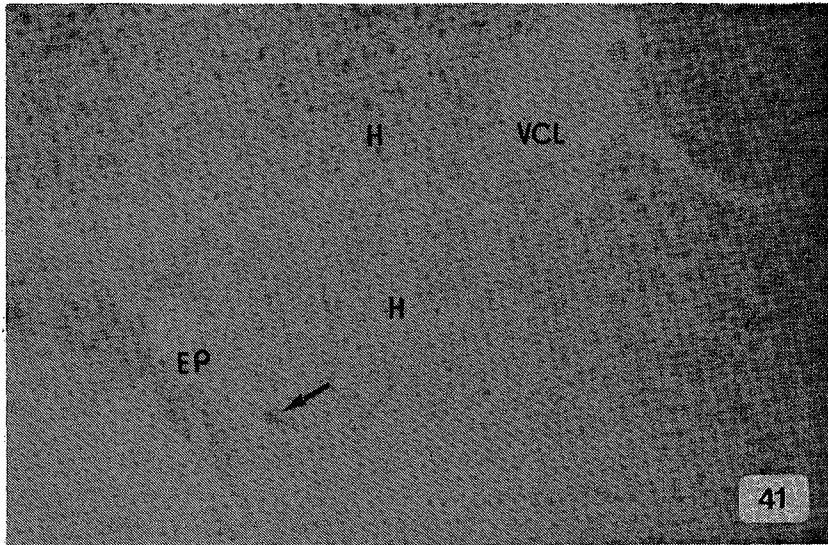
Lapereau de 28 jours

X 9230

Figures 39 - 40 : Les hépatocytes ne renferment que très peu d'inclusions lipidiques mais le glycogène y est bien représenté. Notons la disparition totale des cellules hématopoïétiques observées à la naissance. L'adhésivité des hépatocytes est renforcée par des systèmes de jonctions : desmosomes, "tight junction" (1), "gap junction" (3). Remarquons des sections transversales de microvillosités dans l'espace de DISSE (2), séparant des hépatocytes voisins.

PLANCHE 20

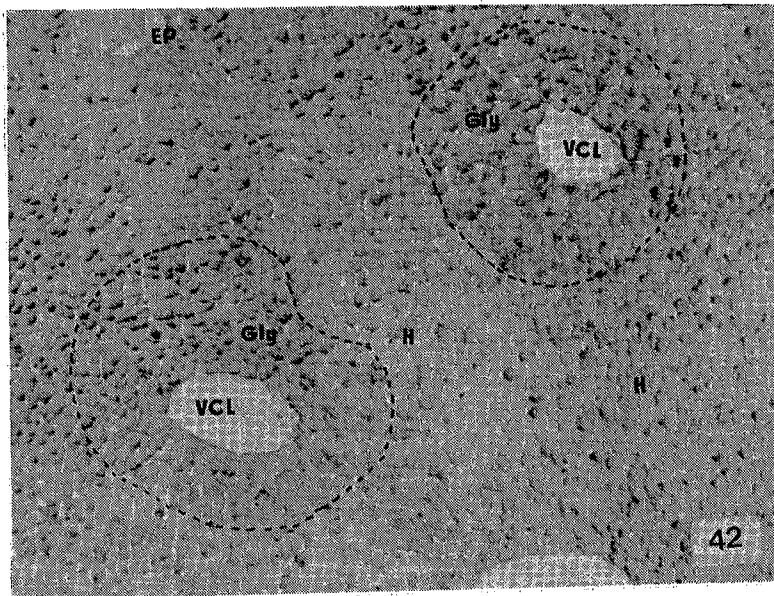
REPARTITION DES LIPIDES ET DU GLYCOGENE DANS LE LOBULE HEPATIQUE
en microscopie photonique



Lapereau de 38 jours

Lipides

X 28



Lapereau de 38 jours

Glycogène

X 71


Figures 41 - 42 : Notons la disparition presque totale des réserves lipidiques dans le foie sauf dans de très rares cellules (). Le glycogène quant à lui ne se rencontre qu'autour de la veine centrolobulaire ; les secteurs médio et périlobulaires en sont dépourvus.

PLANCHE 21

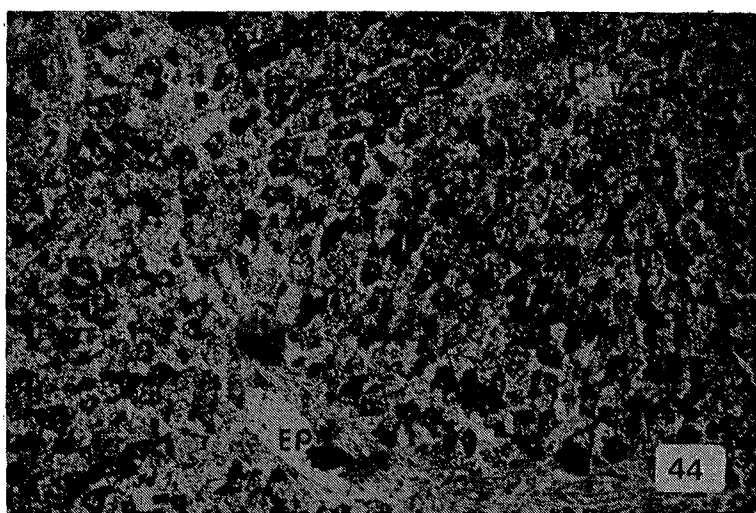
REPARTITION DES LIPIDES ET DU GLYCOGENE DANS LE LOBULE HEPATIQUE
en microscopie photonique



Lapin de 60 jours

Lipides

X 71



Lapin de 60 jours

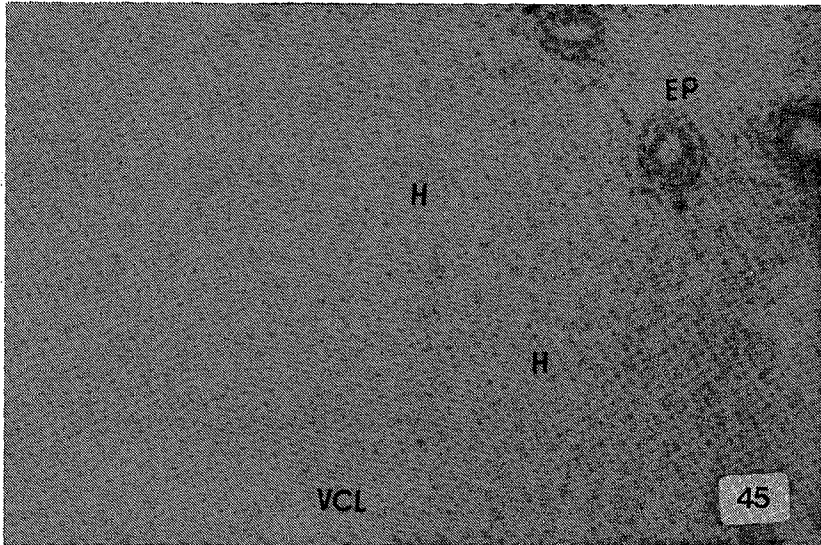
Glycogène

X 71

Figures 43 - 44 : Notons la disparition totale des lipides dans le foie du lapin de 60 jours. Le glycogène est présent et apparaît sous forme de granulations bien dispersées dans le lobule hépatique.

PLANCHE 22

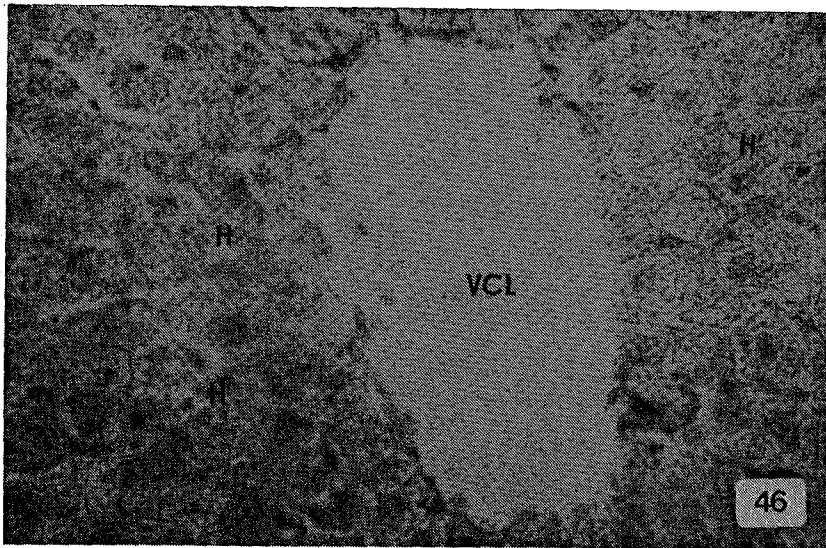
REPARTITION DES LIPIDES DANS LE LOBULE HEPATIQUE
en microscopie photonique



Lapin adulte

Lipides

X 28



Lapin adulte

Lipides

X 360

Figures 45 - 46 : Notons l'absence totale de toute trace d'inclusions lipidiques dans les hépatocytes du lapin adulte. A l'état adulte, les hépatocytes s'organisent en colonnes bien différenciées autour de la veine centrolobulaire.

II - ETUDE METABOLIQUE DE LA CROISSANCE DU LAPEREAU

A - CROISSANCE ET HEPATOCYTE

1 - Evolution pondérale (tableaux 31, 32 et XI)

Nous avons sur un millilitre de suspension d'hépatocytes correspondant à 10^6 cellules vivantes, et donc encombrée de débris plus ou moins structurés d'hépatocytes morts, évalué le poids sec total de ce matériel biologique (après déduction de la quantité de matière apportée par la solution physiologique), le poids sec des lipides et enfin les protéines (dont la quantité est, elle, corrigée du rapport cellules vivantes/cellules totales) correspondantes à 10^6 cellules vivantes.

Le tableau XI montre une augmentation du poids sec des hépatocytes après le sevrage du lapereau s'accompagnant d'une forte diminution des lipides totaux ce qui correspond bien à la disparition du foie gras observé à la naissance mis en évidence par les études précédentes.

Nous observons une augmentation de la quantité de protéines totales des hépatocytes du lapereau de 20 jours comparativement à la naissance ; à ces stades du développement, la quantité de protéines totales correspondante aux seules cellules vivantes est bien corrélée au poids sec et aux lipides totaux ce qui signifie que la préparation cellulaire est de qualité, il y a proportionnellement peu de cellules mortes.

Par contre, chez le lapin de 8 semaines et adulte, la quantité de protéines totales de 10^6 cellules vivantes est bien plus faible que le poids sec du milieu biologique ce qui signifie que la proportion de cellules mortes est plus ample.

Ces observations confirment d'une part la chute des lipides hépatiques déjà observée et d'autre part le développement de la cohésion cellulaire avec l'âge, ce qui nécessite un traitement de dissociation plus prolongé entraînant une lyse cellulaire plus importante, ce dont la différence, protéines totales de 10^6 cellules par rapport au poids sec, rend compte. Ce développement de la cohésion cellulaire que nous déduisons de ces analyses correspond à l'observation que nous avons précédemment décrite à partir de l'étude cytologique, les jonctions intercellulaires se développant après le sevrage.

2 - Lipogenèse de l'hépatocyte

- A la naissance : (tableaux 33, et résumés dans le tableau récapitulatif XII a et b et figure XVIII).

A la naissance, la synthèse "de novo" des acides gras est insignifiante quel que soit le substrat donneur de carbone, glucose, acétate ou propionate. En revanche l'hépatocyte du lapereau est capable d'utiliser le glucose comme donneur de carbone dans la

TABEAU XI - Evolution du poids sec et des lipides totaux de 1 ml de suspension d'hépatocytes contenant au moins 10^6 cellules vivantes. Evolution des protéines totales de 10^6 cellules vivantes du lapin nourri.

LAPINS AGE	Poids sec du milieu biologique de 1 ml de suspension cellulaire		Protéines totales de la suspen- sion cellulaire rapportée à 10^6 cellules vivantes
	Poids sec (mg)	Poids sec lipides totaux (mg)	Protéines totales (mg)
Jour 0 [6]	1,77 ± 0,07	1,33 ± 0,08	0,79 ± 0,02
Jour 20 [7]	1,82 ± 0,26	0,43* ± 0,07	1,32* ± 0,13
Jour 60 [6]	3,80* ± 0,40	0,50* ± 0,10	1,43* ± 0,13
Adultes [10]	3,02* ± 0,47	0,73* ± 0,10	0,84* ± 0,05

[] Nombre d'animaux

- * Valeurs significativement différentes des valeurs de "Jour 0" correspondantes au seuil de 0,05
- * Valeurs significativement différentes des valeurs de "Jour 20" correspondantes au seuil de 0,05
- * Valeurs significativement différentes des valeurs de "Jour 60" correspondantes au seuil de 0,05

Remarque : Les valeurs Poids sec et lipides totaux mesurent tout le matériel biologique présent dans la suspension c'est-à-dire hépatocytes vivants et débris d'hépatocytes morts. En effet à partir de la suspension d'hépatocytes une numération permet d'établir le rapport des cellules vivantes aux cellules mortes et la dilution conduit à une suspension qui contient 10^6 cellules vivantes par ml avec en outre toutes les cellules mortes et leurs débris. Les mesures en protéines totales sont corrigées et se rapportent aux seules cellules vivantes.

1 - Nous constatons l'augmentation du poids sec après le sevrage qui s'accompagne d'une forte diminution des lipides totaux ce qui correspond bien à la disparition du foie gras observée à la naissance.

2 - La quantité de protéines correspondante aux seules cellules vivantes est bien corrélée au poids sec et aux lipides totaux avant le sevrage ce qui signifie que la préparation cellulaire est de qualité, il y a proportionnellement peu de cellules mortes. Par contre après le sevrage, la quantité de protéines totales de 10^6 cellules est bien plus faible que le poids sec du milieu biologique ce qui signifie que la proportion des cellules mortes est plus ample. Tout d'abord ceci confirme et accentue la chute des lipides hépatiques, en outre ceci indique que les liaisons cellulaires s'accroissent avec l'âge et que le traitement de dissociation est plus traumatisant.

synthèse de "lipides totaux" donc dans la triglycérogénèse, le glucose étant alors la source d'alpha-glycérophosphate ; l'acétate et le propionate n'intervenant pas dans cette biosynthèse des triglycérides.

Les effets lipogéniques de l'insuline (1 mUI/ml) sont significatifs uniquement en présence du glucose marqué ; le pourcentage de stimulation de la triglycérogénèse est alors de 26 % bien que ces expériences aient été menées en phase diurne.

- Chez le lapereau de 20 jours (tableaux 34, XII a-b, figure XVIII).

Comme à la naissance nous remarquons une importante triglycérogénèse à partir du glucose qui reste donc le seul substrat donneur de carbone comparativement à l'acétate et au propionate.

Les effets lipogéniques de l'insuline ne sont significatifs que sur la biosynthèse des triglycérides à partir du glucose et le pourcentage de stimulation est de 27 % (toujours en phase diurne).

Après le sevrage, la seule lipogénèse quantitativement importante est celle obtenue à partir du glucose. Remarquons qu'alors l'insuline n'a plus d'effet lipogénique significatif. Or nous avons toujours travaillé en phase diurne. Ainsi avant le sevrage l'insuline est lipogénique en phase diurne, cette propriété disparaît avec l'âge et nous savons que chez l'adulte cette hormone est efficace en phase nocturne uniquement. Ces résultats laissent entendre que le cycle circadien des effets lipogéniques nocturnes de l'insuline ne s'installe qu'après la naissance au-delà de la troisième semaine.

B - CROISSANCE ET LIPOGENESE ET LIPOLYSE DE L'ADIPOCYTE

Remarque : l'étude de l'adipocyte chez le lapereau présente une difficulté inhérente au développement du tissu adipeux chez le jeune lapin ; en effet à la naissance, le tissu adipeux chez le lapereau est peu abondant et nous n'avons pas pu travailler exclusivement sur le tissu périrénal comme nous pouvons le faire à partir du 10ème jour. Ainsi chez le nouveau-né qui ne pèse que 56 grammes nous récupérons tout le tissu adipeux disponible, en particulier au niveau de la ceinture pelvienne ; ceci reste insuffisant et nous avons travaillé à partir du tissu adipeux récolté sur plusieurs nouveaux-nés.

- Croissance et lipogénèse de l'adipocyte (tableaux analytiques 35, 36, 37, 38, 39 et 19, résumés dans le tableau XIII et la figure XIX).

À la naissance, l'adipocyte présente une importante capacité lipogénique, il fabrique des acides gras à partir de l'acétate, ce sont ces acides gras que nous retrouvons quantitativement dans les lipides totaux. Le glucose n'intervient pas dans la synthèse "de novo" des acides gras, par contre il est très utilisé dans la triglycérogénèse (incorporation des carbones exclusivement dans les lipides totaux ce qui signifie que le glucose donne de l'alpha-glycérophosphate).

TABLEAU XII a - b - Variation de la lipogenèse spontanée d'hépatocytes isolés du lapin nourri de la naissance à l'âge adulte - Influence de l'insuline.

LAPINS		LIPIDES TOTAUX										ACIDES GRAS									
		Eau traitée 250 µCi		Glucose 0,5 µCi		Acétate 0,5 µCi		Propionate 0,5 µCi		Eau traitée 250 µCi		Glucose 0,5 µCi		Acétate 0,5 µCi		Propionate 0,5 µCi					
AGE		Témoins	Insuline 1 mU/ml	Témoins	Insuline 1 mU/ml	Témoins	Insuline 1 mU/ml	Témoins	Insuline 1 mU/ml	Témoins	Insuline 1 mU/ml	Témoins	Insuline 1 mU/ml	Témoins	Insuline 1 mU/ml	Témoins	Insuline 1 mU/ml				
JOUR 0 [6]			586 ± 61	741 ± 44	33 ± 3	32 ± 3	67 ± 7	50 ± 8			16 ± 2	21 ± 3	11 ± 1	11 ± 1	4 ± 1	5 ± 2					
JOUR 20 [7]			1283 ± 133	1554 ± 116	99 ± 57	125 ± 97	16 ± 7				25 ± 3	25 ± 2	10 ± 2	25 ± 11							
JOUR 60 [6]		250 ± 103	575 ± 78	608 ± 89	44 ± 11	49 ± 14	30 ± 12	31 ± 9	71 ± 17	90 ± 16	22 ± 6	31 ± 4	27 ± 6	22 ± 6	17 ± 4	19 ± 8					
Adultes [5]		71 ± 23	884 ± 199	639 ± 186	22 ± 5	46 ± 1	36 ± 8	37 ± 8	90 ± 25	94 ± 18	14 ± 6	19 ± 6	8 ± 3	13 ± 4	10 ± 1	13 ± 3					
b LIPOGENESE en cpm p. mg de protéines totales p. 180 minutes																					
JOUR 0 [6]			747 ± 85	943 ± 67	42 ± 4	41 ± 4	85 ± 9	72 ± 10			20 ± 3	27 ± 4	13 ± 1	13 ± 1	5 ± 1	7 ± 2					
JOUR 20 [7]			987 ± 97	1255 ± 174	97 ± 56	105 ± 80	9 ± 4	10 ± 4			21 ± 4	20 ± 3	14 ± 6	33 ± 14							
JOUR 60 [6]		190 ± 99	421 ± 79	472 ± 110	33 ± 9	38 ± 12	23 ± 11	24 ± 9	48 ± 13	63 ± 18	17 ± 6	22 ± 4	21 ± 6	19 ± 6	15 ± 3	17 ± 5					
Adultes [5]		115 ± 54	856 ± 108	625 ± 165	32 ± 4	72 ± 13	52 ± 3	58 ± 14	90 ± 25	94 ± 18	23 ± 13	30 ± 14	11 ± 3	19 ± 3	13 ± 3	17 ± 1					

[] Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0,05

Seuls les carbones du glucose sont utilisés dans la trilogénogénèse de l'hépatocyte ; l'acétate et le propionate n'interviennent pas dans cette voie. Nous constatons une absence de synthèse "de novo" d'acides gras quel que soit le substrat donneur de carbone. Après le sevrage, la seule lipogenèse quantitativement importante est celle obtenue à partir du glucose comme chez le lapereau à la naissance et au sevrage. Notons l'effet lipogénique de l'insuline même en phase diurne sur la biosynthèse de "Lipides totaux à la naissance et 20 jours après" ; cette action lipogénique de l'hormone disparaît après le sevrage (en phase diurne).

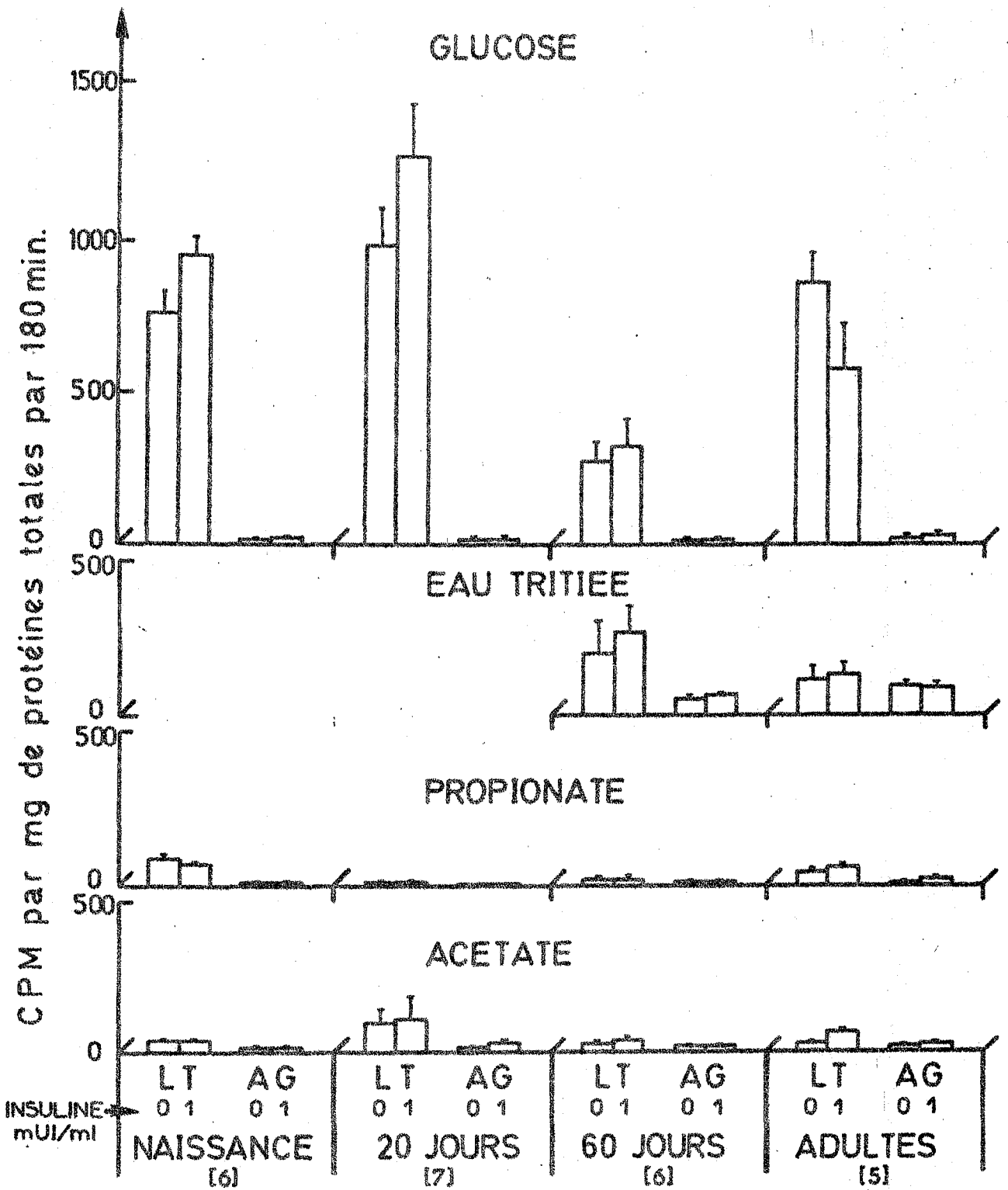


Figure XVIII - Activité lipogénique des hépatocytes isolés au cours de la croissance de lapins nourris - Effets de l'insuline.

[] Nombre d'animaux.

L'insuline a un effet stimulant sur ces lipogénèses et le pourcentage de stimulation est de 34 % en présence d'acétate. Ce qui est remarquable c'est que ces propriétés de l'adipocyte disparaissent pendant toute la période de l'allaitement jusqu'au sevrage. Ainsi dès le 10ème jour, nous constatons que l'adipocyte ne fait plus de synthèses d'acides gras comme le montre l'absence d'incorporation des carbones de l'acétate (tableau XIII) ; l'insuline a perdu alors sa propriété lipogénique et seul le glucose est encore un donneur de carbone mais exclusivement dans la triglycérogénèse. Ce phénomène de silence métabolique de l'adipocyte en lipogénèse dure jusqu'au sevrage. Une semaine environ après le sevrage, l'adipocyte présente à nouveau une très forte activité lipogénique (accroissement de + 122 %) tout à fait comparable à celle observée à la naissance et ceci persiste à l'âge adulte. Ainsi l'acétate permet la biosynthèse des acides gras, le glucose est utilisé pour la triglycérogénèse et l'insuline est redevenue lipogénique.

Le pourcentage de stimulation de la lipogénèse spontanée par l'insuline est calculé selon le rapport :

$$\frac{\text{Lipogénèse stimulée} - \text{lipogénèse témoin}}{\text{lipogénèse témoin}} \times 100$$

LAPINS AGE	GLUCOSE		ACETATE	
	Lipides totaux	Acides gras	Lipides totaux	Acides gras
NAISSANCE	+ 14 %		+ 34 %	+ 31 %
10 Jours	+ 24 %	+ 86 %	N.S.	N.S.
20 Jours	+ 15 %	N.S.	N.S.	N.S.
28 Jours	N.S.	N.S.	N.S.	
38 Jours	+ 20 %	+ 106 %	+ 50 %	+ 62 %
60 Jours	+ 55 %	N.S.	+ 45 %	+ 30 %

N.S. Valeurs non significatives par rapport à la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0,05

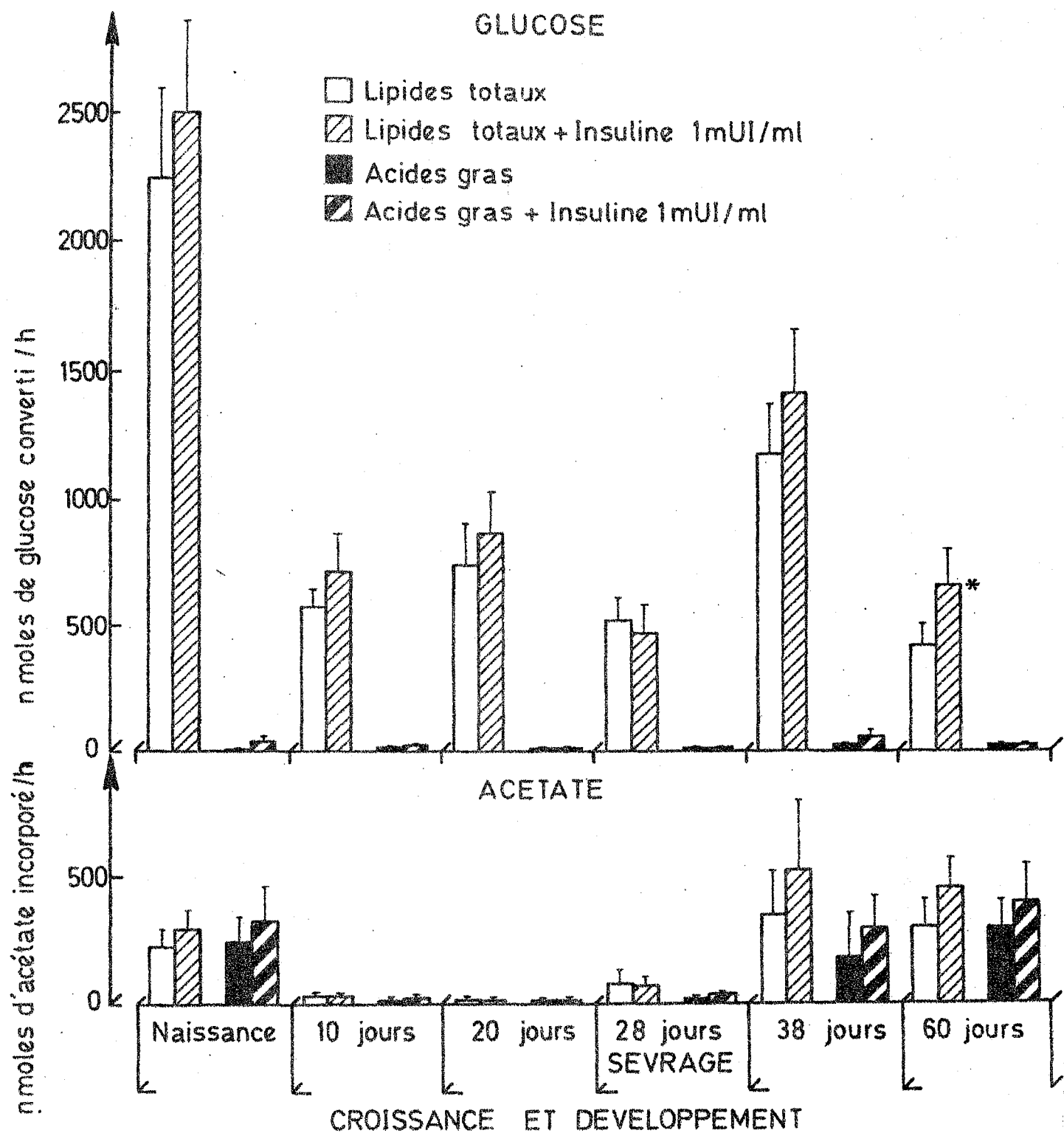


Figure XIX - Activité lipogénique de l'adipocyte isolé au cours de la croissance de lapins nourris - Effets de l'insuline.

- Croissance et lipolyse de l'adipocyte (tableaux analytiques 40, 41, 42, 43, 44 et 22, résumés dans le tableau XIV et la figure XX).

La lipolyse basale est maximale à la naissance, elle diminue pendant l'allaitement et au sevrage elle atteint le niveau qu'elle conservera chez l'adulte et qui est trois fois plus faible qu'à la naissance.

A la naissance, la réactivité lipolytique au synacthène n'apparaît qu'à la dose de 10^{-8} M et le pourcentage de stimulation est de + 335 %. Cette résistance aux effets lipolytiques du synacthène disparaît dès l'âge de 10 jours où la sensibilité de l'adipocyte apparaît dès la dose de 10^{-9} M et correspond aux propriétés lipolytiques de cet agent que nous retrouverons jusqu'à l'âge adulte (tableau XV).

L'isoprotérénol n'exerce ses effets lipolytiques qu'à la forte dose de 10^{-6} M, la dose de 10^{-8} M est inefficace quel que soit l'âge du lapereau et au sevrage, même la dose de 10^{-6} M est inefficace. Comme pour le synacthène, nous observons un maximum de stimulation de la lipolyse par l'isoprotérénol sur l'adipocyte des lapereaux de 38 jours soit une semaine après le sevrage (tableau XVI). Notons en outre que chez le lapin de 60 jours, il y a une diminution semblable des effets lipolytiques de l'isoprotérénol.

II - DISCUSSION

Selon LEBAS (1969 a) la disponibilité en aliments est sans doute un des facteurs qui agit le plus directement sur la vitesse de croissance des lapereaux ; ainsi le lapereau est capable d'ingérer un poids de lait égal à 15 % de son propre poids en quelques minutes au cours de la première semaine postnatale et l'ingestion augmente jusqu'à la troisième semaine. En outre, pendant l'allaitement le lait maternel ne présente pas une composition constante ; dès que les apports nutritionnels placentaires cessent (à la naissance), le nouveau-né reçoit un lait ou colostrum riche en lipides et relativement pauvre en glucides (LEBAS, 1971 b ; LEBAS et alii, 1971 a ; COWIE, 1969 ; PERRET et alii, 1977 ; LUCKEY et alii, 1954 ; GIRARD et alii, 1980). Au fur et à mesure que la lactation se poursuit, il y a une diminution quantitative de la tétée qui est accompagnée d'une modification qualitative et quantitative de la composition du lait, ainsi il y a un enrichissement du lait en lipides et un appauvrissement en lactose ; au cours de cette modification de la composition du lait maternel, le lapereau complète sa ration alimentaire par une alimentation solide. Par ailleurs, l'ingestion de lait maternel est nécessaire au développement de la microflore intestinale chez le lapereau (FONTY et alii, 1979) elle devient importante dès la première semaine (GOUET et alii, 1979) et elle participera au-delà du sevrage

TABLEAU XV - Lipolyse synacthène-dépendante de cellules adipeuses isolées de lapereaux de la naissance à l'âge de 60 jours

LAPINS - AGE	CONCENTRATION DU SYNACTHENE, M		
	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
Naissance [18]	Accroissement non significatif	+ 336	+ 361
10 jours [4]	+ 720	+ 785	+ 735
20 jours [8]	+ 1500	+ 1583	+ 1687
28 jours [5]	+ 1132	+ 1616	+ 2214
38 jours [6]	+ 2014	+ 2550	+ 2214
60 jours [5]	+ 984	+ 1428	+ 1300

[] Nombre d'animaux

La plénitude des effets lipolytiques du synacthène n'apparaît qu'au 10ème jour ; nous observons donc une certaine résistance à la lipolyse chez l'adipocyte du nouveau-né.

A l'âge de 38 jours soit une semaine environ après le sevrage nous observons une efficacité lipolytique maximale pour le synacthène (ACTH mimétique)

L'accroissement de la lipolyse en pourcentage est exprimé par :

$$\frac{\text{Lipolyse stimulée} - \text{Lipolyse basale}}{\text{Lipolyse basale}} \times 100$$

Lipolyse basale

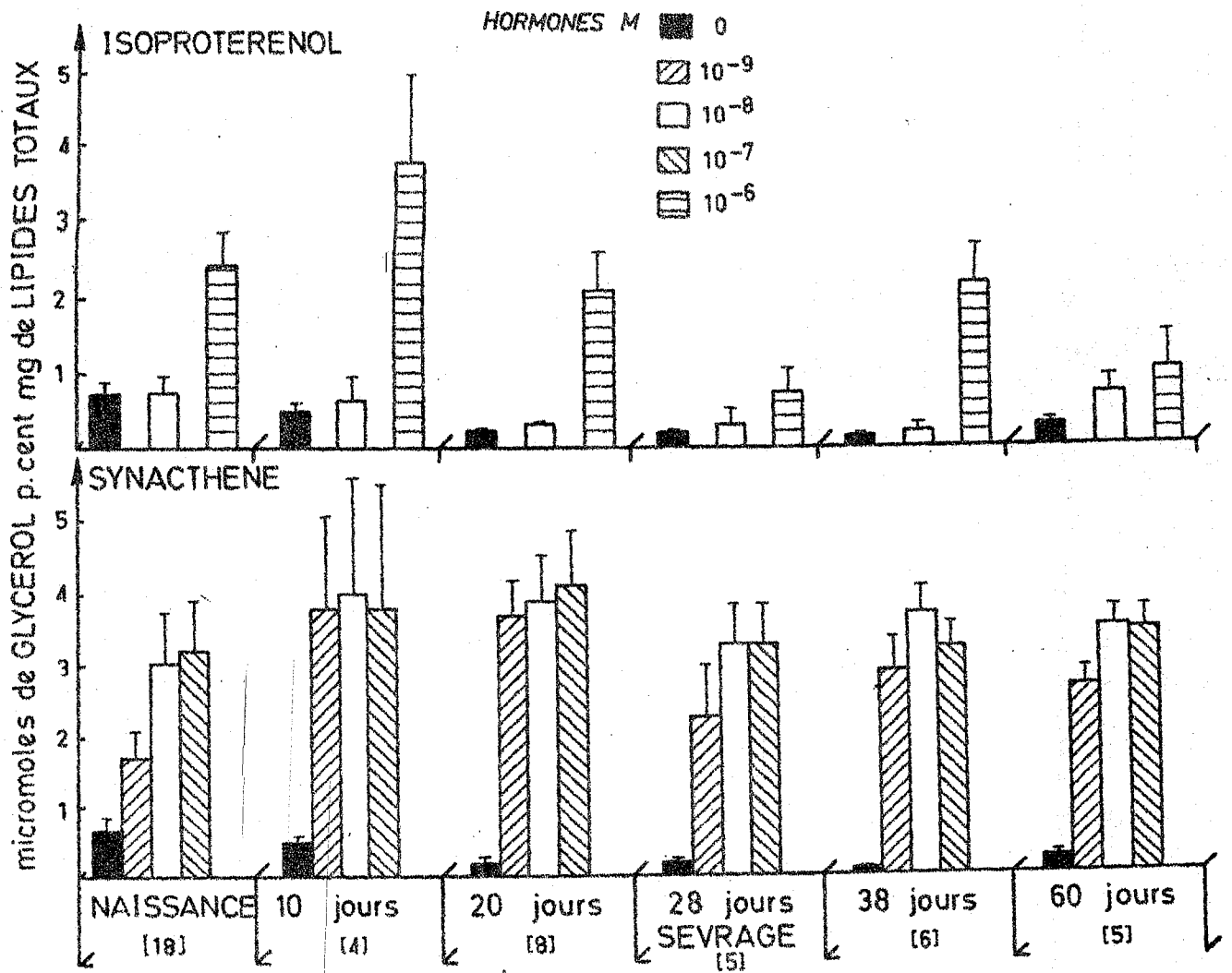


Figure XX - Activités lipolytiques spontanée et induite des adipocytes isolés au cours de la croissance de lapins nourris.

[] Nombre d'animaux.

TABEAU XIV - Etude comparée de la lipolyse spontanée et induite des adipocytes isolés du tissu adipeux de lapin au cours de la croissance et du développement (de la naissance à 60 jours).

Micromoles de glycérol p. cent mg de lipides totaux							
LAPINS - AGE	Témoins 0	Synacthène M			Témoins 0	Isoprotérénol M	
		10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷		10 ⁻⁸	10 ⁻⁶
JOUR 0 [8]	0,70 ± 0,16	1,69 ± 0,36	3,05 ± 0,64	3,23 ± 0,70	0,70 ± 0,16	0,75 ± 0,16	2,43 ± 0,42
JOUR 10 [4]	■ 0 0,46 ± 0,14	■ 0 3,77* ± 1,51	■ 0 4,07* ± 1,57	■ 0 3,84* ± 1,67	■ 0 0,46 ± 0,14	■ 0 0,64 ± 0,25	■ 0 3,82* ± 1,18
JOUR 20 [8]	■ 0 0,23 ± 0,05	■ 20 3,68* ± 0,53	■ 20 3,87 ± 0,67	■ 20 4,11* ± 0,73	■ 0 0,23 ± 0,05	■ 0 0,28 ± 0,01	■ 0 2,10* ± 0,51
JOUR 28 [5]	■ 0 0,19 ± 0,04	■ 20 2,34* ± 0,69	■ 20 3,26* ± 0,55	■ 20 3,26* ± 0,61	■ 0 0,19 ± 0,04	■ 0-20 0,33 ± 0,16	■ 0-10-20 0,72 ± 0,29
SEVRAGE							
JOUR 38 [6]	■ 0-10 0,14 ± 0,02	■ 0-20 2,96* ± 0,41	■ 20 3,71* ± 0,43	■ 20 3,24* ± 0,33	■ 0 0,14 ± 0,02	■ 0 0,23 ± 0,07	■ 28 2,18* ± 0,51
JOUR 60 [5]	■ 0-38 0,25 ± 0,04	■ 0-38 2,71* ± 0,24	■ 0-38 3,52* ± 0,26	■ 0-38 3,50* ± 0,31	■ 0-38 0,25 ± 0,04	■ 0-38 0,64 ± 0,26	■ 0-10-20 1,05* ± 0,40

[] Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0,05

■ 0 Valeurs significativement différentes de la valeur "jour 0" correspondante au seuil de 0,05

■ 10 " " " " " " " " " " " " " " " "

■ 20 " " " " " " " " " " " " " " " "

■ 28 " " " " " " " " " " " " " " " "

■ 38 " " " " " " " " " " " " " " " "

La lipolyse basale est maximale à la naissance ; elle diminue pendant l'allaitement jusqu'au sevrage où elle atteint un niveau qu'elle conserve jusqu'à l'âge adulte. Nous notons une résistance aux effets lipolytiques du synacthène à la naissance, celle-ci disparaît dès le 10ème jour. L'isoprotérénol n'est efficace qu'à la dose de 10⁻⁶ M.

TABLEAU XVI - Lipolyse Isoprotérénol-dépendante de cellules adipeuses isolées de lapereaux de la naissance à l'âge de 60 jours.

LAPINS - AGE	CONCENTRATIONS DE L'ISOPROTÉRENOL M	
	10^{-8}	10^{-6}
Naissance [18]	N.S.	+ 247
10 Jours [4]	N.S.	+ 730
20 Jours [8]	N.S.	+ 813
28 Jours [5]	N.S.	N.S.
38 Jours [6]	N.S.	+ 1457
60 Jours [5]	N.S.	+ 320

[] Nombre d'animaux

La stimulation n'est efficace qu'à la dose de 10^{-6} M

A 38 jours, comme avec le synacthène, la réactivité lipolytique à l'IPR de l'adipocyte est maximale

Le pourcentage de stimulation :

$$\frac{\text{Lipolyse stimulée} - \text{lipolyse basale}}{\text{Lipolyse basale}} \times 100$$

à la production des coecotrophes qui seront alors ingérées par l'animal pour compléter sa nourriture solide.

C'est sans doute cette variation quantitative et qualitative de la prise alimentaire (lait et aliments) du lapereau qui agirait sur la vitesse de sa croissance et de son développement. En effet, le lait reçu par le lapereau joue un rôle prépondérant dans la croissance avant le sevrage (COWIE, 1969 ; LEBAS, 1969 a).

A - DE LA CROISSANCE PONDERALE

Les deux points d'inflexion de la courbe de croissance (entre le 10ème et 20ème jour et entre le 28ème et le 38ème jour) que nous observons sur le lapereau "Solam Solaf" se retrouvent chez le lapereau "Fauve de Bourgogne" (LEBAS, 1969 a) et le lapereau "Bleu de Vienne" (VENGE, 1963 a). En revanche, ZARROW et alii (1965) enregistrent un ralentissement de la croissance relative 9 à 10 jours après la mise bas. Une meilleure précision quant à la date de ces inflexions semblerait possible si on augmente la fréquence des contrôles de poids ; si SANTORO (1967) et LEBAS (1969 a) font une pesée par semaine, nous, une tous les 10 jours et c'est une fois par jour pour ZARROW et alii (1965). La meilleure précision serait théoriquement donnée dans ce dernier cas mais ces auteurs ont arrêté leur étude au bout de 30 jours et le deuxième point d'inflexion ne peut alors être révélé. Remarquons que la manipulation quotidienne des lapereaux constitue un stress dont le ralentissement sur la croissance peut ne pas être négligeable.

Dans une étude sur la croissance du porcelet de race Pietrain, AUMAITRE et alii (1966) enregistrent une courbe de croissance avec aussi deux points d'inflexion et alors que pour la race Large White il n'y a qu'une seule inflexion.

Pour le lapereau "Solam Solaf" nous notons une première accélération la croissance à partir du 20ème jour, alors que l'animal consomme déjà une alimentation mixte (lait maternel et aliment solide); cette accélération fait place à un ralentissement de la croissance dans la semaine qui suit le sevrage.

Pour tenter d'expliquer ce ralentissement de la croissance on pourrait évoquer soit un éventuel stress de l'animal provoqué par le sevrage, soit l'absence de lait maternel riche en lipides sachant qu'au cours de cette période le jeune lapereau dispose d'une alimentation pauvre en matières grasses (2 %). Après adaptation (une dizaine de jours environ) à ce nouveau régime alimentaire, le lapereau montre une deuxième accélération de la vitesse de croissance (après le 38ème jour).

En conclusion de cette étude de la croissance pondérale des lapereaux, les points importants à retenir sont les suivants :

- la vitesse de croissance des lapereaux "Solam Solaf" marque deux temps d'accélération, l'un au passage à l'alimentation mixte (vers le 20ème jour) et le deuxième après la période d'adapta-

tion à l'alimentation solide (vers le 38ème jour). Globalement, au cours de l'allaitement, le lapereau "Solam Solaf" multiplie son poids vif de naissance au sevrage soit en 28 jours par 13 alors que ce facteur est de 20 chez le "Fauve de Bourgogne" (LEBAS, 1969 a).

- Par ailleurs la croissance pondérale en hiver est comparable à celle de l'été.

B - DES MODIFICATIONS QUANTITATIVES AU NIVEAU DU FOIE ET DU PLASMA LORS DE LA CROISSANCE.

Dès la naissance, nous notons chez le lapereau une excellente homéostasie comme l'indique la constance du milieu intérieur ou plasmatique alors que nous observons chez cet animal d'amples variations quantitatives et qualitatives au niveau du métabolisme glucido-lipidique du foie et de l'adipocyte qui constituent les réservoirs labiles des substrats énergétiques.

En effet, HUDSON et alii en 1975 ont montré qu'à la naissance, le lapereau possède d'importantes réserves lipidiques, environ 6 % de son poids corporel, se répartissant entre le foie et le tissu adipeux. Nous rapportons chez le lapereau à la naissance, une surcharge lipidique du foie caractérisée par un taux particulièrement élevé en acides gras : il s'agit d'un foie gras à triglycérides. Nos résultats sont en accord avec les travaux de GIRARD et alii (1979) selon lesquels les acides gras du foetus de lapin sont peu oxydés et sont stockés sous forme de triglycérides dans le foie et le tissu adipeux. En revanche, le foie de rat, nouveau-né, ne contient pas ou peu de lipides et le tissu adipeux blanc n'existe pas (HAHN et NOVAK, 1975). Chez le poussin en éclosion, BARRE (1982) a observé un foie gras à cholestérol. Un foie gras expérimental à cholestérol peut être observé chez des lapins soumis à un régime riche en cholestérol (DUFF dès 1936 et par MARQUIE et AGID en 1968). De même chez le rat, CLEMENT et alii (1952), après administration orale de cholestérol à 5 % pendant un an, décrivent ce même type de foie gras à cholestérol.

Pendant l'allaitement le lapereau reçoit du lait maternel de composition variable, très riche en lipides lors de la phase colostrale ; cet apport lipidique diminue dans les trois semaines suivantes (COATES et alii, 1964 ; COWIE, 1969 ; LEBAS, 1971) puis augmente lors de la quatrième semaine du développement et ce parallèlement à une réduction de l'apport lacté. Au cours de cette période de développement, nous notons chez le lapereau une chute considérable de la surcharge lipidique hépatique surtout dans les dix jours qui suivent la naissance, ces données sont en accord avec les observations de DUEE et alii (1985). Nos résultats nous amènent alors à faire une corrélation entre le niveau de la surcharge graisseuse du foie et l'apport lipidique nutritionnel variable lors de la lactation. Ainsi dans la période postnatale, le foie s'appauvrit en lipides alors que le lait maternel est

pauvre en graisse, en revanche lors de l'enrichissement du lait maternel en lipides vers la troisième semaine nous observons une élévation du taux des acides gras du foie ; en outre, nous notons que ces surcharges lipidiques hépatiques disparaissent lorsque le lapin ne reçoit que de l'aliment solide (2 % de matières grasses) après le sevrage.

La chute de la surcharge en lipides du foie s'observe aussi au niveau du cholestérol ; c'est ainsi que le taux de ce constituant est plus élevé pendant l'allaitement du lapereau. Nos résultats sont conformes à ceux de la littérature, même chez des espèces différentes. En effet, **BARRE (1982)** décrit chez le poussin, une régression progressive de la teneur en cholestérol total hépatique pendant les 15 premiers jours après l'éclosion, le taux se stabilise alors jusqu'au trentième jour où il devient comparable à celui de l'animal adulte. Chez le lapereau le taux de cholestérol hépatique diminue jusqu'au sevrage et atteint alors la valeur du lapin adulte.

Le glycogène hépatique, quant à lui, est abondant dès la naissance, mais ne présente pas de variations quantitatives notables au cours de la croissance du lapereau dans nos conditions expérimentales. Signalons toutefois les travaux de **SHELLEY (1961)**, chez le lapereau, qui ont montré que les réserves hépatiques de glycogène sont épuisées au bout de 10 à 12 heures après la naissance.

Chez le rat, **BALLARD et OLIVIER (1964 b)** ont observé sur des coupes de foie des quantités de glycogène beaucoup plus importantes chez l'animal adulte comparativement aux coupes de foie de fœtus ; par ailleurs, **WALKER (1965)** démontre que l'activité de la glucokinase n'apparaît dans le foie de rat qu'au bout de deux semaines après la naissance. Dans notre cas, l'approche morphologique témoigne au contraire d'une intense glycogénèse à la naissance qui diminue avec l'âge.

La croissance globale du lapereau est insensible au cycle des saisons, il n'y a pas non plus de variations notables du niveau des réserves énergétiques du foie, ni du taux des constituants plasmatiques corrélativement au cycle annuel ; par ailleurs nous observons une constance dans la composition en eau des hépatocytes pendant toute la croissance, de la naissance à l'âge adulte. Toutefois des rythmes circadiens chez le lapereau, surtout de la prise alimentaire, ont été décrits par de nombreux auteurs (**PRUD'HON et alii, 1975 a**) et ces rythmes nycthémeraux s'accroissent avec l'âge du lapereau (**REYNE et alii, 1977 ; JOLIVET et alii, 1983**).

C - DES MODIFICATIONS METABOLIQUES AU NIVEAU DE L'HEPATO-CYTE ET DE L'ADIPOCYTE AU COURS DE LA CROISSANCE

L'étude du métabolisme de l'hépatocyte et de l'adipocyte du lapereau au cours de la croissance met en évidence un équilibre entre le foie et le tissu adipeux. En effet, à la naissance, nous observons au niveau de l'hépatocyte une importante triglycérogenèse à partir du glucose comme donneur de carbones alors que la synthèse d'acides gras "de novo" est insignifiante quel que soit le précurseur utilisé.

Pendant toute la période d'allaitement et au-delà du sevrage, l'hépatocyte présente les mêmes particularités métaboliques à savoir triglycérogenèse et stockage lipidique sans synthèse "de novo" d'acides gras. En revanche, l'adipocyte à la naissance montre une importante synthèse d'acides gras à partir de l'acétate et une triglycérogenèse élevée à partir du glucose. Pendant la période d'allaitement, l'adipocyte va perdre cette capacité de synthèse des acides gras comme le montre l'absence d'incorporation des carbones de l'acétate. Enfin après le sevrage, l'adipocyte récupère sa capacité de synthèse d'acides gras à partir de l'acétate de façon comparable à celle enregistrée à la naissance. Par ailleurs, nous observons que l'effet lipogénique de l'insuline à la naissance, tant au niveau de la triglycérogenèse que de la biosynthèse des acides gras a lieu en phase diurne et au cours de l'allaitement lorsque l'adipocyte perd, en période d'éclaircissement, sa capacité lipogénique, l'insuline perd aussi son action stimulante sur ce même processus en phase diurne.

Rappelons que chez le lapin de 60 jours l'insuline n'est lipogénique qu'en période nocturne. Il est évidemment nécessaire que nous complétions notre travail par l'étude du cycle circadien de la lipogénèse et des effets de l'insuline au cours de la croissance du lapereau.

Ainsi, au cours de la croissance du lapereau, nous observons un équilibre entre le foie et le tissu adipeux. A la naissance, l'adipocyte a une activité lipogénique intense alors qu'au niveau du foie nous observons une accumulation des lipides et de glycogène. Pendant l'allaitement, l'adipocyte et l'hépatocyte n'ont pas d'activité lipogénique, c'est le lait maternel riche en graisse qui assure la couverture du besoin lipidique du lapereau. Par ailleurs, il semble que le cycle circadien des effets lipogéniques de l'insuline avec une lipogénèse maximale en période nocturne chez l'adulte, s'installe au cours de l'allaitement, en effet, si à la naissance, l'insuline montre une action lipogénique en phase diurne sur l'adipocyte, cette propriété disparaît rapidement. Ce résultat s'accorde avec les travaux de REYNE et alii (1977) et JOLIVET et alii (1983) selon lesquels les rythmes circadiens de la prise alimentaire du lapereau s'installent et s'accroissent avec l'âge. Certains auteurs laissent entendre qu'au cours du développement le site anatomique de la synthèse des acides gras pourrait changer. En effet, VEZINHET (1976) constate "in vivo" chez le lapin de 35 jours une lipogénèse équivalente tant au niveau du foie que du tissu

adipeux, mais chez le lapin de 6 mois, il décrit une prépondérance hépatique quant à l'activité lipogénique. Pour notre part, nous observons que quel que soit le stade de développement du lapereau, le foie reste l'organe de stockage des lipides pendant que les activités de synthèse de l'adipocyte varient, ainsi elles sont très élevées à la naissance et après le sevrage et réduites pendant l'allaitement. Nos résultats s'opposent en partie avec ceux de LEUNG et BAUMAN (1975) qui rapportent que pendant la croissance du lapereau, le rôle du foie dans la lipogénèse dominerait celui du tissu adipeux mais, qui comme nous, observent qu'à l'état adulte, le rôle lipogénique du tissu adipeux devient dominant. En revanche, chez l'homme (SHRAGO et alii, 1971) et chez les oiseaux (O'HEA et LEVEILLE, 1969) le foie réaliserait la quasi totalité de la fonction lipogénique et le rôle du tissu adipeux se limitant au stockage des acides gras préformés.

Chez le lapin de 60 jours (chapitre II) et chez l'animal adulte (ALAOUI, 1980 et CATANZANO, 1984) l'aptitude de la cellule adipeuse à élaborer des acides gras varie aussi avec la saison. En outre, dans le chapitre II, nous avons aussi rapporté des variations circadiennes des activités lipogéniques spontanée et induite par l'insuline de l'adipocyte et de l'hépatocyte du lapin de 2 mois.

Cycles circadiens et effets métaboliques de l'insuline.

Les effets lipogéniques de l'insuline au niveau de l'adipocyte sont un sujet de controverse dans la littérature. Il semblerait que cette propriété de l'insuline varie selon l'espèce animale. Ainsi l'insuline faciliterait la pénétration du glucose dans l'adipocyte de certains mammifères (WIERINGA, 1978 ; TROSPER et LEVY, 1977) régulerait l'activité d'enzymes intervenant dans la synthèse des triglycérides (KHOO et STEINBERG, 1974) ou des acides gras (SCHOTZ et alii, 1971 ; VOLPE et VAGELAS, 1974), n'aurait pas d'effets sur la lipogénèse de l'adipocyte du blaireau (SZAS, 1982), verrait ses propriétés lipogéniques au sein d'une même espèce varier en fonction de l'âge, notamment chez les ruminants (MANNIS et alii, 1967 ; HORINO et alii, 1968 ; SCOTT, 1971 ; HALESTRAP et DENTON, 1974 ; VEZINHET, 1976) ; il en serait ainsi chez le lapin puisque, à la naissance nous observons des propriétés lipogéniques importantes qui disparaissent chez l'adulte. Or nous pensons que ces contradictions sont liées aux conditions expérimentales. En effet si chez le lapereau à la naissance l'insuline est lipogénique, il en est de même chez l'adulte, sous réserve d'être alors en phase nocturne. Il est fort probable que si l'on tient compte de la composante temporelle, l'insuline est lipogénique dans toutes les espèces animales mais selon l'organisation temporelle de l'espèce, cette propriété se manifestera de façon variable au cours du nyctémère, en outre la composante circadienne peut n'être pas acquise dès la naissance, mais se développer au cours de la croissance. Ainsi la prise en compte de la notion de cycle circadien donne leur cohérence à des résultats apparemment contradictoires.

En ce qui concerne la réactivité lipolytique de l'adipocyte nous observons à la naissance une activité lipolytique spontanée élevée qui diminuera pendant l'allaitement jusqu'au sevrage où elle atteint le niveau qu'elle conserve jusqu'à l'âge adulte. En revanche, quant à la réactivité lipolytique induite par les hormones, à la naissance, nous observons une certaine résistance aux effets lipolytiques du synacthène qui disparaîtra dès l'âge de 10 jours. Quant aux effets lipolytiques de l'isoprotérénol, ils sont toujours discrets et ne varient pas pendant la croissance du lapereau ; la dose efficace étant de 10^{-6} M bien que le maximum de stimulation, comme pour le synacthène, soit observé 10 jours après le sevrage. Notons que chez le lapin de 60 jours, nous trouvons un niveau lipolytique basal comparable à celui décrit par LAFONTAN (1979). Au delà de 60 jours selon cet auteur, la capacité lipolytique de l'adipocyte augmenterait et chez le lapin de 16 mois elle serait même trois fois supérieure à celle que nous mesurons chez le lapin de 2 mois, alors que la sensibilité bêta-adrénergique diminuerait avec l'âge, comme de nombreux auteurs l'ont aussi rapporté chez le rat (BENJAMIN et alii, 1961 ; THERRIAULT et alii, 1969 et ALTSCHULER et alii, 1962).

D'autres travaux ont montré aussi l'augmentation de la lipolyse basale spontanée avec l'âge et la taille des adipocytes en particulier chez le rat (ZINDER et SHAPIRO, 1971 ; DI GIROLAMO et alii, 1974) et chez l'homme GOLDRICK et Mc LOUGHLIN, 1970 ; JACOBSSON et SMITH, 1972). Selon LAFONTAN, chez le lapin la perte de l'activité lipolytique de l'adrénaline au cours du temps serait la conséquence d'une augmentation relative des sites alpha-adrénergiques antilipolytiques par rapport aux sites bêta. Nous observons aussi une diminution de la réceptivité bêta-adrénergique lipolytique depuis la naissance jusqu'à l'âge de 60 jours qui est peut-être la conséquence d'une augmentation progressive de la réceptivité alpha.

CHAPITRE IV

DESORDRES MORPHOLOGIQUES CONSECUTIFS A LA SURRENALECTOMIE CHEZ LE LAPIN ADULTE

I - APPROCHE PHYSIOLOGIQUE

II - APPROCHE MORPHOLOGIQUE

III - DISCUSSION

CHAPITRE IV

I - APPROCHE PHYSIOLOGIQUE

A - ASPECTS METABOLIQUES ET ENDOCRINOLOGIQUES

B - LIPOGENESE DE L'HEPATOCYTE ET SURRENALECTOMIE

II - APPROCHE MORPHOLOGIQUE

A - HYPOPHYSE

B - FOIE

C - PANCREAS

D - INTESTIN GRELE

III - DISCUSSION

Un rôle possible de l'ACTH dans la régulation de la mobilisation des lipides chez les mammifères fut envisagé à partir des travaux de ROSENBERG (1953) montrant que l'ACTH accroît les lipides hépatiques chez la souris. WHITE et ENGEL (1958) stimulent "in vitro", par cette même hormone, la production d'acides gras libres à partir du tissu adipeux de rat ; chez le rat surrénalectomisé, l'ACTH par voie intraveineuse augmente les acides gras libres plasmatiques (HOLLENBERG et alii, 1961). Il est alors envisagé une action extrasurrénalienne probable de l'ACTH sur la mobilisation des lipides. Toutefois des auteurs contestent la signification physiologique des observations précédentes (ENGEL 1961, ENGEL et LEBOWITZ 1966, LEBOWITZ et ENGEL 1965, ASTWOOD 1965).

Chez le lapin la surrénalectomie provoque des troubles métaboliques importants (DESBALS et alii, 1965) ; ainsi à côté des classiques hypoglycémie, hyperkaliémie et urémie, nous observons une très forte mobilisation lipidique plasmatique et un léger foie gras. Seul le cortisol corrige ces troubles et permet la survie prolongée des lapins surrénalectomisés. Ces désordres métaboliques sévères chez le lapin surrénalectomisé peuvent être attribués en partie à la carence en glucocorticoïdes mais leur intensité et leur précocité sont telles que nous avons envisagé un rôle de l'ACTH endogène dans leur déterminisme. Nous avons supposé que, chez le lapin, la surrénalectomie serait suffisante pour induire une très importante sécrétion réactionnelle d'ACTH (MONNIER et alii, 1965) et que cette hormone serait en partie responsable de la mobilisation des graisses.

L'objet du présent travail, au travers d'approches méthodologiques complémentaires (dosages biochimiques, dosages hormonaux, cellules hépatiques isolées, études morphologiques en microscopies photonique et électronique), est de prouver après la surrénalectomie, la réalité de la sécrétion réactionnelle d'ACTH, de comprendre la nature du foie gras dont la précocité surprend, d'envisager un rôle possible du pancréas endocrine dans le déterminisme de l'hypoglycémie et de rechercher une altération des entérocytes pouvant rendre compte des diarrhées observées.

I - APPROCHE PHYSIOLOGIQUE

A - ASPECTS METABOLIQUES ET ENDOCRINOLOGIQUES (tableau XVII).

La surrénalectomie chez le lapin se caractérise par une augmentation très considérable et précoce (18 heures) au niveau du plasma des acides gras totaux (+ 311 %) et du cholestérol total (+ 112 %) alors que l'hypoglycémie est sévère (- 41 %) ; au niveau hépatique les acides gras s'accumulent (+ 27 %) tandis que le taux du glycogène reste bas comme chez les témoins à jeun. Ces troubles métaboliques s'accompagnent d'une augmentation remarquable de l'ACTH plasmatique (+ 541 %).

TABLEAU XVII - Effets de la surrénalectomie sur quelques constituants plasmatiques et hépatiques chez le lapin

	Témoins		18 heures après la surrénalectomie	
PLASMA (Constituants en mg p. 100 ml)				
Acides gras totaux	254 ± 52	[27]	1045* ± 317	[22]
Cholestérol total	54 ± 8	[23]	115* ± 30	[18]
Glucose	143 ± 6	[32]	84* ± 14	[23]
FOIE (Constituants en g p. 100 g)				
Acides gras totaux	3.41 ± 0.66	[14]	4.33* ± 0.94	[16]
Glycogène	0.44 ± 0.21	[13]	0.44 ± 0.30	[11]
PLASMA (ACTH en pg p. ml)				
	191 ± 38	[5]	1225* ± 170	[5]

* Différences significatives des valeurs témoins au seuil de 0.05.

[] Nombre d'animaux.

Les troubles métaboliques consécutifs à la surrénalectomie s'accompagnent d'une augmentation très considérable du taux plasmatique de l'ACTH.

TABLEAU XVIII -

Lipogenèse de l'hépatocyte isolé: acides gras et lipides totaux (en cpm p. mg de protéines totales p. heure d'incubation)

	Lapin normal [7]				Lapin surrénalectomisé [3]	
	Glucose ¹⁴ C - (U)		Acétate ¹⁴ C - I		Glucose ¹⁴ C - (U)	Acétate ¹⁴ C - I
	Témoin	Insuline (0.1 mU/ml)	Témoin	Insuline (0.1 mU/ml)	Témoin	Témoin
Acides gras	Il n'y a pas de lipogenèse décelable					
Lipides totaux	1070 ±136	1719* ±281	30* ±11	pas de variation	390* ±93	non décelable

[] Nombre d'animaux.

* Différences significatives au seuil de 0.05 par rapport au témoin 'Glucose¹⁴C - (U)' lapin normal.

B - LIPOGENESE DE L'HEPATOCYTE ET SURRENALECTOMIE (Tableau XVIII).

Le tableau XVIII montre que l'hépatocyte de lapin normal ou surrénalectomisé, tant à partir du glucose que de l'acétate comme précurseurs métaboliques, ne synthétise pas d'acides gras "de novo".

En revanche les lipides totaux, essentiellement constitués par des triglycérides, présentent un marquage radioactif important à partir du précurseur glucose, tandis qu'il est extrêmement faible à partir de l'acétate. Ceci signifie que le glucose marqué a été utilisé dans la synthèse des triglycérides pour la partie glycérol de la molécule.

Cette synthèse est stimulée par l'insuline alors qu'après la surrénalectomie, elle est atténuée.

II - APPROCHE MORPHOLOGIQUE

Les résultats portent sur les modifications les plus remarquables au niveau de l'hypophyse, du foie, du pancréas exocrine et endocrine et de l'intestin.

A - HYPOPHYSE

Après surrénalectomie les cellules à ACTH paraissent dégranulées dans la zone périnucléaire ; en revanche on observe l'accumulation des granulations auprès du plasmalemme. De multiples complexes de Golgi sont observés dans ces mêmes cellules (figure 47) et la technique de DALTON et FELIX (1953) révèle (figure 48) au niveau de certaines citernes dilatées un matériel osmiophile dense aux électrons. Par ailleurs au niveau de la capsule enveloppant l'hypophyse on remarque des fibroblastes dont l'appareil de Golgi, chez ces lapins surrénalectomisés, est hypertrophié, sa cis-surface étant constituée de nombreuses vésicules révélées par la méthode de THIERY (1973) ; le réticulum endoplasmique granuleux est dilaté et dans ses citernes un matériel dense aux électrons est observé (figure 49).

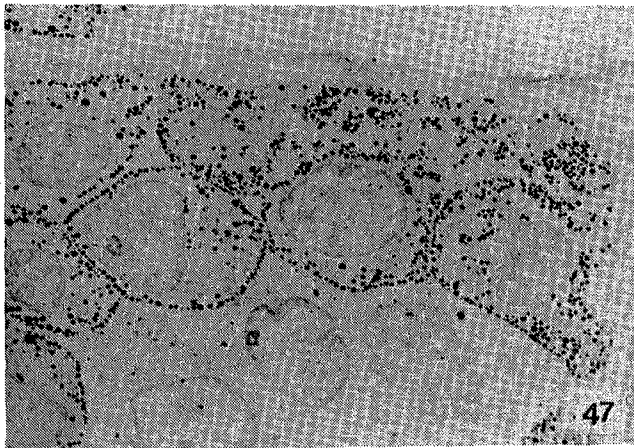
B - LE FOIE

Après surrénalectomie, la coloration au Soudan III révèle une infiltration lipidique massive des hépatocytes situés autour des vaisseaux sanguins interlobulaires (figure 50); ces gouttelettes lipidiques intracellulaires sont très remarquables par leurs dimensions très différentes comme le montre l'examen en microscopie électronique (figure 51).

Le glycogène n'est observé qu'au niveau de rares hépatocytes seulement (figure 52).

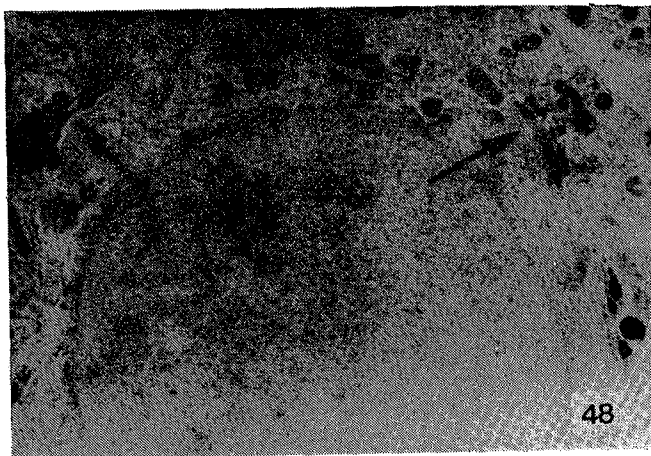
PLANCHE 23

ULTRASTRUCTURE DE L'ADENOHYPOPHYSE DE LAPIN SURRENALECTOMISE :
CELLULES A ACTH ET ENVELOPPE FIBROCONJONCTIVE



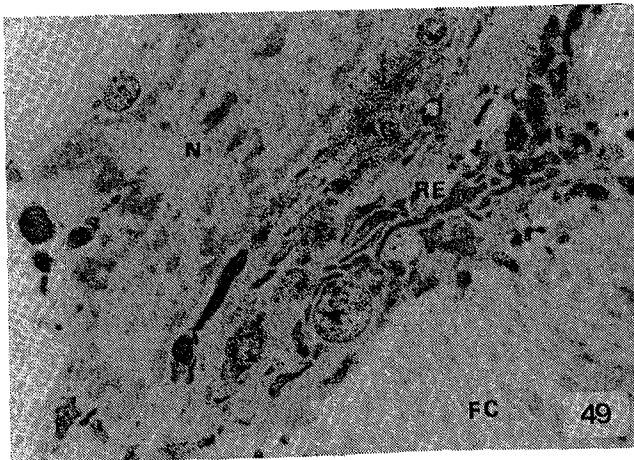
Cellules à ACTH

X 3082



Cellules à ACTH

X 9400



Fibroblaste

X 11993

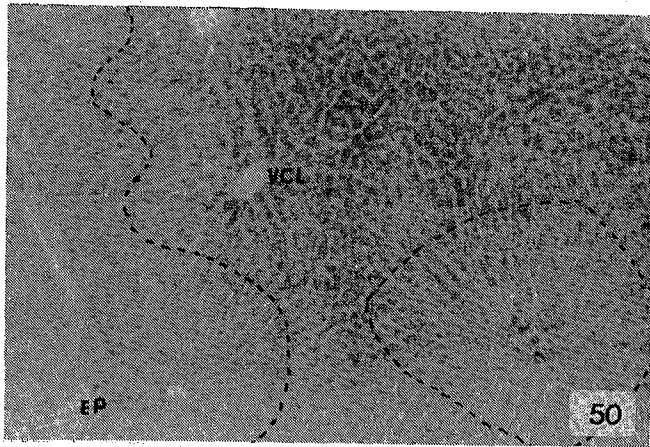
Figure 47 : Notons un alignement régulier et important des granulations sphériques à la périphérie cellulaire.

Figure 48 : Les flèches indiquent que les citernes hypertrophiées dans la partie "trans" de l'appareil de Golgi.

Figure 49 : Nous observons un fibroblaste de l'enveloppe conjonctive de l'hypophyse avec un appareil de Golgi hypertrophié.

PLANCHE 24

REPARTITION DES LIPIDES DANS LE FOIE DE LAPIN SURRENALECTOMISE
en microscopies photonique et électronique



Lobules hépatiques

X 50



Hépatocyte

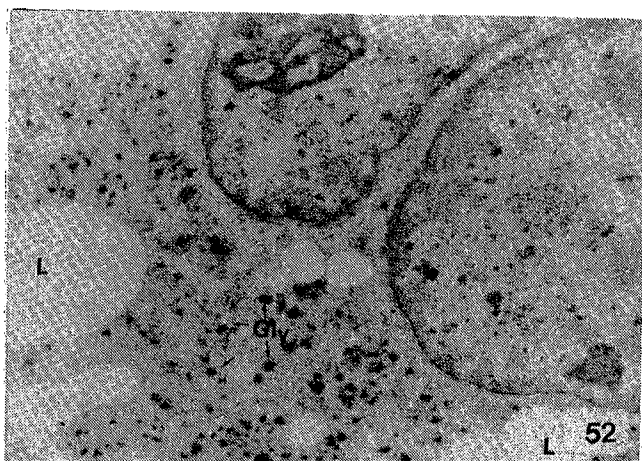
X 11500

Figure 50 : Les hépaocytes situés à la périphérie des lobules hépatiques sont très chargés en lipides.

Figure 51 : Nous observons des inclusions lipidiques dans l'hépatocyte.

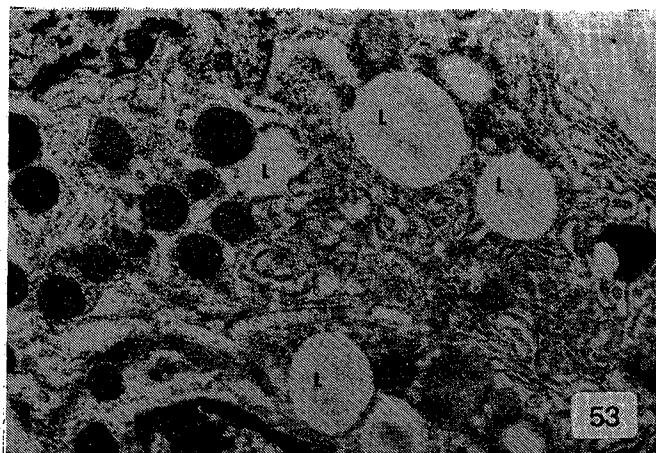
PLANCHE 25

ULTRASTRUCTURE D'HEPATOCYTES ET DE CELLULES ACINEUSES
(PANCREAS EXOCRINE) DE LAPIN SURRENALECTOMISE



Hépatocytes

X 12944



Cellule acineuse

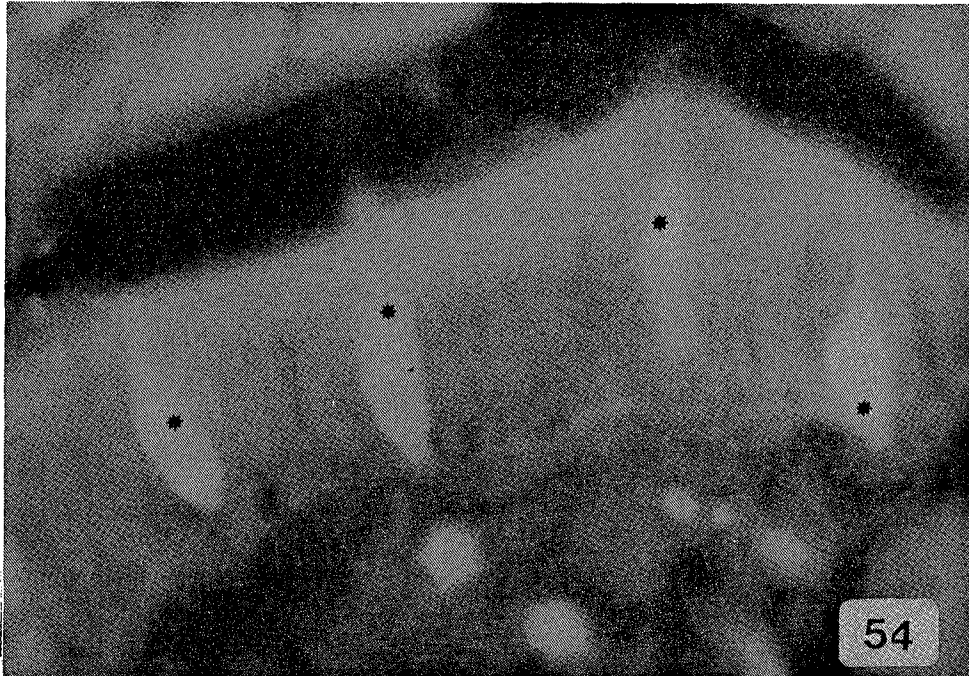
X 9380

Figure 52 : Nous observons des inclusions lipidiques et des grains de glycogène dans ces hépatocytes.

Figure 53 : Nous constatons une intense infiltration lipidique des cellules acineuses du pancréas exocrine.

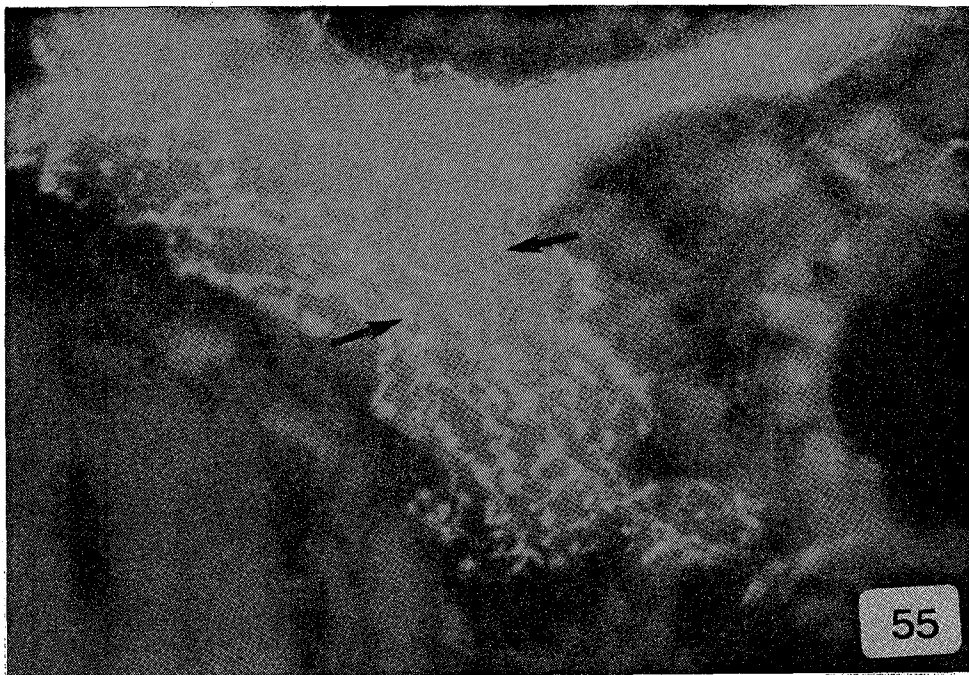
PLANCHE 26

CELLULES ENTEROCHROMAFFINES ET LE RESEAU NERVEUX
DE L'INTESTIN GRELE
en microscopie photonique



Cellules
entérochromaffines

X 214



Réseau nerveux
péricapillaire

X 214

Figure 54 : Au niveau de l'intestin grêle, nous observons des cellules entérochromaffines présentant une très forte fluorescence jaunâtre située autour du noyau.

Figure 55 : Au niveau de l'intestin grêle, nous mettons en évidence par une fluorescence verdâtre un réseau nerveux péricapillaire ; notons les varicosités le long des fibres nerveuses.

C - PANCREAS

Les cellules acineuses du pancréas, d'aspect normal, montrent toutefois une importante infiltration lipidique matérialisée par de très nombreuses gouttelettes de graisses (figure 53). Pour le pancréas endocrine, la coloration P.F. met en évidence une accumulation des granulations sécrétoires dans le pôle péricapillaire des cellules B. L'analyse en microscopie électronique montre une certaine dégranulation de la cellule B avec un développement considérable de l'appareil de Golgi.

D - INTESTIN GRELE

Les cellules enterochromaffines de l'intestine grêle du lapin surrénalectomisé présentent une forte fluorescence jaunâtre localisée surtout autour du noyau et dans la partie basale (figure 54). Le réseau nerveux autour des capillaires et au niveau du plexus myentérique est marqué par une fluorescence verdâtre beaucoup plus prononcée que chez les témoins (figure 55). Le réseau est constitué de fibres nerveuses pourvues de beaucoup de varicosités.

III - DISCUSSION

AGID et alii (1965) ont attribué à de probables effets extrasurrénaux de l'ACTH, le déterminisme des troubles métaboliques, en particulier ceux de la circulation des lipides, consécutifs à la surrénalectomie chez le lapin. Ces auteurs ont émis cette hypothèse tout d'abord en traitant par l'ACTH des lapins surrénalectomisés dont les troubles métaboliques ont été prévenus par l'administration de cortisol ; l'ACTH provoque alors, par un mécanisme obligatoirement extrasurrénal, une série de troubles métaboliques, hypoglycémie, collapsus vasculaire, diarrhée et surtout hyperlipémie, tout à fait comparables à ceux induits par la surrénalectomie (AGID et alii, 1965). En outre si la sécrétion endogène d'ACTH est supprimée par l'hypophysectomie, la surrénalectomie chez le lapin n'induit plus ces troubles métaboliques si caractéristiques (DESBALS et alii, 1967). Ces arguments expérimentaux, bien qu'indirects, sont très favorables à un rôle déterminant de l'ACTH dans la genèse de la plupart des troubles métaboliques consécutifs à l'ablation des surrénales chez le lapin.

Nous apportons ici des preuves directes tout d'abord de la sécrétion réactionnelle d'ACTH à la suite de la surrénalectomie chez le lapin ; ainsi le taux plasmatique de l'hormone s'accroît de plus de 500 % ; en outre, au niveau de l'hypophyse, les cellules à ACTH présentent tout à la fois un état d'activation de la synthèse de l'hormone comme l'indique un appareil de Golgi bien développé, mais aussi un état d'activation sécrétoire illustré par un certain niveau de

dégranulation pétrinuélaire alors que les granulations spécifiques s'accumulent auprès du plasmalemme. Ces images de synthèse et de sécrétion de l'ACTH par les cellules hypophysaires s'accordent avec le taux plasmatique élevé que nous mesurons.

Par ailleurs, au niveau des fibroblastes de l'enveloppe conjonctive de l'hypophyse nous observons, chez le lapin surrénalectomisé, tous les signes cytologiques de l'activation de la synthèse du collagène. Ceci peut être rapporté d'une part à l'absence des corticostéroïdes dont les effets inhibiteurs sur cette synthèse sont bien connus mais aussi d'autre part à un effet direct stimulant de l'ACTH dont la sécrétion domine l'économie endocrine chez cet animal privé de surrénales.

Au niveau du foie, la stéatose précoce observée ne semble pas pouvoir être rapportée à une synthèse "de novo" d'acides gras comme le montre l'incapacité de l'hépatocyte à les fabriquer tant à partir du glucose que de l'acétate comme précurseurs chez le lapin normal ou surrénalectomisé. En revanche l'hépatocyte a la capacité de stocker les graisses et la triglycérogénèse à partir du glucose est remarquable. L'observation morphologique montre que l'infiltration lipidique des lobules hépatiques s'effectue à partir de leur périphérie ce qui laisse supposer que ces lipides pourraient provenir de la circulation systémique. Cette observation s'accorde avec les résultats de l'étude de la lipogénèse de l'hépatocyte ; l'hépatocyte stockerait des graisses d'origine plasmatique, mobilisées par l'ACTH à partir de l'adipocyte des dépôts adipeux (DESBALS et alii, 1971). L'infiltration lipidique des cellules acineuses du pancréas est inattendue car ces cellules ne prennent pas part au processus de la lipogénèse, toutefois cette surcharge graisseuse, comme pour l'hépatocyte, pourrait être la conséquence de l'extrême mobilisation lipidique observée au niveau du plasma.

Notre attention est aussi attirée, au niveau du pancréas endocrine, par la dégranulation de la cellule B, d'autant qu'elle s'accompagne d'une orientation péricapillaire des granulations, signe d'une activité sécrétoire accrue (DONEV et alii, 1978). Cette observation pourrait rendre compte de l'hypoglycémie caractéristique chez le lapin surrénalectomisé. Toutefois le déterminisme de cette activation de la cellule B reste à élucider, l'intervention des acides gras libres mobilisés à partir de l'adipocyte par l'ACTH (WHITE et ENGEL, 1958 ; HOLLENBERG et alii, 1961 ; DESBALS et alii, 1971) peut être envisagée tout comme une stimulation directe par l'ACTH elle-même.

Par ailleurs la surrénalectomie chez le lapin s'accompagne d'une diarrhée ACTH-dépendante (DESBALS, 1967) or, l'examen des entérocytes de l'intestin grêle met en évidence une exaltation de la production des amines biogènes ; une éventuelle relation causale entre ces deux observations mérite d'être élucidée.

En conclusion cette approche morphologique des effets de la surrénalectomie chez le lapin établit de façon incontestable le rôle extrasurrénalien de l'ACTH dans le déterminisme des troubles lipidiques. La stéatose hépatique semble bien devoir être rattachée à un stockage de graisses provenant de la mobilisation plasmatique induite par l'ACTH, un trouble métabolique semblable peut aussi s'observer au niveau du pancréas exocrine. La stimulation de l'activité sécrétoire des cellules B du pancréas, comme celle de la synthèse du collagène par les fibroblastes posent le problème de leur déterminisme : la levée du frein corticosurrénalien constitue-t-elle une cause suffisante ou bien doit-on envisager de nouvelles propriétés extrasurréaliennes de l'ACTH ? Une même interrogation sur l'éventuelle relation causale ACTH, activation des cellules entérochromaffines et diarrhée est posée.

RESUME ET CONCLUSIONS

RESUME ET CONCLUSIONS

- I - L'HEPATOCYTE ISOLE CHEZ LE LAPIN
- II - CONTRIBUTION A L'ETUDE DES RYTHMES CIRCADIENS ET CIRCANNUELS
DES RESERVES ENERGETIQUES DU LAPIN DE 60 JOURS
- III - EVOLUTION DES RESERVES ENERGETIQUES DU LAPEREAU AU COURS
DE LA CROISSANCE ET DU DEVELOPPEMENT
- IV - DESORDRES MORPHOLOGIQUES CONSECUTIFS A LA SURRENALECTOMIE
CHEZ LE LAPIN ADULTE

Arrivée au terme de l'exposé de notre travail, nous nous proposons de résumer ici les principales conclusions auxquelles il nous a conduit, en insistant plus particulièrement sur les aspects qui nous paraissent constituer une contribution originale.

I - L'HEPATOCYTE ISOLE CHEZ LE LAPIN

La première partie de ce travail a été de mettre au point au laboratoire la technique d'isolement des hépatocytes tant du lapin adulte que du nouveau-né et du lapereau au cours de la croissance.

Cette technique consiste à perfuser le foie "in situ" et à séparer les hépatocytes par digestion de la trame conjonctive par la collagénase. Les hépatocytes sont isolés, en ambiance fortement oxygénée, par un ensemble de lavages et de centrifugations puis préincubés avant toute utilisation afin qu'ils récupèrent leurs potentialités physiologiques. La qualité des préparations cellulaires doit être vérifiée avant toute investigation et des contrôles morphologiques et métaboliques en particulier l'étude de la néoglucogenèse à partir du lactate permettent cette vérification.

L'étude de la néoglucogenèse de l'hépatocyte isolé d'animaux à jeun ou nourris met en évidence l'influence de l'état nutritionnel qui conditionne par ailleurs directement la quantité de protéines totales des hépatocytes, le jeûne diminue cette composante. En outre nous constatons que la cohésion entre les hépatocytes se renforce avec l'âge ce qui nécessite une augmentation de la durée de la digestion par la collagénase, avec comme conséquence une lyse plus importante des hépatocytes chez l'animal adulte.

Ainsi, le métabolisme de ces hépatocytes isolés peut-il être comparé à celui des adipocytes isolés.

L'hépatocyte isolé paraît avoir toute son intégrité cellulaire. Nous avons alors vérifié, qu'outre sa capacité à la néoglucogenèse, cet hépatocyte pouvait synthétiser des acides gras "de novo". A cette fin nous avons étudié l'incorporation de l'hydrogène radioactif de l'eau tritiée dans la molécule d'acides gras et effectivement l'hépatocyte isolé, selon notre protocole, synthétise des acides gras, ce qui confirme la qualité de cette préparation. La synthèse des lipides à partir de sources de carbone comme le glucose ou l'acétate donne d'autres informations ; ainsi les carbones du glucose sont incorporés aux lipides totaux dans le radical glycérol et non dans le radical acides gras, enfin l'acétate est peu métabolisé et ne paraît pas un donneur de carbone quantitativement important. Enfin la triglycérogenèse est exaltée lors du jeûne.

II - CONTRIBUTION A L'ETUDE DES RYTHMES CIRCADIEN ET CIRCANNUEL DES RESERVES ENERGETIQUES DU LAPIN DE 60 JOURS.

Nos recherches nous ont permis de révéler l'existence de cycles circadiens et circannuels des disponibilités énergétiques au niveau du foie et du tissu adipeux chez le jeune lapin de 2 mois.

Chez cet animal nous observons un rythme circadien de la prise alimentaire, 70 % de la ration étant consommés pendant la nuit ; par ailleurs nous décrivons des cycles circadiens du taux des constituants plasmatiques (glucose, lipides) et des réserves hépatiques (glycogène et lipides) avec des maxima nocturnes.

Au niveau de l'hépatocyte isolé "in vitro" il y a aussi des variations circadiennes de la lipogénèse qui est minimale la nuit alors que ce même hépatocyte est très riche en graisses et en glycogène. Ainsi nous démontrons quantitativement et qualitativement que cette accumulation lipidique nocturne du foie n'est pas exclusivement le fait d'une néolipogénèse, il y a là une dissociation entre le stockage des lipides et leur synthèse. Les propriétés lipogéniques de l'insuline au niveau de l'hépatocyte sont discrètes mais significatives en période nocturne où l'hormone stimule efficacement l'incorporation de l'hydrogène de l'eau tritiée et des carbones du glucose respectivement dans les acides gras et les triglycérides. Le jour, l'insuline ne semble stimuler que la synthèse des acides gras.

Nous confirmons "in vitro" que l'adipocyte du tissu adipeux périrénal du lapin âgé de 60 jours est capable de synthétiser des lipides essentiellement à partir de l'acétate comme précurseur comparativement au glucose et cela quelle que soit la saison (été comme hiver).

Une des originalités de notre travail est de démontrer ici pour la première fois l'existence d'un cycle nycthéral de la lipogénèse de l'adipocyte, il y a la nuit une biosynthèse d'acides gras à partir de l'acétate huit fois plus importante que le jour, de même la triglycérogénèse à l'aide du glucose est plus intense la nuit que le jour. En outre il existe aussi un cycle circannuel ; l'adipocyte a une activité lipogénique nocturne bien plus élevée l'été que l'hiver. Les propriétés lipogéniques de l'insuline sont elles aussi dépendantes d'un cycle circadien et circannuel. Ainsi au niveau de l'adipocyte la lipogénèse induite par l'insuline est beaucoup plus forte en phase nocturne, surtout en été.

En outre nous démontrons aussi toujours sur l'adipocyte l'existence des cycles circadiens et circannuels de la lipolyse basale et induite ; ainsi la lipolyse spontanée est-elle maximale le jour et de même c'est le jour que les hormones ou leurs analogues synthétiques présentent leurs propriétés lipolytiques maximales. De plus c'est en hiver que ces phénomènes sont à leur maximum.

Au cours du nycthémère il y a chez le lapin coïncidence entre l'activité comportementale nocturne, la prise alimentaire essentiellement nocturne, la mise en réserve des lipides et des glucides au niveau du foie avec aussi les effets lipogéniques maximum de l'insuline sur l'adipocyte toujours en phase obscure. Inversement le jour, l'activité comportementale est réduite, la prise alimentaire est fortement diminuée, les adipocytes ont une activité lipolytique basale et provoquée maximales et le foie présente alors une lipogénèse vraie.

Ces séquences comportementales et métaboliques représentent les propriétés physiologiques propres à cette espèce et sont le résultat de l'évolution mettant en adéquation cet animal avec les conditions de son milieu.

Les variations circannuelles observées illustrent aussi cette adéquation au milieu, fruit de l'évolution de l'espèce : ainsi en été, les propriétés métaboliques du lapin sont telles que par leurs effets elles anticipent les pénuries nutritionnelles de la niche écologique qui se produiront en hiver ; l'adipocyte, en phase nocturne, présente alors sa lipogénèse maximale annuelle avec pour l'insuline des propriétés lipogéniques elles aussi maximales. Inversement, en hiver, en période de restriction nutritionnelle, c'est alors que les propriétés lipolytiques de l'adipocyte sont à leur maximum. Toutes ces régulations montrent la parfaite adéquation du lapin à sa niche écologique et rendent compte de sa survie.

III - EVOLUTION DES RESERVES ENERGETIQUES DU LAPEREAU AU COURS DE LA CROISSANCE ET DU DEVELOPPEMENT

La croissance pondérale du lapereau "Solam Solaf" montre quelle que soit la saison deux temps d'accélération, l'un lors du passage à l'alimentation mixte pendant l'allaitement et le deuxième après le sevrage.

Dès la naissance, l'homéostasie du milieu intérieur est bien assurée au niveau du plasma. Il existe un foie gras qui disparaîtra au cours de l'allaitement. Il en est de même pour la charge en glycogène qui est maximale à la naissance et qui s'atténuera avec le développement ; l'étude cytologique visualise parfaitement ces deux phénomènes et dévoile en outre une très forte activité hématopoïétique qui persiste jusqu'à l'âge de 20 jours et disparaît complètement au sevrage.

A la naissance, l'hépatocyte est le siège d'une importante triglycérogenèse à partir du glucose alors que l'adipocyte réalise la synthèse des acides gras à partir de l'acétate. Pendant l'allaitement, l'adipocyte perd ses capacités de synthèse "de novo" d'acides gras alors que l'hépatocyte continue d'accumuler des triglycérides ; en outre après le sevrage l'adipocyte va récupérer ses capacités lipogéniques.

En ce qui concerne l'insuline, il est à remarquer que, à la naissance, cette hormone est lipogénique le jour, cette propriété disparaîtra au cours de l'allaitement et, après le sevrage, ce n'est qu'en période nocturne que l'insuline stimulera la lipogénèse.

Par ailleurs, chez le nouveau-né, la lipolyse spontanée de l'adipocyte est à son maximum et elle diminuera au cours de l'allaitement jusqu'au sevrage où elle atteindra le niveau que nous lui connaissons chez l'adulte. De même la réactivité lipolytique aux hormones varie au cours du développement, ainsi le synacthène n'exercera la plénitude de ses effets lipolytiques qu'à partir du dixième jour postnatal ; en revanche la réactivité lipolytique à l'isoprotérénol diminue avec l'âge.

Au cours de la croissance du lapereau, nous observons un certain équilibre dans l'évolution des propriétés métaboliques respectives du foie et du tissu adipeux.

A la naissance, alors que l'adipocyte a des activités lipogéniques et lipolytiques maximales, l'hépatocyte accumule des réserves énergétiques (glycogénèse et triglycérogénèse).

Puis lors de l'allaitement et jusqu'au sevrage, l'activité lipogénique de l'adipocyte décroît et la couverture du besoin lipidique serait alors assurée par le lait maternel remarquablement riche en lipides chez la lapine.

Par ailleurs, les propriétés lipogéniques de l'insuline s'expriment le jour à la naissance à l'inverse de ce que nous observons chez l'adulte ; la mise en place du cycle circadien des effets de l'insuline n'est donc pas réalisée à la naissance, ce cycle s'installe progressivement.

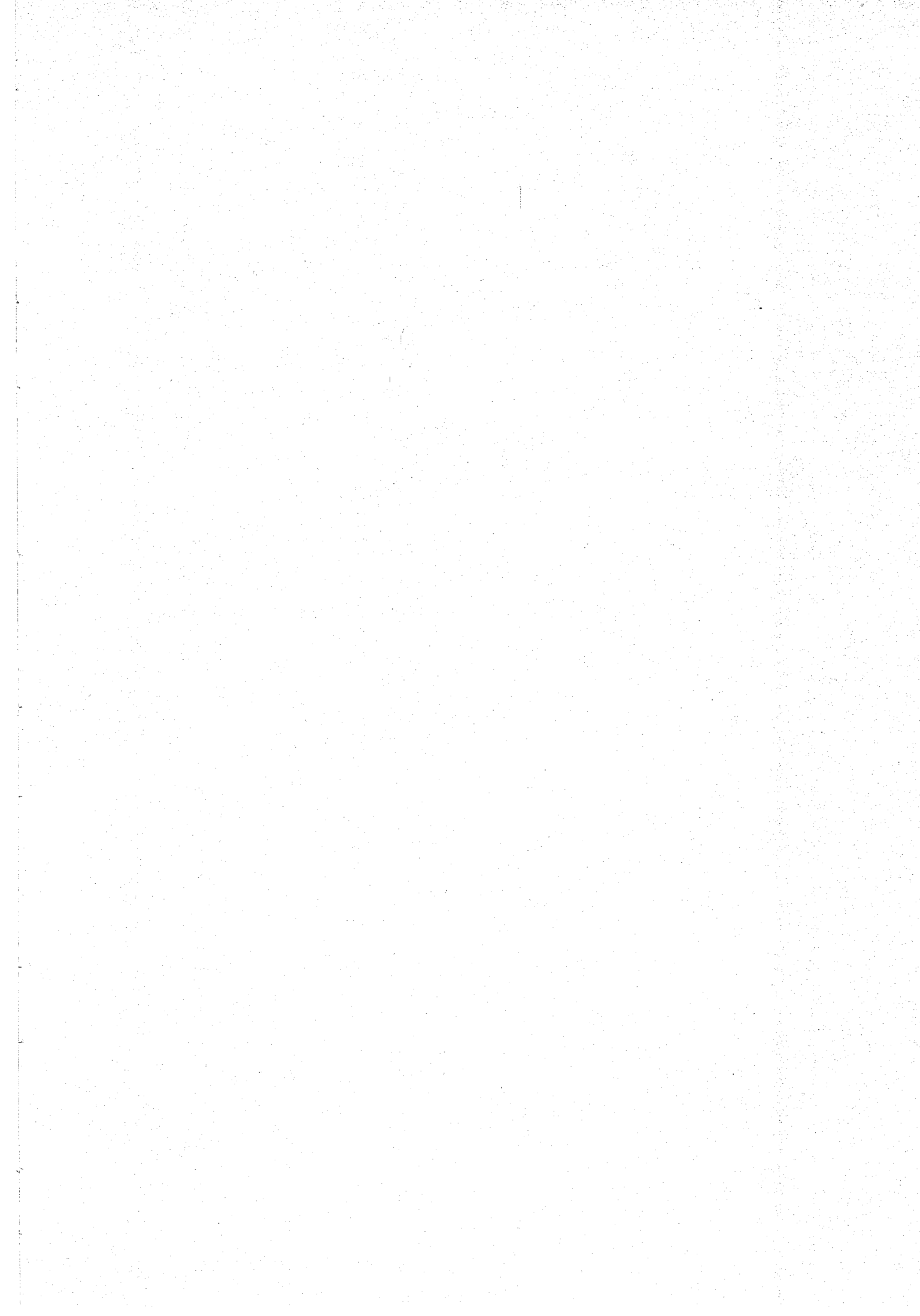
IV - DESORDRES MORPHOPHYSIOLOGIQUES CONSECUTIFS A LA SURRENALECTOMIE CHEZ LE LAPIN ADULTE.

La surrénalectomie entraîne chez le lapin de nombreux désordres métaboliques en particulier au niveau du métabolisme des lipides. Nous fournissons ici des preuves directes que l'ablation des surrénales induit une hypersécrétion d'ACTH (dosage radioimmunologique - ultrastructure de l'adénohypophyse). La stéatose hépatique établie par l'évaluation quantitative et la visualisation morphologique ne serait pas la conséquence d'un accroissement de la lipogénèse comme en témoigne l'activité de l'hépatocyte isolé. En outre les arguments morphologiques laissent supposer qu'il s'agit d'une infiltration graisseuse du foie à partir des lipides circulants. Au niveau du pancréas, la surrénalectomie s'accompagne d'une dégranulation des

cellules B ; si cette dégranulation est la conséquence d'une vidange du pancréas de son insuline comme semble l'indiquer l'observation cytologique, l'hypoglycémie observée chez l'animal privé de surrénales est ainsi expliquée. Notons aussi au niveau du pancréas exocrine une infiltration graisseuse inattendue et inexpliquée des acini.

Enfin au niveau de l'intestin grêle il y a un accroissement du taux des amines biogènes dans les entérocytes que nous essayons de corréler à l'hypersécrétion d'ACTH et à la diarrhée consécutives à la surrénalectomie.

Il y a là un ensemble d'arguments permettant d'attribuer à l'ACTH la responsabilité de la plupart des troubles consécutifs à la surrénalectomie ce qui illustre de ses effets extrasurrénaux.



- AGID R. (1953) - "Sur le prétendu balancement des teneurs du foie en glucides et lipides". J. Physiol., Paris, 45, 7.
- AGID R., DESBALS B. et DESBALS P. (1965) - "Mise en évidence d'une action propre de la corticotropine sur les métabolismes lipidique et glucidique chez le lapin". C.R. Acad. Sci., Paris, 261, 793-796.
- AGRÉN G.O.W. and JORPES E. (1931). "Cyclic changes in the glycogen content of the liver and the muscles of rats and mice (Their bearing upon the sensitivity of the animals to insulin and their influence on the urinary output of nitrogen)". Biochem. J., 25, 777-785.
- ALAOUI T. (1980) - "Lipogénèse de l'adipocyte chez le lapin - influences de l'âge, de la saison; rôle de l'axe hypophysio-surrénalien". Thèse de 3ème Cycle - Limoges.
- ALAOUI T., DESBALS B., PEJOAN C. et ELCHINGER B. (1982). "Influences de l'âge, de la saison et de l'hypophysectomie sur la lipogénèse de l'adipocyte chez le lapin". J. Physiol., Paris, 78, 146-150.
- ALBRINK M.J. (1959). "The microtitration of total fatty acids of serum, with notes on the estimation of triglycerids". J. Lipid. Research, 1, 53.
- ALLCROFT W.M. (1933). "Diurnal variations in the blood sugar levels of the lactating cow". Biochem. J. 27, 1820-1823.
- ALTSCHULER H., LIEBERSON M. and SPITZER J.J. (1962). "Effect of body weight on free fatty acid release by adipose tissue in vitro". Experientia, 18, 91-92.
- ALWEN J. and GALLAI-HATCHARD J.J. (1972). "A method of maintaining parenchymal cells from adult rat liver in vitro". J. Cell. Sci., 11 ; 249-260.
- AMSTERDAM A. and JAMIESON J.D. (1972). "Structural and Functional Characterization of Isolated Pancreatic Exocrine Cells". Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 69, 10, 3028-3032.
- AMSTERDAM A. and JAMIESON J.D. (1974). "Studies on dispersed pancreatic exocrine cells - I Dissociation Technique and Morphologic Characteristics of separated Cells". J. Cell. Biol. 63, 1037-1056.
- ANDERSON N.C. (1953). "The Mass Isolation of Whole Cells from Rat Liver". Science, 117, 627-629.
- ARINZE J.J., GARBER A.J. and HANSON R.W. (1973a). "The regulation of gluconeogenesis in mammalian liver. The role of mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase". J. Biol. Chem., 248, 2266-2274.
- ARINZE J.J. and HANSON R.W. (1973b). "Mitochondrial redox State and the regulation of gluconeogenesis in the isolated perfused cat liver". FEBS Letters, 31, 280-282.
- ARMSTRONG S. (1980). "A chronometric approach to the Study of Feeding Behavior". Neurosci. et Biobehav. Rev., 4, 27-53.
- ASSENMACHER L. (1984). "Les cycles physiologiques". Courrier du CNRS.
- ASTWOOD E.B. (1965). "The pituitary gland and the mobilization of fat". In : Handbook of Physiology. Adipose tissue. Edit. Renold and Cahill. Amer. Physiol. Soc. Washington D.C., 529.

- AUMAITRE A., LEGAULT C., SALMON-LEGAGNEUR E., (1966). "Aspects biométriques de la croissance pondérale du Porcelet. I. Influence du sexe, de l'année de naissance, du numéro et de la taille de la portée". *Ann. Zootech.*, 15, 313-331.
- AZZOUT B. (1984). "Développement de la gluconéogenèse hépatique au cours du jeûne ou de l'ingestion d'un régime hyperprotéique glucidoprive. Rôle de la L. Pyruvate Kinase". Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences naturelles présentée à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- AZZOUT B., CHANEZ M., BOIS-JOYEUX B. and PERET J. (1984). "Gluconeogenesis from Dihydroxyacetone in Rat hepatocytes during the Shift from a low protein, High-Carbohydrate to a high protein, Carbohydrate-Free Diet". *J. Nutr.*, 114, 2167-2178.
- AZZOUT B. et PERET J. (1983). "Gluconeogenesis from dihydroxyacetone in isolated rat hepatocytes during feeding cycle and starvation". *Fed. Proc.*, 42, 929(3732).
- AZZOUT B. and PERET J. (1984). "Pyruvate Kinase activity in isolated Rat hepatocytes during a feeding cycle and during fasting". *Diabète et Métabolisme*, 10, 165-170.
- AZZOUT B. et PERET J. (1984). "Development of gluconeogenesis from dihydroxyacetone in rat hepatocytes during feeding cycle and fasting". *Biochem. J.* 218, 975-981.
- BAKER R.A. (1953). "A periodic feeding in the albino rat". *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 46, 422.
- BAKER JR., JOHNSON R.N. and SCOTT D.J. (1984). "Serum fructosamine concentration in patients with type II (non - insulin - dependent) diabetes mellitus during changes in management". *Br. Med. J.*, 288, 1484-1486
- BALAGURA S. and COSCINA D.V. (1968). "Periodicity of food intake in the rat as measured by an operant response". *Physiol. Behav.*, 3, 641-643
- BALL E.G., MARTIN D.B. and COOPER O. (1959). "Studies on the metabolism of adipose tissue. I. The effect of insulin on glucose utilization as measure by the manometric determination of carbon dioxide output". *J. Biol. Chem.*, 234, 774-780
- BALLARD F.J. and HANSON R.W. (1967). "Changes in lipid Synthesis in Rat Liver during Development" *Biochem. J.*, 102, 952
- BALLARD F.J. and OLIVER LT., (1964b). "The effect of Concentration on Glucose Phosphorylation and Incorporation into Glycogen in the Livers of Foetal and Adult Rats and Sheep". *Biochem. J.*, 92, 131-136
- BALLY P.R., CAHILL G.F., LEBOEUF B. and RENOLD A.E. (1960). "Studies on Rat adipose tissue in vitro. V. Effects of glucose and insulin on the metabolism of palmitate 1-¹⁴C". *J. Biol. Chem.*, 235, 333-336
- BALZER K., BOJAR H., BOEMINGHAUS H. and STAIB W. (1974). "An Enzymatic Method for Isolation of Tubules and Cells from Human Kidney Cortex". *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355, 1172.
- BARAONA E. and LIEBER C. (1970). "Effects of chronic ethanol feeding on serum lipoprotein metabolism in the Rat". *J. Clin. Invest.*, 49, 769-778
- BARNABEI O., LECHISSA G. and TOMASI V. (1974). "Hormonal Control of the potassium level in isolated rat liver cells". *Biochimica et Biophysica*, 362, 316-325, 1974.
- BARON R., VEZINHET A. et CANTIER J. (1970). "Allometrie de croissance chez le lapin - Thymus" *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 3, 536-548.

- BARRE D. (1982). "Etude du métabolisme des lipides chez le poussin (*Gallus domesticus*) - Etude comparée du cholestérol et de ses esters chez l'oiseau et le mammifère en développement". Thèse de 3ème Cycle, Univ. Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- BARTER P.J., CARROLL K.F. and NESTEL P.J. (1971). "Diurnal fluctuations in triglycerides, free fatty acids, and insulin during sucrose consumption and insulin infusion in man." *J. Clin. Invest.*, 50, 583-591.
- BASH K.W. (1939). "Investigation upon a possible organic basis for hunger drive". *J. Comp. Psychol.*, 28, 109-133.
- BAUR H., KASPEREK S., PFAFF E. (1975). "Criteria of viability of isolated liver cells". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 827-838.
- BAUSCHER J. and SCHAEFFER W.L. (1974). "A Diploid Rat Liver Cell Culture - 1 - Characterization and Sensitivity to Aflatoxin B₁". *In Vitro*, 9, 4, 286-293.
- BEAUVILLE M. et RAYNAUD P. (1963). "Recherches sur l'activité peptique du contenu stomacal du lapin pendant le nyctémère". *J. Physiol.*, 55, 625-629.
- BEGUE J.M., GUGUEN-GUILLOUZO C., GUILLOUZO A. et PAULET G. (1986). "Cultures et co-cultures d'hépatocytes d'origine animale ou humaine. Comparaison et applications de ces modèles pour l'étude du métabolisme hépatique". Ass. des Physiologistes, 54ème Réunion, Rennes, 1986 (sous presse).
- BENJAMIN W., GELLHORN A., WAGNER M. and KUNDEL H. (1961). "Effect of aging on lipid composition and metabolism in adrenoreceptor interconversion". *Amer. J. Physiol.*, 201, 540-546.
- BERG T., BAUMAN D. and SEGLEN P.O. (1972). "Induction of tryptophan oxygenase in primary rat liver cell suspensions by glucocorticoid hormone". *Exp. Cell. Res.* 72, 571-572.
- BERLAN M. (1977). "Mise en évidence d'un effet adrénérgique α sur des adipocytes de tissu adipeux de chien". *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D.*, 284, 1677-1680.
- BERRY M.N., ABRAHAM S. and WERNER H.V. (1973b). "Fatty acid synthesis by intact parenchymal cells from rat liver". *Biochem. Soc. Trans.*, 1, 963-965.
- BERRY M.N. and FRIEND D.S. (1969). "High-Yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells". *The Journal of Cell Biology*, vol. 43, 506-520.
- BEST C.H., HARTROFT W.S., LUCAS C.C. and RIDOUT J.M. (1949). "Liver damage produced by feeding alcohol or sugar and its prevention by choline". *Brit. Med. J.*, 2, 1001-1006.
- BIERRY H. et FANDARD L. (1914). "Sur le sucre du plasma sanguin". *C.R. Acad. Sc.*, 158, 61-64.
- BISSEL D.M., HAMMAKER L. et SCHMID R. (1972). "Liver sinusoidal Cells. Identification of a subpopulation for erythrocyte catabolism". *J. Cell. Biol.*, 54, 107-119.
- BISSEL D.M., HAMMAKER L.E. and MEYER U.A. (1973). "Parenchymal Cells from adult rat liver in non-proliferating monolayer culture. I. Functional Studies". *J. Cell. Biol.*, 59, 722-734.
- BLUM J.C. et LECLERCQ B. (1973). "Nouvelles précisions sur les modifications biochimiques et histologiques du foie provoquées par le gavage". Journées avicoles de Varèse (Italie), 2, 193-207.

- **BOISSIN J. et BOISSIN-AGASSE L. (1986).** "Cycle circadien de la photosensibilité et entraînement des cycles physiologiques circannuels". Association des Physiologistes. Endocrinologie - Immunologie. Univ. de Limoges, 6 et 7 Nov. (sous presse).
- **BONNEY R.J., WALKER R. and POTTER V.R. (1973).** "Isoenzyme patterns in parenchymal and non parenchymal cells from regenerating and regenerated liver". *Biochem. J.*, 136, 947-954.
- **BONNEY R.J., BECKER J.E., WALKER P.R. and POTTER V.R. (1974).** "Primary monolayer cultures of adult liver parenchymal cell suitable for study of the regulation of enzyme synthesis". *In Vitro*, 9, 399-413.
- **BOREK C. (1972).** "Neoplastic Transformation in vitro of a clone of adult liver epithelial cells into differentiated hepatomalike cells under conditions of nutritional stress". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 69, 956-959.
- **BORTZ W.M. (1973).** "On the control of cholesterol synthesis". *Metabolism*, 22, 1507-1524.
- **BRANDENBURG J., BOBBERT A.C., EGGEL-MEYER F. (1981).** "Evidence for existence of a retino-hypothalamo-retinal loop in rabbits". *Int. J. Chronobiol.*, 8, 13-29.
- **BRANDENBURG J., BOBBERT A.C. and EGGEL-MAYER F. (1983).** "Circadian changes in the response on the rabbits retina to flashes". *Behavioural Brain Research*, 7, 113-123.
- **BRUCKDORFER K.R., KHAN L.H. and YUDKIN J. (1972)** "Fatty acid synthetase activity in the liver and adipose tissue of rats fed with various carbohydrates". *Biochem. J.*, 129, 439-446.
- **BURNS T.W., LANGLEY P.E. and ROBISON G.A. (1971).** "Adrenergic receptors and cyclic AMP in the regulation of human adipose tissue lipolysis". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 185, 115-128.
- **BURNS T.W., LANGLEY P.E. and ROBISON G.A. (1975).** "Site of free fatty acid inhibition of lipolysis by human adipocytes". *Metabolism*, 24, 265-276.
- **CAHILL G.F., LEBOEUF B. and FLINN R.B. (1969a).** "Studies on rat adipose tissue in vitro. IV - Effect of epinephrine on glucose metabolism". *J. Biol. Chem.*, 235, 1246-1250.
- **CALLIKAN S. (1980).** "Régulation de la glyconéogénèse in vivo et dans les cellules hépatiques isolées de lapin pendant la période périnatale". Thèse de 3ème Cycle. Paris VI.
- **CANTIER J., VEZINHET A., ROUVIER R., DAUZIER L. (1969).** "Allométrie de croissance chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*)" I - Principaux organes et tissus. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 9(1), 5-39.
- **CAPUZZI D.M., ROTHMAN V. and MARGOLIS S. (1971).** "Simplified method for isolation of intact avian and rat liver parenchymal cells". *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 45, 2, 421-429.
- **CAPUZZI D.M., ROTHMAN V. and MARGOLIS S. (1974).** "The regulation of lipogenesis by cyclic nucleotides in intact hepatocytes prepared by a simplified technique". *Journal of Biological Chemistry*, 249,4, 1286-1294.
- **CARLSON L.A. (1965).** "Inhibition of the mobilization of free fatty acids from adipose tissue". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 131, 119-142.
- **CASANELLO D.E. and GERSCHENSON L.E. (1970).** "Some morphological and biochemical characteristics of isolated rat liver cells dissociated with sodium tetraphenylboron and cultured in suspension". *Experimental Cell Research*, 59, 283-290.

- CATANZANO D. (1980). "Insulinémie et lipogénèse de l'adipocyte isolé chez le lapin. Variations saisonnières, influences du jeûne et de l'hypophysectomie". Thèse de 3ème Cycle de Biologie et Physiologie animale. Université de Limoges (Sciences).
- CATANZANO D., DESBALS B. et ELCHINGER B. (1986). "Cycles saisonniers de la lipogénèse de l'adipocyte et de l'insulinémie chez le lapin". Diabète et Métabolisme, 12, 130-136.
- CAYGILL C.P. and STEIN W.D. (1972). "The kinetics of glucose uptake by isolated fat cells and the influence of insulin". Acta. Diabetol. Lat., 9, 900-923.
- CHALATOW S. (1912). "Über das Verhalten der Leber gegenüber den verschiedenen Arten von Speisefett". Arch. F. Path. Anat. in Physiol., 207, 452.
- CHEVILLARD L., GASNIER A. et MAYER A. (1939). "Les modalités de l'ingestion chez les lapins qui s'alimentent spontanément". Annales de Physiologie et de Physicochimie Biologique, 15, 271-281.
- CHLOUVERAKIS C. (1967). "The action of glucose on lipolysis". Metabolism, 16, 469-472.
- CHRAÏBI F. (1980). "Variations saisonnières de l'activité lipolytique des adipocytes de Renard (*vulpes*, *vulpes*), de Blaireau (*Meles meles*) et de Hérisson (*Erimaceus europaeus L.*)". Thèse de 3ème Cycle, Université de Poitiers.
- CLARK D.G., ROGNSTAD R. and KARTZ J. (1974). "Lipogenesis in rat hepatocytes". The Journal of Biological Chemistry, USA ; Vol. 249 - n° 7. Issu of April 10, 2028-2036.
- CLEMENT G., CLEMENT J. et LE BRETON E. (1952). "Etude du foie gras au cholestérol chez le rat blanc, au niveau des structures cellulaires". C.R. Acad. Sc. Paris, 234, 2006-2008.
- CLEMENT G., CLEMENT J., LE BRETON E., PASCAUD M. et TUBIANA M. (1953). "Données nouvelles concernant le foie gras au cholestérol". J. Physiol., 45, 76-78.
- COATES M.E., GREGORY M.E. and THOMPSON S.Y. (1964). "The composition of rabbit's milk". Brit. J. Nutr., 18, 563-586.
- COMAN D.R. (1954). "Cellular adhesiveness in relation to the invasiveness of cancer : electron microscopy of liver perfused with a chelating Agent". Cancer. Res., 14, 519-521.
- COON H.G. (1968). "Clonal culture of differentiated rat liver cells". J. Cell. Biol., 39, 29a.
- CORNELL N.W., LUND P., HEMS R. and KREBS H.A. (1973). "Acceleration of gluconeogenesis from lactate by lysine". Biochem. J., 134, 671-672.
- CORNELL N.W., LUND P. and KREBS H.A. (1974). "The effect of lysine on gluconeogenesis from lactate in rat hepatocytes". Biochem. J., 142, 327-337.
- CORNELL R.P. and FILKINS J.P. (1974). "Characterization of gluconeogenesis in enzymatically isolated parenchymal cells of rat liver". Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine, 145, 203-209.
- COUCH JR. (1956). "Fatty liver in laying hens. A condition which may occur as a result of increased stress". Feeds'uffs, 28(47), 45-54.
- COWIE A.T. (1969). "Variations in the yield and composition of the milk during lactation in the rabbit and the galactopoietic effect of prolactin". J. Endocr., 44, 437-450.

- CRISP D.M. and POGSON C.J. (1972). "Glycolytic and gluconeogenic enzyme activities in parenchymal and non-parenchymal cells from mouse liver". *Biochem. J.*, 126, 1009-1023.
- CHRISTOFFERSEN T. and BERG T. (1974). "Glucagon control of cyclic AMP accumulation in isolated intact rat liver parenchymal cells in vitro". *Biochim. Biophys. Acta*, 338, 408-417.
- CUSHMAN S.W., HENDEL J.J. and JEANRENAUD B. (1973). "Cell associated monoesterified fatty acid levels and their alteration during lipolysis in the isolated mouse adipose cell". *J. Lipid. Res.*, 14, 632-642.
- DAHMANI Y. (1981). "Approche biologique d'un modèle expérimental pour l'étude du diabète : Le Rat des Sables (*Psammomys obesus*). Morphologie du pancréas endocrine et métabolisme de l'adipocyte après régimes hypo et hypercaloriques". Thèse de 3ème Cycle - Nutrition - métabolisme, Univ. d'Alger H. BOUMEDIENE.
- DALTON A. and FELIX M.D. (1953). "High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells of the epididymis and duodenum of the mouse". *Amer. J. Anat.*, 92, 277-305.
- DAoust R. (1958). "The cell population of liver tissue and the cytological reference bases". In *Liver Function*, ed. Brauer R.W., 3-10. American Institute Biological Sciences Publication, 4.
- DAWKINS M.J.R. et HULL D. (1964). "Brown adipose tissue and the response of new-born rabbits". *J. Physiol.* 172, 216.
- DEFLANDRE C. (1903). "La fonction adipogénique du foie dans la série animale". Thèse Sciences, Paris, 127 p.
- DEMAUX G., GALLOUIN F., GUEMON L. and PAPANTONAKIS C. (1980). "Effets de la privation prolongée du comportement de coacotrophie chez le lapin". *Reprod. Nutr. Develop.*, 20, 5B, 1651-1659.
- DERRY D.M., MORROW E., SADRE M. et FLATTERY K.V. (1972). "Brown and white fat during the life of the rabbit". *Develop. Biol.*, 27, 204.
- DESAI K.S., LI K.C. and ANGEL A. (1973). "Bimodal effect of insulin on hormone-stimulated lipolysis : relation to intracellular 3' : 5' - Cyclic adenylic acid and free fatty levels". *J. Lipid. Res.*, 14, 647-655.
- DESBALS B. (1967). "Rôles respectifs des hormones surrénaliennes et hypophysaires dans la détermination des troubles entraînés par la surrénalectomie chez le lapin". Thèse de Doctorat ès Sciences, Toulouse.
- DESBALS B., AGID R. et DESBALS P. (1967). "Suppression par l'hypophysectomie préalable de certains troubles métaboliques entraînés par la surrénalectomie chez le lapin". *C.R. Soc. Biol.*, 161, 926-930.
- DESBALS B., DESBALS P. et AGID R. (1965). "Modifications du métabolisme des lipides et des glucides entraînés par la surrénalectomie chez le lapin". *C.R. Acad. Sci. Paris*, 260, 6433-6435.
- DESBALS B., DESBALS P. and AGID R. (1970a). "Pituitary-adrenal control of fat mobilization in Rabbit". In : *Adipose Tissue. Regulation and metabolic functions*. Ed. JEANRENAUD B. and HEPP D. *Hormone and Metabolic Research, Sup. 2*, 28-31.
- DESBALS P., MIALHE P. and DESBALS B. (1970b). "Sensitivity of avian adipose tissue to lipolytic hormones". *Diabetologia*, 6, 625.
- DESBALS B., PEJON C. et DESBALS P. (1971). "Lipolyse de cellules adipeuses isolées de lapin : rôles respectifs des catécholamines, de l'ACTH et de l'hydrocortisone ; influence de la surrénalectomie". *C.R. Soc. Biol.*, 165, 642-648.

- DESBALS P. (1963). "Effets respectifs de la surrénalectomie et du pentobarbital sur la circulation des glucides chez le lapin". Thèse de 3ème Cycle, Toulouse.
- DIAMOND L., Mc FALL R., TASHIRO Y. and SABATINI D. (1973). "The WIRL - 3 Rat liver cell lines and their transformed derivatives". *Cancer Research*, 33, 2627-2636.
- DICKSON A.J. and POGSON C.L. (1977). "The metabolic integrity of hepatocytes in sustained incubations". *FEBS Letters*, 83, n° 1, 27-32.
- DI GIROLAMO M. and RUDMAN D. (1966). "Species differences in glucose metabolism and insulin responsiveness of adipose tissue". *Amer. J. Physiol.*, 210, 721-727.
- DOLE V.P. and MCINERTZ H. (1960). "Micro-determination of long chain fatty acids in plasma and tissues". *J. Biol. Chem.*, 235, 2595-2599.
- DONEV S., HRISTOVA T. and ZAFROVA M. (1978). "Degree differences in beta-granulation of rat Langerhans' islets". *Med. Biol. Probl.*, 6, 21-31.
- DUBINSKY W.P. and COCKRELL R.S. (1974). "Respiratory control and mitochondrial monovalent cation permeability of isolated liver cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56, 415-422.
- DUFF G.L. (1936). "The nature of experimental cholesterol arteriosclerosis in the rabbit". *Arch. Path. U.S.A.*, 22, 161.
- EDWARDS A.M. and ELLIOTT W.H. (1974). "Induction of δ -Aminolevulinic Acid Synthetase in Isolated Rat Liver Cell suspensions". *Journal of Biological Chemistry*, 249, 3, 851-855.
- EFFENDIC S. and OSTMAN J. (1970). "Catecholamines and metabolism of human adipose tissue. IV. Influence of glucose on catecholamine - induced lipolysis in human omental adipose tissue in vitro". *Acta Med. Scand.*, 187, 485-491.
- EKMAN C.A. and HOLMGREN H. (1949). "The effect of alimentary factors on liver glycogen rhythm and the distribution of glycogen in the liver lobule". *Anat. Rec.*, 104, 189-216.
- ELCHINGER G., DESBALS B., DESBALS P., PEJOAN C. (1976). "Effets de l'hypophysectomie sur la circulation des lipides et des glucides chez le lapin". *J. Physiol.*, 72, 553-565.
- EL MANOUBI L., CALLIKAN S., DUEE P.H., FERRE P. and GRARD J. (1983). "Development of gluconeogenesis in isolated hepatocytes from the rabbit". *The American Physiological Society*, 244, *Endocrinol Metab.* 7, 24-30.
- EL MANOUBI L. (1981). "Développement et régulation de la gluconéogenèse et de la cétogénèse dans les hépatocytes de Rat et de Lapin". Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, 1981, présentée à l'Univ. Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- ENGEL F.L. (1961). "Extra adrenal actions of adrenocorticotropin". *Vitamins and Hormones*, 19, 189-205.
- ENGEL F.L. and LEBOWITZ H.E. (1966). "Extra target organ actions of anterior pituitary hormones". In : *The pituitary gland*, edited by HARRIS and DONOVAN. Butterworths, London, 2, 563-588.
- ENTENMAN C., LORENZ F.W. and CHAIKOFF U. (1940). "The lipid content of blood, liver, and yolk sac of the newly hatched chick and the changes that occur in these tissues during the first month of life". *J. Biol. Chim.*, 133, 231-241.
- FAIN J.N., SCOW R.O., URGOTTI E.J. and CHERNICK S.S. (1965). "Effect of insulin on fatty acid synthesis in vivo and in vitro in Pancreatectomized Rats". *Endocrinology*, 77, 137-147.

- FAIN J.N. and SHEPHERD R.E. (1975). "Free fatty acids as feedback regulators of adenylate cyclase and cyclic 3'-5' - AMP accumulation in rat fat cells". J. Biol. Chem., USA, 250, 6586-6592.
- FAIN J.N. and SHEPHERD R.E. (1976). "Inhibition of adenosine 3'-5' - monophosphate accumulation in white fat cells by short chain fatty acids, lactate and beta hydroxybutyrate". J. Lip. Res., 17, 377-385.
- FEINBERG S.M., FEINBERG A.R., REBHUM J. and MALKIEL S. (1954). "Liberation and depletion of histamines from human skin ; comparison of effects of specific antigens and neuro histamine liberation". Quart. Bull. Northwestern Univ. M. School, 28, 246-251.
- FAULHABER J.D., PETRUZZI E.N., EBLE H. and DITSCHUNEIT H. (1969). "In vitro untersuchungen über den fettstoffwechsel isolierter menschlicher fettzellen in abhängigkeit von der zellgröße. Die durch adrenalin induzierte lipolyse". Horm. Metab. Res., 1, 80-86.
- FAURE J., VINCENT J.D. et BENSCH C. (1966). "Sur des relations observées entre sommeil, rythmes alimentaires et état hormonal". Cahiers de Nutrition et de Diététique, 1, 19-32.
- FELTS J.M. and BERRY M.N. (1971). "The metabolism of free fatty acids and chylomicron triglyceride fatty acids by isolated rat liver cells". Biochemica et Biophysica, Acta, 231, 1-7.
- FLATT J.P. (1970a). "Conversion of carbohydrate to fat in adipose tissue: an energy - yielding and, therefore, self-limiting process". J. Lipid. Res., 11, 131-143.
- FLATT J.B. and BALL E.G. (1964). "Studies on the metabolism of adipose tissue. XV an evaluation of the major pathways of glucose catabolism as influenced by insulin and epinephrine". J. Biol. Chem., 239, 675.
- FLEURET P.J. (1953). "La production du foie gras de volaille destinée à la consommation". Ann. Nutr. Aliment., 7, 97-124.
- FOLCH J., LEES M. and STANLEY G.H.H. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues". J. Biol. Chem., 226, 497-509.
- FONTAINE M. et CALLAMANDRE O. (1953). "Le foie gras chez les Poecilothermes". In : Colloque C.N.R.S. : sur la physiologie, la pathologie, la chimie et la cytologie des foies gras.
- FONTY G., GOUET Ph. et RIOU Y. (1979). "Effect of milk composition on the gastro-intestinal microflora of artificially reared young rabbits". Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 19, 3A, 567-571.
- FOSTER D.W. and KATZ J. (1966). "The distribution of tritium in fatty acids synthesized from tritiated glucose and tritiated water rat adipose tissue". Biochim. Biophys. Acta, 125, 422-427.
- FREEDLAND R.A., SZEPESI B. (1971). "Control of enzyme activity nutritional factors". In : Enzyme synthesis and degradation in mammalian systems. Ed. RECHCIGL M. Jr., Karger, Basel, 103-140.
- FULLER R.W. (1971). "Rhythmic changes in enzyme activity and their control". In : Enzyme synthesis and degradation in mammalian systems. Ed. RECHCIGL M. Jr., Karger, Basel, 311-348.
- FULLER R.W. and DILLER E.R. (1970). "Diurnal variation of liver glycogen and plasma free fatty acids in rats fed ad libitum or single daily meal". Metabolism, 19, 226-229.
- GALLAI-HATCHARD J.J. and GRAY G.M. (1971). "A method of obtaining a suspension of intact parenchymal cells from adult rat liver". J. Cell. Sci., 8, 73-86.

- GALLOUIN F. (1972). "Contribution à l'étude du comportement alimentaire. Données sur les limites d'utilisation des recherches chez le lapin". Thèse de Doctorat en Biologie Humaine, Bordeaux, Fac. de Médecine, 1972, n° 3, 105 p., 138 ref.
- GALLOUIN F. (1983). "Le comportement de Caecotrophie chez le lapin". *Cuni Sciences*, 1,2, 1-22.
- GALLOUIN F., DEMAUX G., LE BARS H. (1978). "Le comportement de Caecotrophie du lapin". *Cuniculture* 5 (5^a), 193-198.
- GALLOUIN F., DEMAUX G., LE BARS H. (1979). "Déterminisme de la dualité de l'excrétion fécale chez le lapin : effets de l'ablation totale du colon proximal". *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19(38), 975-981.
- GARRISON J.C. and HAYNES R.C. Jr. (1973). "Hormonal control of glycogenolysis and Gluconeogenesis in isolated rat liver cells". *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 248, n° 15, 5333-5343.
- GEISELMAN P.J., MARTIN JR., VANDER WEELE D.A. and NOVIN D. (1980). "Multivariate analysis of meal patterning in intact and vagotomized rabbits". *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 94(2), 388-399.
- GINGELL D., GARROD D.R. and PALMER J.F. (1970). "Divalent cations and cell adhesion" IN "Calcium and Cellular Function" (A.W. Cuthber, ed.), Mac Millan, London, 59-64.
- GIRARD JR., FERRE P., CALLIKAN S., LETURQUE A. and PEGORIER J.P. (1980). "Influence of nutrients in metabolic adaptation of the new born". In : "Child Health Strategies" (Towkin, R.S., ed.), Alpine Press, Vancouver, Canada.
- GIRARD J., PINTADO E. and FERRE P. (1979). "Fuel metabolism in the mammalian fetus". *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 19, 181-197.
- GROD C. (1960). "Variations pondérales et morphologiques de la surrénale du lapin en fonction de l'âge et du sexe". *C.R. Soc. Biol.*, 154, 1546-1550.
- GLIEMANN J. (1968). "Glucose metabolism and response to insulin of isolated fat cells and epididymal fat pads". *Acta. Physiol. Scand.*, 72, 481-491.
- GOLD R.M., SUMPRER G., UEBERACHER H.M. and KAPTOS G. (1975). "Hypothalamic hyperphagia despite imposed diurnal or nocturnal feeding and drinking rhythms". *Physiol. Behav.*, 14, 861-865.
- GOMEZ-CAPILLA J.A., MACARULLA J.M., MARTIN-ANDRES A. and OSORIO C. (1975). "Evolution de los lipidos hepaticos durante el periodo embrionario y posnatal del Gallus domesticus". *Revista Española de Fisiología*, 31, 177-182.
- GOOD Br. C.A., KRAMER H. and SOMOGYI M. (1933). "The determination of glycogen". From the Laboratory of the Jeinth Hospital of St Louis, St Louis, 485-491, Sep. 1933.
- GOODMAN D.S. (1958). "The interaction of human serum albumin with long chain fatty acid anions". *J. Am. Soc.*, 80, 3892-3898.
- GOODRIDGE A.G. and BALL E.G. (1967). "Lipogenesis in the pigeon : in vivo studies". *Am. J. Physiol.*, 213, 245-249.
- GORMAN R.R., TEPPERMAN H.M. and TEPPERMAN J. (1973). "Epinephrine bindings and the selective restoration of adenylate cyclase activity in fat fed rats". *J. Lip. Res.*, 14, 279-285.

- **GOUET Ph. et FONTY G. (1979).** "Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from Birth until adulthood". *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19, 3A, 553-566.
- **GREENGARD O., FEDERMAN M. et KNOX W.E. (1972).** "Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymatic differentiation". *J. Cell. Biol.*, 52, 262-271.
- **GRIFE G.A. (1970).** "Hormonal control of human adipose tissue metabolism in vivo". *Horm. Metab. Res. Suppl.* 2, 167-171.
- **GUIBE I. et THREAU M. (1977).** "Les batraciens". P.U.F., 126 p.
- **GUILLAUME J. (1975).** "Recherches sur les caractéristiques nutritionnelles et métaboliques du Poussin nain d'W" Thèse Sc. Nat. Tours, 110 p.
- **HAIN P. and NOVAK M. (1975).** "Development of brown and white adipose tissue". *J. Lip. Res.*, 16, 79.
- **HALESTRAP A.P. and DENTON R.M. (1974).** "Specific inhibition of pyruvate transport in rat liver mitochondria and human erythrocytes by α - Cyano 4 - hydroxycinnamate". *Biochem. J.*, 138, 313-316.
- **HAMMAR I.A. (1932).** "Über wachstum un RÜchgang, über standardisierung, individualisierung, und banliche individualtypen in laufe des normalen Postfütallebens". *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 29, 1-536.
- **HANSON R.W., FISCHER L., BALLARD F.J. and RESHEF L. (1973).** "The regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in fetal rat liver". *Enzyme*, 15, 97-110.
- **HARRIS R.A. (1975).** "Studies on the inhibition of hepatic lipogenesis by N⁶, O² - Dibutyryl Adenosine 3', 5' - Monophosphate". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 169, 168-180.
- **HARRISON M.F. (1953).** "Effect of starvation on the composition of the liver cell". *Biochemical Journal*. Vol. 55, 204-210.
- **HARTROFT W.S., PORTA E.A. and SWGTKA G. (1969).** "Biochemical and clinical aspects of alcohol metabolism". In : *Biochemical and Clinical aspects of alcohol metabolism, 1969*, SARDESAI V.M. ed., p. 161, C.C. THOMAS, Springfield.
- **HAUS E. and HALBERG F. (1966).** "Persisting circadian rhythm in hepatic glycogen of mice during inanition and dehydration". *Experientia*, 22, 113-114.
- **HAVEL R.J. (1974).** "Lipid transport and the availability of insulin". In : *Lipid metabolism, obesity and diabetes mellitus : impact upon atherosclerosis*, 51-53. Ed. GRETEN H., LEVINE R., PFEIFFER E.F. and RENOLD A.E. Georg. Thieme Stuttgart.
- **HAYNES R.C., GARRISON J.C. and YAMAZAKI R.K. (1974).** "Comparison of effects of glucagon and valinomycin on rat liver mitochondria and cells". *Mol. Pharmacol.*, 10, 381-388.
- **HENNING S.J., HIRD F.J.R. (1972).** "Diurnal variations in the concentration of volatile fatty acids in the alimentary tracts of wild rabbits". *Brit. J. Nutr.*, 27, 57-64.
- **HO R.J., ENGLAND R. and MENG H.C. (1970).** "Effect of glucose on lipolysis and energy metabolism in fat cells". *Life Sci.*, 9, 137-150.
- **HOLLENBERG C.H., RABEN M.S. and ASTWOOD E.S. (1961).** "The lipolytic response to corticotropin". *Endocrinology*, 68, 589-593.

- HOLLER M. and BREUER H. (1974). "Metabolism of [4-¹⁴C] Oestrone in the isolated, hemoglobin - Free perfused rat liver : comparative studies at 28°C and 37°C". Hoppe. Seyler's Z. Physiol. Chem., 355, 1208-1209.
- HOOD R.J., THOMPSON E.H. and ALLEN C.E. (1972). "The role of acetate, propionate, and glucose as substrates for lipogenesis in bovine tissue". Int. J. Biochem., 3, 598-606.
- HORINO M., MACHLIN L.J., HERTELENDY F., KIPNIS D.M. (1968). "Effect of short chain fatty acids on plasma insulin in ruminant and non ruminant species". Endocrinology, 83, 118-128.
- HORNICKE H., BATSCH F. (1977). "Coecotrophy in Rabbits - A circadian function". J. Mamm., 58, 2, 240-242.
- HORNICKE H., DIETZEL F., AIGNER E., SCHULTE R. (1976). "Alimentary behaviour in rabbits under different influences". 1er Congrès international Cunicole. Dijon (France) A.S.F.C. Communication, n° 13, p. 4.
- HOWARD R.B. and PESCH L.A. (1968). "Respiratory activity of intact isolated parenchymal cells from rat liver". J. Biol. Chem., 243, 3105-3109.
- HOWARD R.B., LEE J.C. and PESCH L.A. (1973). "The fine structure, potassium content, and respiratory activity of isolated rat liver parenchymal cells prepared by improved enzymatic techniques". J. Cell. Biol., 57, 642-65E.
- IRACHOVIC J. (1956). "Sur les allométries de croissance de divers organes et tressus chez le lapin". C.R. Acad. Sci. Paris, 242, 171-174 et 299-301.
- HUDSON D.G. and HULL D. (1975). "Growth of adipose tissue in the fetal rabbit". Biol. Neonate, 27, 71-79, 1975.
- HULL D. and SEGAL M.M. (1965). "The contribution of brown adipose tissue to eat production in the new born rabbit". J. Physiol., 181.
- IMAI H., KIMURA H. and MAEDA T. (1982). "A stable and simple method of FAGLUPAGAS fixation for catecholamines for routine examination". Acta Histochem. Cytochem., 15, 6, 798-806.
- INGEBRETSEN W.R. Jr. and WAGLE S.R. (1972). "A rapid method for the isolation of large quantities of rat liver parenchymal cells with high anabolic rates". Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 47, n° 2, 403-410.
- INGLE D.J., BAUMAN D.E., GARRIGUS U.S. (1972a). "Lipogenesis in the ruminant : in vitro study of tissue sites, carbon source and reducing equivalent generation for fatty acid synthesis". J. Nutr., 102, 609-616.
- INGLE D.J., BAUMAN D.E. and GARRIGUS U.S. (1972b). "Lipogenesis in the ruminant : in vivo site of fatty acid synthesis in sheep". J. Nutr., 102, 617-624.
- IYPE P.T. (1972). "Cultures from adult rat liver cells. I. Establishment of monolayer cell. Cultures from normal liver". J. Cell. Physiol., 78, 281-288.
- JACOBSSON B., HOLM G., BJORNTORP P. and SMITH U. (1976). "Influence of cell size on the effects of insulin and noradrenalin of human adipose tissue". Diabetologia, 12, 69-72.
- JACOBSSON B. and SMITH U. (1972). "Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells". J. Lipid. Res., 13, 651-656.

- JANSEN G.R., ZANETTI M.E. and HUTCHISON C.F. (1966). "Studies on lipogenesis in vivo. Fatty acid and cholesterol synthesis during starvation and refeeding". *Biochem. J.*, 101, 811-818.
- JEANRENAUD B. (1967). "Effect of glucocorticoid hormones on fatty acid mobilization and re-esterification in rat adipose tissue". *Biochem. J.*, 103, 627-633.
- JILGE B. (1980a). "The effect of two different light intensities on the phase angle difference and spontaneous period of the rabbit". *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, 12, 41-55
- JILGE B. (1980b). "The response of the caecotrophy rhythm of the rabbit to single light signals". *Lab. Anim.*, 14, 3-5.
- JILGE B. (1983). "The entrainment of the circadian caecotrophy rhythm with different light dark time ratios". *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 14, 1, 1-20.
- JOHNSON M.E.M., DAS N.M., BUTCHER F.R. and FAIN J.N. (1972). "The regulation of gluconeogenesis in isolated rat liver cells by glucagon, insulin, Dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, and fatty acids". *J. Biol. Chem.*, 247, 3229-3235.
- JOHNSON F., METCALF P. et BAKER J. (1982). "Fructosamine : a new approach for the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control". *Clin. Chim. Acta*, 127, 87-95.
- JOLIVET E., REYNE Y., TEYSSIER J. (1983). "Approche méthodologique de la répartition nyctémérale des prises d'aliment chez le lapin domestique en croissance". *Reprod. Nutr. Develop.*, 23, 13-24.
- JUNGAS R.L. (1968). "Fatty acid synthesis in adipose tissue incubated in tritiated water". *Biochemistry*, vol. 7, n° 10, 3708-3717.
- JUNGAS R.L. and BALL E.G. (1963). "Studies on the metabolism of adipose tissue. XII. The effects of insulin and epinephrin on free fatty acid and glycerol production in the presence and absence of glucose". *Biochemistry*, 2, 383-388.
- JUNGAS R.L. and BALL E.G. (1964). "Studies on the metabolism of adipose tissue. XVII. In vitro effects of insulin upon the metabolism of the carbohydrate and triglyceride stores in adipose tissue from fasted - refed rats". *Biochemistry*, 3, 1696-1701.
- KATSUTA H., TAKAOKA T., DOISA Y. and KUROKI T. (1965). "Carcinogenesis in tissue culture VII. Morphological Transformation of rat liver cells in NAGISA Culture". *Japan J. Exp. Med.*, Vol. 35, 6, 513-544.
- KAYSER Ch. (1955). "Réactions de l'homéotherme au stimulus froid. In : le comportement des homéothermes vis à vis du stimulus froid". *Colloques nationaux du C.N.R.S., Strasbourg*, C.5.
- KENNEY F.T. (1970). "Hormonal regulation of synthesis of liver enzymes". In : *Mammalian protein metabolism*. ed. MUNRO H.N., Academic Press, N.Y., London, Vol. IV, 131-176.
- KIBLER H.H., BERGMAN A.J. and TURNER C.W. (1943). "Relation of certain endocrine glands to body weight in growing and mature New Zealand white rabbits". *Endocrinology*, 33, 250-256.
- KHOO J.C., STEINBERG D. and LEE E.Y.C. (1974). "Activation of chicken adipose tissue triglyceride lipase by cyclic AMP dependant protein kinase and its desactivation by purified protein phosphatase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 418.
- KREBS H.A., CORNELL N.W., LUND P. and HEMS R. (1973). "Isolated liver cells as experimental materials". In *Alfred Benzon Symp. 6. Copenhagen*, LUNDQUIST F. and TYGSTRUP N., p. 726-750.

- KREBS H.A. and EGGLESTON L.V. (1965). "The role of pyruvate kinase in the regulation of gluconeogenesis". *Biochem. J.*, 94, 3c-4c.
- KRUSE P.F. Jr. and PATTERSON I.M.K. (1973). "Methods and applications". Eds 1973 : In *Tissue Culture*. Academic Press. New-York.
- KUMON A., HARA T. and TAKAHASHI A. (1976b). "Effects of catecholamines on the lipolysis of two kinds of fat cells from adult rabbit". *J. Lipid. Res.*, 17, 559-564.
- LABADIE M. (1985). "Dosage des protéines sériques glycosylées par le nitro-bleu de tétrazolium". *Feuillets de Biologie*, Vol. XXVI, 147, 65-68.
- LABADIE M., VINCENT G. et LACROIX A. (1985). "Dosage des protéines glycosylées du sérum sanguin (test "fructosamine") chez les sujets normo ou hyperglycémiques". *Presse Méd.*, 14, 696.
- LAFONTAN M. (1979). "Mise en évidence d'une réceptivité alpha-adrénergique inhibitrice de la lipolyse. Intervention de l'ACTH dans la mobilisation lipidique chez le lapin". Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences naturelles présentée à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.
- LAFONTAN M. et BERLAN M. (1978). "Absence d'action lipolytique de l'adrénaline sur un tissu adipeux sous-cutané humain. Rôle des récepteurs alpha-adrénergiques". *C.R. Acad. Sc. Paris*, 286, D., 1593-1596.
- LAKATUA D.J., HAUS E. and HALBERG F. (1974). "Habitual circadian timing of growth hormone (STH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), insulin, cortisol and glucose in human serum". In : *Chronobiological Aspects of Endocrinology*, edited by J. Aschoff, F. Ceresa and F. Halberg. Stuttgart : F.K. Schattauer. Verlag, 185-192.
- LAMELIN J.P., ORCEL L., BOIVIN P. et FAUVERT R. (1965). "Etude chimique et biologique de 25 cas de stéatose hépatique éthylique". *Arch. Med. App. Digest.*, 54, (s7-8), 737-778.
- LAPLACE J.P. (1978). "Le transit digestif chez les monogastriques. III. Comportement (prise de nourriture, caecotrophie), motricité et transit digestifs, et pathogénie des diarrhées chez le lapin". *Ann. Zootech.*, 27, 2, 225-265.
- LAPLACE J.P. et LEBAS F. (1975). "Le transit digestif chez le lapin. 3. Influence de l'heure et du mode d'administration sur l'excrétion fécale du Cérium 141 chez le lapin alimenté ad libitum". *Ann. Zootech.*, 24, 255-265.
- LAPLACE J.P., LEBAS F., RIOPEREZ J. (1974). "Le transit digestif chez le lapin. 1) Utilisation du Cérium 141 : étude méthodologique et descriptive". *Ann. Zootech.*, 23, 555-576.
- LAPLACE J.P., LEBAS F., RIOPEREZ J. (1975). "Le transit digestif chez le lapin. 2. Répartition de la radioactivité après ingestion d'aliment marqué au Cérium 141". *Ann. Zootech.*, 24, 59-69.
- LARDY H.A., PAETKAU V. and WALTER P. (1965). "Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis : the role of mitochondria in supplying precursors of phosphoenolpyruvate". *Proc. of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 53, 1410-1415.
- LEBAS F. (1969a). "Alimentation lactée et croissance pondérale du lapin avant sevrage". *Ann. Zootech.*, 18, 197-208.
- LEBAS F. (1969b). "L'alimentation du lapin". *L'alimentation et la vie*, 57, 245-268.
- LEBAS F. (1971). "Nombre de postes de consommation pour les groupes de lapins en croissance". *Bull. Tech. Inf. Ingrs. Servs. Agric.*, 26, 561-564.

- **LEBAS F. (1971b)**. "Composition chimique du lait de lapine, évolution au cours de la traite et en fonction du stade de lactation". *Ann. Zootech.*, 20, 2, 185-191.
- **LEBAS F., BESANCON P. et ABOUYOUB A. (1971a)**. "Composition minérale du lait de lapine. Variations en fonction du stade de lactation". *Ann. Zootech.*, 20, 4, 487-495.
- **LEBOWITZ H.E. and ENGEL F.L. (1965)**. "In vivo and in vitro adipogenic effects of corticotropin and related peptides". In : *Handbook of Physiology : Adipose tissue*. Edited by : **RENOLD and CAHILL**. Amer. Physiol. Soc. Washington D.C., p. 541.
- **LECLERCQ B., DURAND G., DELPECH P. et BLUM J.C. (1968)**. "Note préliminaire sur l'évolution des constituants biochimiques du foie au cours du gavage de l'oie". *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 8, 549-556.
- **LEEVY C.M. (1962)**. "Fatty liver : a study of 270 patients with biopsy proved fatty and a review of the literature". *Medicine*, 41, 249-276.
- **LEFFERT H.L. and PAUL D. (1972)**. "Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells". *J. Cell. Biol.* 52, 559-568.
- **LE GOFF D., MICHOUDET C., MARGUIE G. (1977)**. "Mise en évidence "d'un foie gras physiologique" chez le poussin "Lohmann" à l'éclosion". *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord, Alger*, 68(3-4), 19-26.
- **LE MAGNEN J. and DEVOS M. (1970)**. "Metabolic correlates of the meal onset in the free food intake of rats". *Physiol. Behav.*, 5, 805-814.
- **LE MAGNEN J., DEVOS M., GAUDILLIERE J.P., LOUIS-SYLVESTRE J. and TALLON S. (1973)**. "Role of a lipostatic mechanism in regulation by feeding of energy balance in rats". *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 84, 1-23.
- **LE MAGNEN J. et TALLON S. (1966)**. "La périodicité spontanée de la prise d'aliments ad libitum du rat blanc". *J. Physiol. Paris*, 58, 323-349.
- **LEUNG T.T. and BAUMAN D.E. (1975)**. "In vivo studies of the site of fatty acid synthesis in the rabbit". *J. Biochem.*, 6, 801.
- **LEVEILLE G.A. (1967)**. "In vivo fatty acid synthesis in adipose tissue and liver of meal-fed rats". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125, 85-88.
- **LIEBER C.S. and SCHMID R. (1961)**. "The effect of ethanol on fatty acid metabolism ; stimulation of hepatic fatty acid synthesis in vitro". *J. Clin. Invest.*, 40, 394-399.
- **LIEBER C.S., SPRITZ N. and DE CARLI L.M. (1966)**. "Role of dietary, adipose, and endogenously synthesised fatty acids in the pathogenesis of the alcoholic fatty liver". *J. Clin. Invest.*, 45, 51-62.
- **LLOYD D. and MARPLES J. (1984)**. "Simple colorimetry of glycated serum protein in a centrifugal analyzer". *Clin. Chem.*, 30, 1686-1688.
- **LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., SARR A.L., RANDALL R.J. (1951)**. "Proteins measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- **LUCKEY T.D., MENDE T.J. and PLEASANT J. (1954)**. "The physical and chemical characterization of rat milk". *J. Nutr.*, 54, 345-359.
- **MAILLARD L.C. (1912)**. "Action des acides aminés sur les sucres ; formation des mélanoidines par voie méthodique". *C.R. Acad. Sc.*, 154, 66-68.

- MALGIERI J.A., SHEPHERD R.E. and FAIN J.N. (1975). "Lack of feedback regulation of cyclic 3':5' - AMP accumulation by free acids in chicken fat cells". J. Biol. Chem., 250, 6593-6598.
- MANNES J.G., BODA J.M., WILLES R.F. (1967). "Probable role of propionate and butyrate in control of insulin secretion in sheep". Amer. J. Physiol., 212, 756-764.
- MARQUIE G. et AGID R. (1968). "Effets inhibiteurs d'un biguanide antidiabétique, le NN-diméthylbiguanide sur les perturbations lipidiques entraînées par l'administration de cholestérol chez le lapin". C.R. Acad. Sc. Paris, 266D, 2465-2468.
- MARTIN G. (1979). "Contribution à l'étude de la néoglucogénèse dans les cellules isolées de foie de lapin". Thèse de 3ème Cycle. Univ. Claude Bernard de Lyon.
- MASORO E.J., CHAIKOFF I.L. and DAUBEN W.G. (1949). "Lipogenesis from glucose in the normal and liverless animal as studied with ¹⁴C labeled glucose". J. Biol. Chem., 179, 1117-1125.
- Mc CANCE R.A. and WIDDOWSON E.M. (1977). "Fat". *Pediat. Res.*, 11, 1081-1083.
- MEHLMAN M.A. and HANSON R.W. (1972). "The role of membranes in metabolic regulation". Academic Press, New-York.
- MICHOUDET C., LE GOFF D. et MARQUIE G. (1978). "Evolution de certains paramètres biochimiques chez le poussin". J. Physiol., 74, 7, 19A.
- MILLBRADT W. (1930). "Lipämie Studien" *Bioch. Z.*, 223, 278.
- MODJANOVA E.A. and MALENKOV A.G. (1973). "Alteration of properties of cell contacts during progression of hepatomas" *Experimental Cell Research*, 76, 305-314.
- MONNIER M. et DESBALS B. (1985). "Dosage radioimmunologique de l'ACTH chez le lapin : relations stress - ACTH - Corticostéroïdes et diarrhées". *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 25, 6, 1017-1028.
- MOROT Ch. (1882). "Recherches expérimentales sur la nature et l'origine des pelotes stomacales des lapins domestiques". *Mém. Soc. Centrale de Med. Vét.*, 12, 139-239.
- MORTIMORE G.E. (1961). "Effect of insulin on potassium transfer in isolated rat liver". *Amer. J. Physiol.*, 200, 1315.
- MOSCOVA A., TROWELL O.A. and WILLMER E.N. (1965). "Methods, Biology and Physiology". In "Cells and Tissues in Culture" (E.N. WILLMER, ed.), Vol. 1, 19-98, Academic Press, New-York.
- MURURI K.L. and LEVILLÉ G.A. (1970). "In vitro fatty acid synthesis and enzyme activity in liver and adipose tissue of the mouse". *Int. J. Biochem.*, 1, 254-256.
- MURTHY L., HAROLD G. and PETERIN G.G. (1969). "A comparison of some biochemical properties of dissociated liver cells and slices". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132, 931-935.
- MYERS K. (1955). "Coprophagy in the european rabbit (*Cuniculus caryacanthus*) in Australia". *Austr. J. of Zool.*, 3, 336-345.
- NAITO C. and OKADA K. (1975). "Effect of glucose on lipolysis and on release of lipolytic products in isolated adipocytes". *Am. J. Physiol.*, 228, 92-97.
- NELSON N. (1944). "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose". *J. Biol. Chem.*, 153, 375.

- NILSSON A., SUNDLER R. and ÅKESSON B. (1973). "Biosynthesis of fatty acids and cholesterol in isolated rat-liver parenchymal cells. Effect of albumin-bound fatty acids". *Eur. J. Biochem.* 39, 613-620.
- NILSSON O.A., SUNDLER R. and ÅKESSON B. (1974). "Effect of different albumin-bound fatty acids on fatty ACJD and cholesterol biosynthesis in rat hepatocytes". *LEBS Letters*, 45, 282-285.
- ODIEVRE (1973). "Le foie métabolique aigu du nourrisson". *Arch. Franç. Pédiatr.*, 30, 465-467.
- O'HEA E.K. (1969). "Lipogenesis and aspect of its regulation in the liver and adipose tissue of the chicken and pig". Thèse University Illinois, p. 134.
- O'HEA E.K. and LEVELLE G.A. (1969a). "Significance of adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in the pig and the efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis". *J. Nutr.*, 99, 338-344.
- O'HEA E.K. and LEVELLE G.A. (1969b). "Influence of fasting and refeeding on lipogenesis and enzymatic activity of pig adipose tissue". *J. Nutr.*, 99, 345-352.
- O'HEA E.K. and LEVELLE G.A. (1969c). "Lipid biosynthesis and transport in the domestic chick (*Gallus domesticus*)". *Comp. Biochem. Physiol.*, 30, 149-159.
- ONTKO J.A. (1972). "Metabolism of free fatty acids in isolated liver cells - factors affecting the partition between esterification and oxidation. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 247, n° 6, 1788-1800.
- ONTKO J.A. (1973). "Effects of ethanol on the metabolism of free fatty acids in isolated liver cells". *Journal of Lipid Research*, 14, 78-86.
- OSHIRO Y., GERSCHENSON L.E. and DIPAOLO J.A. (1972). "Carcinomas from rat liver cells transformed spontaneously in culture". *Cancer Research*, 32, 877-879.
- OSTMAN J. and EFENDIC S. (1970). "Catecholamines and metabolism of human adipose tissue. II. Effect of isopropylnoradrenaline and adrenergic blocking agents on lipolysis in human omental adipose tissue in vitro". *Acta Med. Scand.*, 187, 471-476.
- PAGE J.H. and MENSCHICK W. (1932). "Destruction of cholesterol by animal organism". *J. Biol. Chem.*, 97, 359.
- PANKSEPP J. (1973). "Reanalysis of feeding patterns in the rat". *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 82, 78-94.
- PAULY J.E. and SCHEVING E. (1967). "Circadian rhythms in blood glucose and the effect of different light schedules, hypophysectomy, adrenal medullectomy and starvation". *Am. J. Anat.*, 120, 627-636.
- PEJOUAN C. (1976). "Contribution à l'étude du mécanisme d'action des hormones au niveau des adipocytes chez quelques mammifères domestiques et sauvages". Thèse es Sciences, Université de Limoges.
- PEJOUAN C. et DESBALS B. (1973). "Le contrôle hormonal de la lipolyse des cellules isolées chez quelques mammifères domestiques et sauvages". *J. Physiol., Paris*, 66, 653-666.
- PERET J., MACARE L., CHANEZ M. (1973). "Schedule of protein ingestion, nitrogen and energy utilization and circadian rhythm of hepatic glycogen, plasma corticosterone and insulin rats". *J. Nutr.*, 103, 866-874.

- **PERRET J.P., DORIER A., BIACQUES C. (1977).** "Etude de l'évolution de la nature des triglycérides du lait pendant les trois premières semaines de lactation, chez la lapine normale ou tarie précocément". *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 17(2), 153-163.
- **PETERKOFKY B. and DIEGELMANN R. (1971).** "Use of a mixture of proteinase - free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins". *Biochemistry*, 10, 6, 988-993.
- **PITTS G.C. (1943).** "A diurnal rhythm in the blood sugar of the white rat". *Am. J. Physiol.* 139, 109-116.
- **POTHOVEN M.A. and BEITZ D.C. (1973).** "Effect of adipose tissue site, animal weight, and long term fasting on lipogenesis in the bovine". *J. Nutr.*, 103, 468.
- **PRUD'HON M. (1976).** "Comportement alimentaire du lapin soumis aux températures de 10, 20 et 30°C". *Proc. 1st World's Rabbit Congr., Contrib. n° 14, Dijon.*
- **PRUD'HON M., CARLES Y., GOUSSOPOULOS J., KOEHL P.F. (1972).** "Enregistrement graphique des consommations d'aliments et liquides du lapin domestique nourri ad libitum". *Ann. Zootech.*, 21, 451-460.
- **PRUD'HON M., CHERUBIN M., CARLES Y., GOUSSOPOULOS J. (1975b).** "Effets de différents niveaux de restriction hydrique sur l'ingestion d'aliments solides par le lapin". *Ann. Zootech.*, 24, 299-310.
- **PRUD'HON M., CHERUBIN M., GOUSSOPOULOS J., CARLES Y. (1975a).** "Evolution au cours de la croissance des caractéristiques de la consommation d'aliments solides et liquides du lapin domestique nourri ad libitum". *Ann. Zootech.*, 24, 289-298.
- **QUISTORFF B., BONDESEN S. and GRUNNET N. (1973).** "Preparation and biochemical characterization of parenchymal cells from rat liver". *Biochemica et Biophysica Acta*, 320, 503-516.
- **RAMACHANDRAN J. and LEE V. (1976b).** "Divergent effect of adrenocorticotropin and melanotropin on isolated rat and rabbit adipocytes". *Biochim. Biophys. Acta*, 428, 339-346.
- **RAY P.D., FOSTER D.O. and LARDY H.A. (1966).** "Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis". *J. Biol. Chem.*, 241, 3904-3908.
- **RESHEF J. and SHAPIRO B. (1970).** "The physiological function and regulation of glycerogenesis in adipose tissue". In : *Adipose tissue, regulation and metabolism functions*, 136-142, Ed. Jeanrenaud B. and Hepp D., Georg. Thieme Verlag Stuttgart.
- **REYNE Y., PRUD'HON M., DEBICKI A.M. et GOUSSOPOULOS J. (1977).** "Caractéristiques des consommations d'aliments solide et liquide chez la lapine gestante puis allaitante nourrie ad libitum". *Ann. Zootech.*, 27, 2, 211-233.
- **REYNOLDS E.S. (1963).** "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy". *J. Cell. Biol.*, 17, 208-212.
- **RICHTER C.P. (1927).** "Animal behaviour and internal drive". *Quart. Rev. Biol.*, 2, 307-342.
- **RINGER S.J. (1890).** "Concerning experiments to test the influence of lime, sodium and potassium salts on the development of ova and growth of tadpoles". *J. Physiol.*, 11, 79-84.
- **ROBB R.C. (1928).** "On the nature of hereditary size limitation". *Brit. J. exp. Biol.*, 6, 293-324.

- **RODBELL M. (1964)**. "Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.*, 239, 375-380.
- **RODBELL M. (1965)**. "Modulation of lipolysis in adipose tissue by fatty acid concentration in fat cell". *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 131, 302-314.
- **ROSENBERG LN. (1953)**. "Adipogenetic activity of oxycel-purified corticotropin". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.)*, 82, 701-703.
- **ROSS B.D., HEMS R. and KREBS H.A. (1967)**. "The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver". *Biochem. J.*, 102, 942.
- **ROUS S. (1977)**. "Fasting and insulin regulation of the utilization of aceto-acetate for fatty acid synthesis". *Arch. Biochem. Biophys.*, 179, 328-333.
- **ROUSSEL J. (1900)**. "La morue et l'huile de foie de morue". Thèse de Pharmacie, Paris, 114 p.
- **ROUX J. (1960)**. "Contribution à l'étude des foies gras obtenus par intoxication". *Biologie Médicale*, 49, 502-568, 1960.
- **RUDMAN D., BROWN S.J. and MALKIN E. (1963)**. "Adipogenetic action of adrenocorticotropin, thyroid stimulating hormone, vasopressin, α and β melanocyte stimulating hormones, fraction H, epinephrine and norepinephrine in the rabbit, guinea pig, hamster, rat, pig and dog". *Endocrinology*, 72, 527-543.
- **RUDMAN D. and DEL RIO A.E. (1969a)**. "Responsiveness to lipolytic hormones, and inactivation of adrenocorticotropin by adipose tissue slices and free fat cells from different mammalian species". *Endocrinology*, 85, 209-213.
- **RUDMAN D. and DEL RIO A.D. (1969b)**. "Lipolytic activity of synthetic porcine secretion". *Endocrinology*, 85, 214-217.
- **RUDMAN D., DI GIROLAMO M. (1967)**. Comparative studies on the physiology of adipose tissue". *Adv. Lipid. Res.*, 5, 35-117.
- **SAGGERSON E.D. (1974)**. "Lipogenesis in rabbit isolated fat cells". *Biochem. J.*, 142, 477-482.
- **SANDERSON J.D., VANDERWEELE D.A. (1975)**. "Analysis of feeding patterns in normal and vagotomized rabbits". *Physiol. Behav.*, 15, 357-364.
- **SANTORO P. (1967)**. "Indagini su alcune caratteristiche biozootecniche del coniglio allevato per la produzione della carne". *Riv. Zootech. Agric. Vet.*, 5, 119-131.
- **SAUER F. and MAHADEVAN S. (1973)**. "Metabolite synthesis by rat liver cells and rat liver mitochondria". *Can. J. Biochem.*, 52, 1567-1580.
- **SCHIMASSEK H. (1960)**. "Möglichkeiten und Grenzen der Methodik". In *Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber*, pp. 1-10, Springer-Verlag, Berlin and New-York.
- **SCHOTZ M.C., BAKER N. and SALVATIERRA C. (1971)**. "Effect of glucose and insulin on fatty acid synthetase activity rat adipocytes". *Hoppe-Seyler's Zeit. Physiol. Chem.*, 352, 7, 885.
- **SCHREIBER G. and SCHREIBER M. (1972)**. "Protein synthesis in single cell suspensions from rat liver. I. General properties of the system and permeability of the cells for leucine and methionine". *J. Biol. Chem.*, 247, 6340-6346.

- SCHWARTZ A.G. (1974). "Protective effect of benzoflavone and estrogen against 7, 12 - Dimethylbenz (a) anthracene - and aflatoxin - induced cytotoxicity in cultured liver cells". *Cancer Research*, 34, 10-15.
- SCOTT T.W. (1971). "Ruminant lipids in biochemistry and methodology of lipids". (Ed. A.R. JOHNSON, J.B. DAVENPORT). p. 459, John WILEY and Sons.
- SCOTT D.F. and POTTER V.R. (1970). "Metabolic oscillations in lipid metabolism in rats on controlled feeding schedules". *Fedn. Proc.*, 29, 1553-1559.
- SEGLEN P.O. (1972a). "The effect of perfusate pH on respiration and glycolysis in the isolated rat liver perfused with an erythrocyte and protein free-medium". *Biochim. Biophys. Acta*, 264, 398-410.
- SEGLEN P.O. (1972b). "Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca^{2+} on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver". *Experimental Cell Research*, 74, 450-454.
- SEGLEN P.O. (1973). "Glycogen synthesis in isolated parenchymal rat liver cells". *FEBS Lett.*, 30, 25-28.
- SEGLEN P.O. (1973a). "Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion". *Experimental Cell Research*, 76, 25-30.
- SEGLEN P.O. (1973b). "Preparation of rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion". *Experimental Cell Research*, 82, 391-398.
- SEGLEN P.O. (1973c). "Glycogen synthesis in isolated parenchymal rat liver cell". *FEBS Lett.*, 30, 25-28.
- SEGLEN P.O. (1973d). "Effects of anaerobiosis, glucose, insulin and glucagon on glycogen metabolism in isolated parenchymal rat liver cells". *FEBS Lett.*, 36, 309-312.
- SEGLEN P.O. (1974a). "Autoregulation of glycolysis, respiration, gluconeogenesis and glycogen synthesis in isolated parenchymal rat liver cells under aerobic and anaerobic conditions". *Biochimica et Biophysica Acta*, 338, 317-336.
- SEGLEN P.O. (1974b). "Quantitative role of base exchange in phosphatidylethanolamine synthesis in isolated rat hepatocytes". *Abstr. Comm. 9th Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc.*, p. 430.
- SEGLEN P.O. (1974c). "Carbohydrate metabolism of isolated rat liver cells". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355, 1255.
- SEGLEN P.O. (1976). "Preparation of isolated rat liver cells". *Methods Cell. Biol.*, 13, 29-83.
- SEGLEN O. and JERVELL K.F. (1969). "A simple perfusion technique applied to glucocorticoid regulation of tryptophan oxygenase turnover and bile production in the isolated rat liver". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350, 308-316.
- SEFTER S. and HARPER E. (1970). "Collagenases". In "Methods in Enzymology" (G. Perlmán and L. Lorand, eds.), Vol. 19, 613-635, Academic Press, New-York.
- SHELLEY H.J. (1961). "Glycogen reserves and their changes at birth and in anoxia". *Brit. Med. Bull.*, 17, 137-143.
- SHIMAZU T., MATSUSHITA H. and ISHAKAWA K. (1976). "Cholinergic stimulation of the rat hypothalamus : effects on liver glycogen synthesis". *Science*, 194, 535-536.
- SHRAGO E., GLENNON J.A. and GORDON E.S. (1971). "Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues". *Metabolism*, 20, 54-61.

- SIEGEL P.S. and STUCKEY H.L. (1947). "The diurnal course of water and food intake in the normal mature rat". *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 40, 365-370.
- SMITH S. (1975). "Lipogenesis in rabbit adipose tissue". *Journal of Lipid Research*, 16, 324-331.
- SMITH U., KRAL J. and BJORNTORP P. (1974). "Influence of dietary fat and carbohydrate on the metabolism of adipocytes of different size in the rat". *Biochim. Biophys. Acta*, 337, 278-285.
- SPERRY W.M. and BRAND F.C. (1955). "Determination of total lipids in blood serum". *J. Biol. Chem.* 213, 69.
- STADTMAN T.C. (1957). "Determination of cholesterol and ergosterol by Liebermann-Buchard reaction". In : *Methods in enzymology*. Acad. Press. N.Y. ; 3, 362-368.
- STEINBERG D. and VAUGHAN M. (1965). "Release of free fatty acids from adipose tissue in vitro in relation to rate of triglyceride synthesis and degradation". In : *Handbook of Physiological*, Section 5, Adipose Tissue. Ed. RENOLD A.E. and CAHILL G.H. Jr. American Physiological Society, Washington D.C., Chap. 34, 335-347.
- SUDA M., NAGAI K. and NAKAGAWA H. (1973). "Studies on the circadian rhythms of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in rats. I. Mechanism of circadian increase in liver enzyme with special reference to hormonal and dietary effects". *J. Biochem.*, 73, 727-738.
- SUNDLER R., AKESSON B. and NILSSON A. (1973). "Triacylglycerol secretion in very low density lipoproteins by isolated rat liver parenchymal cells". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 55, 3, 961-968.
- SUNDLER R., AKESSON B. and NILSSON A. (1974). "Sources of diacylglycerols for phospholipid synthesis in rat liver". *Biochemica et Biophysica Acta*, 337, 248-254.
- SZAS M.E. (1982). "Lipogénèse des adipocytes de renard (*Vulpes vulpes*) et de blaireau (*Meles meles*) : variations saisonnières et relations avec les fonctions thyroïdienne et testiculaire". Thèse de 3ème Cycle, Univ. de Toulouse.
- TEBIBEL S. (1983). "Etude longitudinale de la distribution de taille des adipocytes chez le lapin en croissance". Thèse de 3ème Cycle, Zootechnie, Montpellier, Univ. des Sc. et Tech. du Languedoc.
- THENEN S.W. and MAYER J. (1975). "Hyperinsulinemia and fat cell glycerokinase activity in obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice". *Horm. Metab. Res.*, 8, 80-81.
- THERRIAULT D.G., HUBBARD R.W. and MELLIN D.B. (1969). "Endocrine control of fat mobilization in the isolated fat cells of cold exposed rats". *Lipids*, 4, 413-420.
- THIERY G. (1973). "Coloration permettant l'étude des coupes épaisses, leur intérêt en microscopie électronique". *J. Microscopie*, 101a, 17.
- TOLBERT M.E.M. and FAIN J.N. (1974). "Studies on the regulation of gluconeogenesis in isolated rat liver cells by epinephrine and glucagon". *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 249 n°4, 1162-1166.
- TRINDER P. (1969). "Determination of glucose in blood using glucose oxydase with an alternative oxygene acceptor". *Ann. Clin. Biochem.*, 6, 24-27.
- TROSPER T. and LEVY D. (1977). "Photocatalysed labeling of adipose plasma membranes with an aryl azide derived of glucose". *J. Biol. Chem.*, 252, 1, 181-186.

- VARMA R.R., RIEDEL D.R., KOMOROWSKI R.A., HARRINGTON G.J. and NOWAK T.V. (1970). "Le syndrome de REYE chez l'adulte". J.A.M.A. ed. française, 1, 3, 138-142.
- VAUGHAN M. (1961). "The metabolism of adipose tissue in vitro". J. Lipid Research, 2, 293-316.
- VAUGHAN M. (1962). "The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro". J. Biol. Chem., 237, 3354-3358.
- VENGE O. (1963). "The influence of nursing behaviour and milk production on early growth in rabbits". Animal Behav., 11, 500-506.
- VENGE O. (1963a). "Relationship between litter size, birth weight and growth in rabbits". Lantburkshogsk. Ann., 29, 221-239.
- VEZINHET A. (1976). "Etude du tissu adipeux chez l'agneau et le lapin après la naissance : développement, lipolyse, lipogénèse, influence de l'hypophysectomie et de l'hormone de croissance". Thèse de Sciences. Université de Montpellier.
- VEZINHET A. and PRUD'HON M. (1969). "Evolution of various adipose deposits in growing rabbit and sheep". Anim. Prod., 20, 363.
- VOLPE I.J., VAGELOS P.R. (1974). "Fatty acid synthetase of mammalian brain, liver and adipose tissue. Regulation by prosthetic group turnover". Lipids and Lipid Metab., 125, 3, 293.
- VON BAHR C., VADI H., GRUNDIN R., MOLDEUS P. and ORRENIUS S. (1974). "Spectral studies on the rapid uptake and subsequent binding of drugs to cytochrome P-450 in isolated rat liver cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, 59, 1, 334-339.
- WADKE M., BRUNENGRABER H., LOWENSTEIN I.M., DOLHON J.L. and ARSENAULT G.P. (1973). "Fatty acid synthesis by the liver perfused with deuterated and tritiated water". Biochemistry, vol. 12, 14, 2619-2624.
- WAGLE S.R. (1974). "Studies on the differential response to glucagon concentration on gluconeogenesis in isolated hepatocytes containing high and low glycogen". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 59, n° 4, 1366.
- WALKER D.G. (1965). "Development of hepatic enzymes for the phosphorylation of glucose and fructose". Advances in Enzyme Regulation, Ed. Weber G. Pergamon Press, London, 3, 163-184.
- WATSON M. (1958). "Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals". J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 475-478.
- WEATLEY D.N. (1972). "Binucleation in mammalian liver. Studies on the control of cytokinesis in vivo". Exp. Cell. Res., 74, 455-465.
- WEINBERG M. et SEGUIN P. (1976). "Evolution de la fonction collagénolytique chez les procaryotes et les eucaryotes". In : L'Evolution des protéines - Collection de Biologie évolutive 8, 105-114, 1983, Ed. Masson, Paris, N.Y., Barcelone, Milan, Mexico.
- WHITE J.E. and ENGEL F.J. (1958). "Lipolytic action of adrenocorticotropin hormone (ACTH) on the release of non esterified fatty acids from adipose tissue in vitro". J. Clin. Invest., 37, 942-948.
- WIDDOWSON E.M. (1950). "Chemical composition of newly born mammals". Nature, 166, 626-628.

- WIDDOWSON E.M. (1968). "Growth and composition of the fetus and newborn". In : "Biology of Gestation" Vol. II. The fetus and Neonate (Assali N.S. ed.), 1-49, Acad. Press. London.
- WIELAND O. (1957). "Eine enzymatische methode zur bestimmung von glycerin". Biochem. Zschr., 329, 313-319.
- WIERINGA T and KRANS H.M.J. (1978). "Reduced glucose transport in increased binding of insulin in adipocytes from diabetic and fasted rates". Biochim. Biophys. Acta, 538 3, 563-570.
- WEISBURGER T.H. (1971). "Isolation and long-term cell culture of epithelial-like cells from rat liver". Exp. Cell. Res., 69, 106-112.
- WILLIAMS G.M. and GUNN I.M. (1974). "Long-term cell culture of adult rat liver - epithelial cells". Experimental Cell Research, 89, 139-142.
- WINDMUELLER H.G. and SPAETH A.E. (1966). "Perfusion in situ with tritium oxide to measure hepatic lipogenesis and lipid secretion". The Journal of Biological Chemistry, Vol. 241, n° 12. Issue of June 25, 2891-2899.
- WINEGRAD A.I., RENOLD A.E. (1958). "Studies on rat adipose tissue in vitro. II. Effects of insulin on the metabolism of specifically labelled glucose". J. Biol. Chem., 233, 273-276.
- ZAHLTEN R.N., KNEER N.M., STRATMAN F.W. and LARDY H.A. (1974). "The influence of ammonium and calcium ions on gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes and their response to glucagon and epinephrine". Archives of Biochemistry and Biophysics, 161, 528-535.
- ZAHLTEN R.N. and STRATMAN F.W. (1974). "The isolation of hormone. Sensitive rat hepatocytes by a modified enzymatic technique". Archives of Biochemistry and Biophysics, 163, 600-608.
- ZAHLTEN R.N., STRATMAN F.W., LARDY H.A. (1973). "Regulation of glucose synthesis in Hormone-Sensitive isolated rat hepatocytes". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 70, 3213-3218.
- ZALESKI J. and JADWIGA B. (1977). "Effects of oleate, palmitate, and octanoate on gluconeogenesis in isolated rabbit liver cells". Archives of Biochemistry and Biophysics, 183, 553-562.
- ZALESKI J. and BRYLA J. (1978). "Effect of alloxan diabetes on gluconeogenesis and ureogenesis in isolated rabbit liver cells". Biochem. J., 176, 563-568.
- ZALESKI J., ZABLOCKI K. and BRYLA J. (1981). "The stimulatory effect of alloxan-diabetes. on the gluconeogenesis from alanine and glutamine in rabbit hepatocytes". Int. J. Biochem., 13, 713-720.
- ZARROW M.X., DENENBERG V.H., ANDERSON C.O. (1965). "Rabbit frequency of sulking in the pup". Sci., 150, 1835-1836.
- ZINDER O. and SHAPRO B. (1971). "Effect of cell size on epinephrine and ACTH induced fatty acid release from isolated fat cells". J. Lipid. Res., 12, 91-95.
- ZUCKER I. (1971). "Light-dark rhythms in rat eating and drinking behavior". Physiol. Behav., 6, 115-126.

OUVRAGES CONSULTÉS

- BAULIEU E.E.** : Hormones. Aspects fondamentaux et physiologiques (1978). Ed. des Sc. et des Arts (Hermann).
- CAHN T.** : La régulation des processus métaboliques de l'organisme (1956) ; Ed. P.U.F.
- GABE M.** : Techniques histologiques (1968). Ed. Masson et Cie.
- GRISHAM J.W.** : Drugs and cell cycle (1973). A.M. ZIMMERMAN, G.M. PADILLA and I.L. CAMERON eds. Academic Press, New-York.
- HARPER H.** : Précis de biochimie (1965). Collection U Armond Colin.
- KAYSER C.** : Physiologie. Historique. Fonctions de nutrition (1970). Ed. Médicales. Flammarion, Paris.
- LEHNINGUER A.L.** : Biochimie (1977). Flammarion Médecine - Sciences.
- MARTIN E. et FELDMANN G.** (1983) : Histopathologie du foie et des voies biliaires de l'adulte et de l'enfant. Masson Paris, New-York, Barcelone, Milan, Mexico, Sao-Paulo.
- RUCKEBUSCH J.** : Physiologie-pharmacologie -Thérapeutique animales(1977). Maloine S.A. Paris.

INDEX DES FIGURES

INDEX DES PLANCHES HISTOLOGIQUES

INDEX DES TABLEAUX

INDEX DES FIGURES, DES PLANCHES HISTOLOGIQUES ET DES TABLEAUX

1 - LES FIGURES

- I - Transfert de substrats lors de la néoglucogénèse et lipogénèse dans le foie.
- II - Néoglucogénèse à partir de lactate (10 mM) de l'hépatocyte isolé de lapin adulte à jeun depuis 48 heures ou nourri "ad libitum".
- III - Influence du nombre d'hépatocytes sur la lipogénèse.
- IV - Etude cinétique de l'activité lipogénique de l'hépatocyte isolé chez le lapin normal adulte à jeun depuis 48 heures ou nourri "ad libitum".
- V - Etude de la lipogénèse d'hépatocytes isolés de lapin normal adulte nourri "ad libitum". Effets de l'insuline. Nature du précurseur.
- VI - Synthèse "de novo" des acides gras à partir d'une incorporation d'eau titriée dans les hépatocytes isolés de lapin normal adulte nourri "ad libitum".
- VII - Biosynthèse de lipides totaux dans les hépatocytes isolés de lapin adulte nourri "ad libitum".
- VIII - Biosynthèse des lipides totaux dans l'hépatocyte isolé de lapin adulte. Influence de l'état nutritionnel.
- IX - Biosynthèse des lipides totaux à partir du glucose dans l'hépatocyte isolé de lapin adulte. Influence de l'insuline.
- X - Disponibilités énergétiques du foie de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Cycles circadien et circannuel.
- XI - Rythme circadien : Activité lipogénique de l'hépatocyte isolé de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline.
- XII - Activité lipogénique adipocytaire de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". (Acétate, glucose). Effets de l'insuline - Cycles circadien, circannuel.
- XIII - Cycles circadien et circannuel de l'activité lipolytique de l'adipocyte isolé du tissu adipeux périrénal de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence hormonale.
- XIV - Croissance pondérale moyenne des lapereaux entre la mise bas, le sevrage et l'âge de 60 jours.
- XV - Cycles circannuels du poids corporel et du foie. Croissance et développement.
- XVI - Cycles circannuels des réserves énergétiques hépatiques du lapereau. Croissance et développement.
- XVII - Cycles circannuels des réserves plasmatiques du lapereau. Croissance et développement.
- XVIII - Activité lipogénique des hépatocytes isolés au cours de la croissance du lapin nourri. Effets de l'insuline.
- XIX - Activité lipogénique de l'adipocyte isolé au cours de la croissance du lapin nourri. Effets de l'insuline.
- XX - Activité lipolytique de l'adipocyte isolé au cours de la croissance du lapin nourri. Influence hormonale.

2 - PLANCHES HISTOLOGIQUES

- 1 - Hépatocytes isolés de lapin normal adulte.
- 2 - Structure générale du foie de lapin.
- 3 - Structure générale du foie d'homme.
- 4 - Structure générale du foie de rat.
- 5 - Cycle circadien : Sacrifice à minuit en été (22 h.u.) - Distribution des lipides et du glycogène dans le lobule hépatique du lapin de 60 jours nourri "ad libitum".
- 6 - Cycle circadien : Sacrifice à 04 h. du matin en été (02 h.u.). Distribution des lipides et du glycogène dans le lobule hépatique du lapin de 60 jours nourri "ad libitum".
- 7 - Cycle circadien : Sacrifice en hiver à 10 h du matin (09 h.u.) et à 04 h. du matin (03 h.u.) - Répartition lipidique dans les hépatocytes de lapin de 60 jours nourri "ad libitum".
- 8 - Cycle circadien : Sacrifice à 10 h du matin en été (8 h.u.) - Distribution des lipides et du glycogène dans le lobule hépatique du lapin de 60 jours nourri "ad libitum".
- 9 - Cycle circadien : Sacrifice à 17h en été (15 h.u.) - Distribution des lipides et du glycogène dans le lobule hépatique du lapin de 60 jours nourri "ad libitum".
- 10 - Répartition des lipides dans le lobule hépatique du lapereau à la naissance, en microscopie photonique.
- 11 - Répartition du glycogène dans le lobule hépatique du lapereau à la naissance, en microscopie photonique.
- 12 - Lipide et glycogène hépatiques, en microscopie électronique.
- 13 - Structure générale du foie du lapereau de 10 jours.
- 14 - Répartition des lipides et du glycogène dans le lobule hépatique du lapereau de 10 jours, en microscopie photonique.
- 15 - Lipides et glycogène hépatiques du lapereau de 10 jours, en microscopie électronique.
- 16 - Répartition des lipides et du glycogène dans le lobule hépatique du lapereau de 20 jours, en microscopie photonique.
- 17 - Structure générale du foie du lapereau au sevrage.
- 18 - Répartition des lipides et du glycogène dans le lobule hépatique du lapereau de 28 jours (jour de sevrage), en microscopie photonique.
- 19 - Lipides et glycogène hépatiques, du lapereau de 28 jours, en microscopie électronique.
- 20 - Répartition des lipides et du glycogène dans le lobule hépatique du lapereau de 38 jours.
- 21 - Répartition des lipides et du glycogène dans le lobule hépatique du lapin de 60 jours, en microscopie photonique.

- 22 - Répartition des lipides dans le lobule hépatique du lapin adulte, en microscopie photonique.
- 23 - Ultrastructure de l'adénohypophyse de lapin surrénalectomisé : Cellules à ACTH et enveloppe fibro-conjonctive.
- 24 - Répartition des lipides dans le foie de lapin surrénalectomisé, en microscopies photonique et électronique.
- 25 - Ultrastructure d'hépatocytes et de cellules acineuses (pancréas exocrine) de lapin surrénalectomisé.
- 26 - Les cellules entérochromaffines et le réseau nerveux de l'intestin grêle de lapin surrénalectomisé.

3 - TABLEAUX

- I - Biométrie des hépatocytes et cellules de Kupffer : chez le lapin, l'homme et le rat.
- II - Comparaison du nombre d'hépatocytes, du poids sec et du poids frais des hépatocytes isolés chez des lapins nourris de la naissance à l'âge adulte.
- III - Etude cinétique de l'activité lipogénique de l'hépatocyte isolé chez le lapin normal adulte à jeun depuis 48 heures ou nourri. Précurseur : glucose ^{14}C (U).
- IV - Lipogénèse d'hépatocytes isolés de lapin normal adulte nourri "ad libitum". Effets de l'insuline. Nature du précurseur.
- V - Biosynthèse des lipides totaux dans les hépatocytes isolés de lapin adulte - Influence de l'insuline.
- VI - Cycles physiologiques au cours du nyctémère des glucides, lipides et protéines du foie et du plasma de lapins de 60 jours nourris "ad libitum".
- VII - Variations circadiennes de la lipogénèse spontanée d'hépatocytes isolés de lapins de 60 jours nourris "ad libitum" (cpm p. mg de protéines totales). Influence de l'insuline.
- VIII - Etude des variations nyctémérales et circannuelles de la lipogénèse d'adipocytes du tissu adipeux périrénal de lapins de 60 jours nourris "ad libitum". Effets de l'insuline.
- IX - Cycles circadien et circannuel de la lipolyse spontanée, de l'action du synacthène et de l'isoprotérénol, des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal de lapins de 60 jours nourris "ad libitum".
- X - Evolution des réserves énergétiques du foie et de la composition plasmatique du lapin de la naissance à l'âge adulte.
- XI - Cycles circadien et circannuel de la lipolyse spontanée, de l'action du synacthène et de l'isoprotérénol, des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal de lapins de 60 jours nourris "ad libitum".
- X - Evolution des réserves énergétiques du foie et de la composition plasmatique du lapin de la naissance à l'âge adulte.
- XI - Evolution des quantités de protéines totales ; poids secs des cellules et des lipides totaux rapportées à 10^6 hépatocytes du lapin nourri.
- XIIa-b - Variation de la lipogénèse spontanée d'hépatocytes isolés de foie de lapin nourri : de la naissance à l'âge adulte (cpm p. 10^6 cellules p. 180 min et cpm p. mg de protéines totales p. 180 min). Influence de l'insuline.
- XIII - Etude de la lipogénèse spontanée d'adipocytes isolés du tissu adipeux de lapin nourri : de la naissance à l'âge de 60 jours : influence de l'insuline (précurseurs glucose et acétate).
- XIV - Etude comparée de la lipolyse spontanée et induite des adipocytes isolés du tissu adipeux du lapin au cours du développement et croissance : de la naissance à 60 jours.
- XV - Lipolyse synacthène-dépendante de cellules adipeuses isolées de lapereaux de la naissance à l'âge de 60 jours.
- XVI - Lipolyse isoprotérénol-dépendant de cellules adipeuses isolées de lapereaux de la naissance à l'âge de 60 jours.

**

4 - TABLEAUX ANALYTIQUES

- 1 - Néoglucogénèse à partir de lactate (10 mM) de l'hépatocyte isolé de lapin adulte à jeun depuis 48 heures ou nourri "ad libitum".
- 2 - Protéines totales des hépatocytes isolés de lapin normal adulte à jeun depuis 48 heures, ou nourri "ad libitum".
- 3 - Poids secs de lipides totaux et de 10^6 hépatocytes de lapin adulte nourri "ad libitum" et à jeun depuis 48 heures.
- 4 - Influence du nombre d'hépatocytes sur la lipogénèse le lapin adulte à jeun depuis 48 heures.
- 5 - Lipogénèse et durée d'incubation des hépatocytes isolés du lapin adulte à jeun depuis 48 heures.
- 6 - Lipogénèse et durée d'incubation des hépatocytes isolés de lapin adulte nourri "ad libitum".
- 7 - Etude de la lipogénèse d'hépatocytes isolés de lapin normal adulte nourri "ad libitum". Nature du précurseur et influence de l'insuline.
- 8 - Etude de la biosynthèse de lipides totaux par les hépatocytes isolés de lapin normal adulte nourri "ad libitum". Influence de la quantité de précurseur : cas du glucose.
- 9 - Lipogénèse d'hépatocytes de lapin adulte normal nourri "ad libitum" à partir de l'eau tritiée ($^3\text{H}_2\text{O}$) - Effets de l'insuline.
- 10 - Biosynthèse des lipides totaux dans les hépatocytes isolés de lapin adulte à jeun pendant 48 heures. Influence de la nature du précurseur.
- 11 - Biosynthèse des lipides totaux à partir du glucose ^{14}C (U) dans les hépatocytes isolés de lapin normal à jeun depuis 48 heures. Effets de l'insuline.
- 12 - Biosynthèse des lipides totaux à partir du glucose ^{14}C (U) dans les hépatocytes isolés de lapin adulte nourri - Effets de l'insuline.
- 13 - Réserves énergétiques hépatiques et constituants plasmatiques chez le lapin de 60 jours nourri "ad libitum" : Sacrifice à 10 heures du matin en heure locale "jours courts" en France (heure universelle 9 h + 1 h = 10 h).
- 14 - Réserves énergétiques hépatiques et constituants plasmatiques chez le lapin de 60 jours nourri "ad libitum" : Sacrifice à 21 heure, heure locale "jours courts" en France (heure universelle 20 h + 1 h = 21 h).
- 15 - Réserves énergétiques et constituants plasmatiques chez le lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Sacrifice à 04 heures du matin (nuit), heure locale "jours courts" en France (heure universelle 3 h + 1 h = 4 h).
- 16 - Cycle circadien des réserves énergétiques et des constituants plasmatiques chez le lapin de 60 jours nourri "ad libitum", en été. Sacrifice à 10 heures du matin et à minuit, heures locales "jours longs" en France (heure universelle 8 h + 2 h = 10 h) et heure universelle 22 h + 2 h = 24 h).

- 17a - Etude de la lipogénèse spontanée d'hépatocytes isolés de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline. Variations circadiennes (lipogénèse exprimée en cpm p. 10^6 cellules p. 180 min).
- 17b - Etude de la lipogénèse spontanée d'hépatocytes isolés de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline. Variations circadiennes (lipogénèse exprimée en cpm p. mg de protéines totales).
- 17c - Cycle circadien : lipogénèse spontanée d'hépatocytes isolés de lapin de 60 jours nourri "ad libitum" (micromoles d'eau titrée incorporée dans les acides gras pendant 180 min). Influence de l'insuline.
- 18 - Cycle circadien de la lipogénèse spontanée d'adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline (1 m UI/ml). Sacrifice en été à 10 h locale et à minuit).
- 19 - Etude de la lipogénèse spontanée d'adipocytes du tissu adipeux périrénal de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline. (Jour - sacrifice à 10 h locale - Hiver).
- 20 - Etude de la lipogénèse spontanée d'adipocytes du tissu adipeux périrénal de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline (Nuit - sacrifice à 21 h locale - Hiver).
- 21 - Etude de la lipogénèse spontanée d'adipocytes du tissu adipeux périrénal de lapin de 60 jours nourri "ad libitum" - Influence de l'insuline (Nuit - sacrifice à 04 h locale - Hiver).
- 22 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal de lapin de 60 jours. Cycle circannuel.
- 23 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence hormonale. Cycles circadien et circannuel.
- 24 - Cycle circannuel des réserves énergétiques hépatiques et des constituants plasmatiques du lapereau à la naissance.
- 25 - Réserves énergétiques hépatiques et constituants plasmatiques du lapereau de 60 jours (Sacrifice en Eté).
- 26 - Cycle circannuel des réserves énergétiques hépatiques et des constituants plasmatiques du lapereau de 20 jours.
- 27 - Cycle circannuel des réserves énergétiques hépatiques et des constituants plasmatiques du lapereau de 28 jours (sevrage).
- 28 - Cycle circannuel des réserves énergétiques hépatiques et des constituants plasmatiques du lapereau de 38 jours.
- 29 - Lapins adultes : composition du foie et du plasma.
- 30 - Evolution de la quantité d'eau au niveau du foie de lapin de la naissance à l'âge adulte.
- 31-32 - Evolution des poids secs et des lipides totaux de 1 ml de suspension d'hépatocytes contenant au moins 10^6 cellules vivantes. Evolution des protéines totales de 10^6 cellules vivantes.
- 33 - Etude de la lipogénèse spontanée d'hépatocytes isolés de lapereau à la naissance. Influence de l'insuline.

- 34 - Etude de la lipogénèse spontanée d'hépatocytes isolés du lapereau de 20 jours. Influence de l'insuline.
 - 35 - Etude de la lipogénèse spontanée d'adipocytes du tissu adipeux du lapereau à la naissance. Influence de l'insuline.
 - 36 - Etude de la lipogénèse spontanée d'adipocytes du tissu adipeux périrénal du lapereau de 10 jours. Influence de l'insuline.
 - 37 - Etude de la lipogénèse spontanée d'adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 20 jours. Influence de l'insuline.
 - 38 - Etude de la lipogénèse spontanée d'adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 28 jours. Influence de l'insuline.
 - 39 - Etude de la lipogénèse spontanée d'adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 38 jours. Influence de l'insuline.
 - 40 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux du lapereau à la naissance. Influence hormonale.
 - 41 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 10 jours. Influence hormonale.
 - 42 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 20 jours. Influence hormonale.
 - 43 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 28 jours. Influence hormonale.
 - 44 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 38 jours. Influence hormonale.
- **
- XVII - Effets de la surrénalectomie sur quelques constituants plasmatiques et hépatiques chez le lapin.
 - XVIII - Lipogénèse de l'hépatocyte isolé : acides gras et lipides totaux (en cpm p. mg de protéines totales p. heure d'incubation).

TABLEAU 1 - Néoglucogénèse à partir de lactate (10 mM) de l'hépatocyte isolé de lapin adulte à jeun depuis 48 heures.

Micromoles de glucose p. g de poids sec de 10^6 hépatocytes			
Temps en minutes			
30	60	90	120
A jeun depuis 48 heures			
45	104	151	202
59	110	162	243
58	108	155	194
43	126	157	202
77	123	139	144
85	134	202	112
61 ± 7	$118^* \pm 5$	$161^* \pm 9$	$183^* \pm 19$
Nourri "ad libitum"			
29	36	52	57
24	36	54	64
20	25	40	47
24 ± 3	32 ± 1	$49^* \pm 4$	$56^* \pm 5$

[] Nombre d'animaux

() Nombre d'essais

* Valeurs significativement différentes de la valeur correspondante à 30 et 60 min au seuil de 0,05

- Production de 118 ± 5 micromoles de glucose p. g de poids sec au bout de la première heure d'incubation chez le lapin à jeun et 32 ± 1 chez l'animal nourri à partir du lactate 10 mM.

- Une augmentation de 270 % par rapport à l'animal nourri pendant la première heure d'incubation.

TABLEAU 2 - Protéines totales des hépatocytes isolés de lapin normal adulte à jeun depuis 48 heures ou nourri "ad libitum".

A JEUN [7]	NOURRIS [10]
μg de protéines totales p. 10^6 cellules	μg de protéines totales p. 10^6 cellules
312	962
327	900
332	600
355	854
407	780
337	990
379	926
	457
	754
	813
350 ± 13	$804^* \pm 53$

[] nombre d'animaux

* Valeur significativement différente de la valeur "à jeun" au seuil de 5%.

La quantité de protéines totales est diminuée d'environ 44 % lors d'un jeûne de 48 heures.

TABLEAU 3 - Poids secs et lipides totaux de 10^6 hépatocytes de lapin adulte

Poids sec de 10^6 cellules (mg)	Poids sec des lipides totaux mg p. 10^6 cellules
NOURRI "AD LIBITUM" [8]	
2,06	0,804
2,00	0,373
1,48	
4,70	0,756
3,80	0,898
2,10	0,630
4,90	0,800
3,10	0,853
$3,02 \pm 0,47$	$0,73 \pm 0,07$
A JEUN DEPUIS 48 h [6]	
0,88	0,110
0,92	0,120
0,94	0,167
0,90	0,113
0,93	0,156
0,88	0,124
$0,91^* \pm 0,01$	$0,14^\bullet \pm 0,02$

[] Nombre d'animaux

* ● Valeurs significativement différentes des valeurs d'animaux nourris (témoin) au seuil de 0,05

Les lipides totaux et le poids sec de 10^6 hépatocytes diminuent lors d'un jeûne de 48 heures.

TABLEAU 4 - Influence du nombre d'hépatocytes sur la lipogenèse chez le lapin adulte
à jeun depuis 48 Heures

Cpm p.mg de Proteines p. 180 min (15)		
0,5 10 ⁶ Cellules	0,75 10 ⁶ Cellules	1.10 ⁶ Cellules
1465		
1331	2540	4505
2045	2345	3445
831	1366	2000
1971	1686	2880
903		3351
780		1631
1831		4900
2131	2986	5115
1560	1849	
791		1432
1592	2617	3183
2234	2000	4465
1259		2517
1586		
± 1382 - 162	± 2174* - 191	± 3285*■ - 364

() Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur de 0,05 10⁶ cellules correspondante au seuil de 0,05

■ Valeur significativement différente de la valeur de 0,75 10⁶ cellules correspondante au seuil de 0,05

La lipogenèse est proportionnelle dans nos limites au nombre d'hépatocytes

TABLEAU 5 - Lipogenèse et durée d'incubation des hépatocytes isolés de lapin adulte

à jeun depuis 48 heures

Radioactivité du précurseur Glucose $^{14}\text{C}(\text{U})$ incorporée dans les lipides totaux

C pm p. 10^6 Cellules					C pm p. mg de protéines totales				
Durée d'Incubation en Minutes									
0	30	60	120	180	0	30	60	120	180
70				1026	200				2931
90				1577	257				4505
90		1170	1208	1358	257		3342	3445	3880
90			372	700	257			1082	2000
80		784	858	1008	229		2240	2451	2880
70			536	1185	260			1531	3331
80	396	420	498	571	229	1131	1200	1422	1631
80	162	442	932	1715	229	463	1262	2662	4900
80		302	816	1596	256		968	2615	5115
80		784	854	1020	245		2397	2611	3119
70		326	512	583	172		880	1257	1432
90	326	536	788	1110	257	931	1531	2251	3171
80				1176	229				3183
80				1563	229				4485
70				854	185				2517
60	294	595*	737*	1141	229	842	1717*	2130**	3270***
± 2	± 69	± 105	± 80	± 94	± 7	± 198	± 305	± 244	± 292

* Valeurs à "60,120 et 180 min." significativement différentes de la valeur à "30 min." Correspondante au seuil de 0,05

° Valeurs à "120 et 180 min." " " " à "60 min." " " de 0,05

■ Valeurs à "180 min." " " " à "120 min." " " de 0,05

La lipogenèse augmente proportionnellement à la durée de l'incubation.

TABLEAU 9 - Lipogenèse d'hépatocytes de lapin adulte normal nourri "ad libitum" à partir de l'eau tritiée ($^3\text{H}_2\text{O}$). Effets de l'insuline

Micromoles de $^3\text{H}_2\text{O}$ incorporées dans les acides gras p. 10^6 cellules p. 180 minutes [5] (20)	
Témoins 0	Insuline 1 mU/ml
225	375
175	135
810	675
500	367
274	509
397 ± 117	412 ± 89

[] Nombre d'animaux

() Nombre d'essais

Il y a incorporation d'eau tritiée dans les acides gras synthétisés par les hépatocytes isolés. L'insuline n'induit pas significativement cette incorporation chez l'animal nourri.

TABLEAU 10 - Biosynthèse des lipides totaux dans les hépatocytes isolés
de lapin adulte à jeun pendant 48 HEURES

Influence de la nature du précurseur

GLUCOSE (7)		ACETATE (7)	
Cpm p.10 ⁶ Cellules p.180 min	Cpm p.mg de protéi- nes totales	Cpm p.10 ⁶ Cellules p.180 min	Cpm p.mg de protéi- nes totales
1026	2931	22	63
1572	4505	42	120
1206	3445	56	160
1358	3880	74	237
1178	3183	18	55
1563	4465		
954	2517		
+ 1265 * - 92	+ 3560 * - 288	+ 30 - 10	+ 80 - 32

() Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur "acétate" correspon-
dante au seuil de 0,05

*Le glucose est utilisé préférentiellement dans la biosynthèse des lipi-
des totaux par l'hépatocyte isolé*

TABLEAU II - Biosynthèse des lipides totaux à partir du glucose $^{14}\text{C(U)}$ dans les hépatocytes isolés de lapin normal adulte à jeun depuis 48 Heures
Effet de l'Insuline (13)

Cpm p. 10^6 cellules p. 180 min.				Cpm p. mg de protéines totales p. 180 min.			
Témoins 0	Insuline 0,1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 0,1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml
1577	1134			2931	3240		
1358	1548			4505	4423		
700	630			3880	1800		
1008	2380	1008	3144	2000	8800	2000	8983
1166	2566			2880	7331		
571	568			3331	1623		
1745	4036			1631	11531		
1596	2730			4900	8750		
1020	1400			5115	4281		
583	652	583	718	1432	1602	1432	1764
1178	2608	1178	3154	3183	7049	3183	8524
1563	2286	1563	1022	4465	6531	4465	2697
954	1232			2517	3251		
1141 ± 94	1828* ± 287	1083 ± 203	2009 ± 660	3270 ± 292	5247* ± 844	2770 ± 672	5492 ± 1894

() Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin sans hormone au seuil de 0,05

Chez le lapin à jeun, l'insuline a une action stimulante sur la biosynthèse des lipides totaux dès la dose de 0,1 mui/ml. Cet effet n'augmente pas lorsque la dose est multipliée par 10 (1mui/ml).

TABLEAU 14 - Réserves énergétiques hépatiques et constituantes plasmatiques chez le lapin de 60 jours nourri "ad libitum" [7]

Poids Corporel (g)	Poids du foie (g)	OD x 100	FOIE										PLASMA				
			Lipides totaux Poids sec		Cholestérol total		glycogène		Lipides totaux		Triglycérides		Cholestérol total		Glucose		Protéines glyco-
			g p. cent de foie	g p. kg animal	mg p. centg de foie	mg p. Kg animal	g p. cent g de foie	g p. kg animal	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml	mg p. cent ml
1700	70,60	4,15	2,23	0,93	109	45	0,19	380	106	54	172	27,32					
1530	68,98	4,18	2,11	0,88	196	57	0,18	370	97	67	129	34,81					
1520	66,30	4,28	2,37	1,01	120	51	0,15	450	82	55	161	43,29					
1700	82,73	4,87	2,15	1,04	194	65	0,18	230	122	43	153	28,48					
1700	77,45	4,55	2,56	1,07	133	61	0,15	300	95	62	140	14,81					
1750	67,82	3,88	2,62	1,01	122	51	0,06	300	72	81	141	15,48					
1550	90,74	5,50	2,71	1,49	125	69	0,30										
1671 ± 24	74,95 ± 3,44	4,49 ± 0,21	2,56 ± 0,36	1,06 ± 0,08	127 ± 4	57 ± 3	0,21 ± 0,05	305 ± 25	98 ± 5	66 ± 6	154 ± 6	29,03 ± 4,90					

[] Nombre d'animaux

Mesures faites en décembre.

TABLEAU 15 - Réserves énergétiques hépatiques et constituants plasmatiques chez le lapin de 60 jours nourri "ad libitum" [5].

Poids corporel (g)	Poids du foie (g)	O ₂ × 10 ³ g/100 g	F O I E										P L A S M A				
			Lipides totaux		Cholestérol total		Glycogène		Lipides totaux		Triglycérides		Cholestérol total		Glucose		Protéines glycolysées
			g p-cent de foie	g p.-kg animal	mg p-cent de foie	mg p.-kg animal	g p-cent de foie	g p.-kg animal	mg p.-cent ml	mg p.-cent ml	mg p.-cent ml	mg p.-cent ml	mg p.-cent ml	mg p.-cent ml	mg p.-cent ml		
1900	115,71	6,14	5,39	3,31	153	94	0,30	0,18	800	87	104	260	44,17				
1600	109,65	7,42	4,55	3,37	85	63	0,20	0,15	500	153	92	321	33,71				
1400	84,46	4,60	3,30	2,44	139	64	0,13	0,06	720	109	45	305	33,82				
1700	98,90	5,82	4,70	2,73	143	83	0,30	0,17	750	95	113	288	26,15				
1500	49,83	3,32	5,07	1,68	109	36	0,28	0,08									
1620	89,71	5,46	5,00	2,71	126	68	0,24	0,13	693	130	89	294	39,43				
± 86	± 13,93	± 0,70	± 0,17	± 0,31	± 13	± 10	± 0,03	± 0,02	± 66	± 23	± 15	± 13	± 6,01				

[] Nombre d'animaux

Mesures faites en février

Comparativement au tableau 14, nous observons un cycle circadien des réserves énergétiques du foie et des constituants plasmatiques (lipides totaux et glucose).

TABLEAU 16 - Cycle circadien des réserves énergétiques hépatiques et des constituants plasmatiques chez le lapin de 60 jours nourri "ad libitum" en été [4].

Poids corporel de foie	Poids de foie	Foie / Corps x 100	F O I E						P L A S M A				
			Lipides totaux Poids sec		Cholestérol total	Glycogène	Lipides totaux	Triglycérides	Cholestérol total	Glucose			
			g p. cent g de foie	g p. kg animal							g p. cent g de foie	g p. kg animal	mg p. cent ml
± 1723 45	± 62,78 1,86	± 3,5 1,0	± 2,64 0,11	± 0,93 0,07	± 131 10	± 48 3	± 0,13 0,02	± 0,04 0,01	± 258 26	± 112 12	± 64 8	± 156 7	
1700 1640 1850 1700	60,41 61,36 61,01 68,33	3,60 3,74 3,30 3,41	2,62 2,93 2,55 2,41	0,93 1,10 0,84 0,83	108 136 154 124	38 51 51 50	0,11 0,11 0,10 0,09	0,04 0,04 0,03 0,06	280 220 320 210	138 96 127 87	88 57 63 49	151 139 174 158	
2030 1500	78,04 53,51	3,80 3,56	1,90 2,70	0,72 0,96	195 217	74 77	0,20 0,21	0,08 0,07	130 300	74 125	37 66	156 122	
1775	65,78	3,70	2,30	0,84	206	76	0,21	0,08	215	100	52	139	

NOÛT : Sacrifice à 0 h, heure locale "jours longs" en France (heure universelle 8 h + 2 h = 10 h)

[] Nombre d'animaux
Mesures faites en juin.
Nous observons un cycle circadien des réserves énergétiques du foie.

TABLEAU 17 a - Etude de la lipogenèse spontanée d'hépatocytes isolés de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline. Variations circadiennes.

LIPIDES TOTAUX				ACIDES GRAS											
Eau tritiée 250 µCi Témoins 0	Insuline 1 µU/ml	Glucose 0,5 µCi Témoins 0	Acétate 0,5 µCi Témoins 0	Insuline 1 µU/ml	Propionate 0,5 µCi Témoins 0	Eau tritiée 250 µCi Témoins 0	Insuline 1 µU/ml	Glucose 0,5 µCi Témoins 0	Insuline 1 µU/ml	Acétate 0,5 µCi Témoins 0	Insuline 1 µU/ml	Propionate 0,5 µCi Témoins 0	Insuline 1 µU/ml		
														1 µU/ml	1 µU/ml
JOUR [6] (18)															
86	153	437	512	14	16	113	72	13	41	27	15	3	3		
96	333	436	371	52	7	39	108	18	14	15	45	23	23		
522	546	781	874	81	73	85	126	13	34	47	21	21	21		
297	326	553	381	80	40	48	54	20	35	33	20	29	45		
		404	802	33	33			50	36	20	21	9	6		
		844	708	18	12			19	23	9					
250 ± 103 340 ± 80				44 ± 11	49 ± 14	30 ± 12	31 ± 9	71 ± 17	90 ± 16	22 ± 6	31 ± 4	27 ± 6	17 ± 4	19 ± 8	
NUIT [5] (15)															
37	61	183	230	10	11	12	15	7	10	9	8	5	5		
130	144	224	336	23	11	23	25	6	4	4	9	2	6		
90	110	227	331	7	6	16	29	4	4	4	9	1	1		
		391	449	9	7			8	10	3	3	3	3		
		300	354	7	5			2	17	4	4	3	2		
86 ± 27 105 ± 24				285 ± 37	334 ± 36	11 ± 3	11 ± 2	8 ± 1	9 ± 2	17 ± 3	23 ± 4	5 ± 1	9 ± 2	5 ± 1	6 ± 1

[] Nombre d'animaux
Lipogenèse exprimée en Cpm p. 10⁵ cellules p. 180 min.

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" correspondante au seuil de 0,05

■ Valeurs de la "nuit" significativement différentes de la valeur du "jour" correspondante au seuil de 0,05.

Nous observons un cycle circadien de la lipogenèse de l'hépatocyte isolé avec un maximum diurne et un cycle nyctéméral de l'effet lipogénique de l'insuline, qui la nuit, agit sur l'incorporation de glucose dans les triglycérides.

TABLEAU 17 b - Étude de la lipogenèse spontanée d'hépatocytes isolés de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline. Variations circadiennes.

LIPIDES TOTAUX												ACIDES GRAS																			
Eau tritiée 250 µCi				Glucose 0,5 µCi				Acétate 0,5 µCi				Propionate 0,5 µCi				Eau tritiée 250 µCi				Glucose 0,5 µCi				Acétate 0,5 µCi				Propionate 0,5 µCi			
Témoins		Insuline 1 mU/ml		Témoins		Insuline 1 mU/ml		Témoins		Insuline 1 mU/ml		Témoins		Insuline 1 mU/ml		Témoins		Insuline 1 mU/ml		Témoins		Insuline 1 mU/ml		Témoins		Insuline 1 mU/ml		Témoins		Insuline 1 mU/ml	
JOUR [6] (18)																															
48	86	246	288	17	14	16	16	63	41	7	23	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces		
58	260	281	222	25	31	74	22	23	62	11	9	16	9	16	9	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14		
473	495	708	854	73	90	66	58	77	114	12	31	43	41	43	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41		
179	196	333	230	40	50	20	10	29	33	12	21	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20		
		362	719	30	30	9	12			45	32	18	19	18	19	18	19	18	19	18	19	18	19	18	19	18	19	18	19		
		617	518	12	12					14	17	9	9	14	17	9	9	14	17	9	9	14	17	9	9	14	17	9	9		
190 ± 99	259 ± 86	42 ± 79	472 ± 110	33 ± 9	38 ± 12	23 ± 11	24 ± 9	48 ± 13	63 ± 18	17 ± 6	22 ± 4	21 ± 6	19 ± 6	21 ± 6	19 ± 6	15 ± 3	17 ± 5														
NUIT [5] (15)																															
21	35	105	132	6	5	6	2	7	9	12	5																				
97	108	242	251	17	15	8	10	17	19	4	3																				
70	110	165	219	9	traces	4	6	12	21	3	3																				
		250	287	6	6	5	9			5	5																				
		211	249	5	6	4	4			1	12	3	3																		
63 ± 22	84 ± 25	195 ± 27	228 ± 26	9 ± 3	8 ± 2	5 ± 1	6 ± 1	12 ± 3	16 ± 4	5 ± 2	6 ± 2	4 ± 1	5 ± 1	4 ± 1	5 ± 1	2 ± 1	3 ± 1														

[] Nombre d'antipaux () Nombre d'essais
 * Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" correspondante au seuil de 0,05
 ☐ Valeurs "de la nuit" significativement différentes de la valeur "du jour" correspondante au seuil de 0,05

TABLEAU 17 C - Cycle circadien : lipogenèse spontanée d'hépatocytes isolés de lapin de 60 jours nourris "ad libitum" (micromoles d'eau tritiée incorporées dans les acides gras pendant 180 min) - Influence de l'insuline.

Micromoles d'eau tritiée incorporées dans les acides gras p. 180 min			
H I V E R			
JOUR [4]		NUIT [2]	
Témoins 0	Insuline 1 mU/ml	Témoins 0	Insuline 1 mU/ml
900	522	58	122
936	2592	123	133
752	1120		
256	288		
711 ± 157	1131 ± 518	91 [■] ± 32	128* ± 6

[] Nombre d'animaux

* Valeur significativement différente de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0,05

■ Valeur de la "nuit" significativement différente de la valeur du "jour" correspondante au seuil de 0,05

Nous observons un cycle circadien de la lipogenèse "de novo" des acides gras à partir de l'eau tritiée avec un maximum diurne mais aussi des effets lipogéniques de l'insuline

Remarque : Le mode d'expression de la lipogenèse est calculé ainsi :

$$\frac{(\text{Cpm retrouvés après incubation}) - (\text{cpm des blancs extraits})}{\text{As/nombre d'hépatocytes}}$$

micromoles d' $^3\text{H}_2\text{O}$ incorporée dans les acides gras p. 180 min p. 10^6 cellules

$$\text{As (activité spécifique)} = \frac{\text{Cpm (blanc : KRB + } ^3\text{H}_2\text{O)}}{\text{micromoles d}'^3\text{H}_2\text{O}}$$

La molarité de l'eau tritiée = 56 M ; dans 2 ml d'échantillon nous avons 112 micromoles d' $^3\text{H}_2\text{O}$

TABIEAU 18 - Cycle circadien de la lipogenèse spontanée d'adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal de lapin de 60 jours nourri "ad libitum". Influence de l'insuline.

LIPIDES TOTAUX				ACIDES GRAS			
Cpne p. 180 min d'incubation		nmoles p. heure		Cpne p. 180 min d'incubation		nmoles p. heure	
Témoins 0	Insuline 1 mU/ml	Témoins 0	Insuline 1 mU/ml	Témoins 0	Insuline 1 mU/ml	Témoins 0	Insuline 1 mU/ml
JOUR : Sacrifice à 10 h locale ETE [6] (18)							
Glucose Converti		161	220			12	12
		305	353			24	27
		280	338			13	17
		126	140			7	8
		236	280			12	17
		135	217			10	14
		310 ± 47	388 ± 49			19 ± 3	25 ± 1
Acétate Incorporé		212	220			216	225
		214	280			186	292
		118	279			134	281
		44	63			42	72
		175	238			164	231
		140	129			158	131
		150 ± 26	203 ± 36			150 ± 24	199 ± 33
NUIT : Sacrifice à 0 h locale ETE [3] (9)							
Glucose Converti	1222	1017	504	262			
	602	610	578	656	27	58	48
	397	1363	361	440	24	54	62
	740 ± 248	995 ± 218	722 ± 96	679 ± 171	26 ± 1	56 ± 2	82 ± 9
Acétate Incorporé	1032	2183	457	620	72	853	169
	718	2459	1077	3689	884	1329	2155
	558	8739	667	1843	2002	2910	771
	769 ± 139	4460 ± 2141	734 ± 182	2051 ± 892	986 ± 559	1692 ± 622	1032 ± 584

[] Nombre d'animaux

() Nombre d'essais

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" correspondante au seuil de 0,05

Nous observons des cycles circadiens de la lipogenèse et des effets lipogéniques de l'insuline, dont le maximum est nocturne.

Remarque : Les moyennes ± ESM sont corrigées du coefficient 3/2 afin de permettre la comparaison quantitative avec l'incorporation de l'acétate.

TABLEAU 22 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal de lapin de 60 jours. Cycle circannuel.

LIPOLYSE exprimée en Glycerol μ moles p.Cent mg de lipides totaux									
Témoins	Synacthène M				Témoins	Isoproteranol M			
0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
ETE - JOUR sacrifice à 10 h (5)									
0,19	0,46	1,32	1,20	1,52	0,19	0,21	0,35	0,35	0,32
0,43	0,48	2,87	3,42	3,09	0,43	0,64	0,28	0,31	0,44
0,42	3,81	4,04	4,17	4,08	0,42	0,40	0,55	0,56	0,61
0,38	0,59	3,11	3,19	3,03	0,38	0,42	0,31	0,32	0,44
0,45	0,48	2,50	2,70	2,94	0,45		0,43	0,57	0,53
0,37 $\pm 0,05$	1,16 * $\pm 0,70$	2,77 * $\pm 0,44$	2,94 * $\pm 0,50$	2,93 * $\pm 0,40$	0,37 $\pm 0,05$	0,42 $\pm 0,09$	0,38 $\pm 0,04$	0,42 $\pm 0,05$	0,47 $\pm 0,04$
HIVER - JOUR sacrifice à 10 h (8)									
0,19	2,29	4,12	4,82	3,70	0,19	0,44	0,30	0,58	0,73
0,14	2,23	3,12	2,99	2,95	0,14	0,13	0,17	0,17	0,45
0,16	1,79	2,60	2,23	2,30	0,16	0,18	0,19	0,20	0,36
0,43	2,41	3,55	3,59	3,63	0,43	0,36	0,30	0,29	0,38
0,28	2,53	2,58	2,56		0,28				
0,33	3,22	3,64	3,56		0,33				
0,20	3,43	3,93	3,84		0,20		1,48		1,51
0,24	3,74	4,64	4,44		0,24		1,42		2,86
0,25 $\pm 0,04$	2,71 * $\pm 0,24$	3,52 * $\pm 0,26$	3,50 * $\pm 0,31$	3,15 * $\pm 0,33$	0,25 $\pm 0,04$	0,28 $\pm 0,03$	0,64 $\pm 0,26$	0,31 $\pm 0,10$	1,05 * $\pm 0,40$

() Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin sans "hormone" au seuil de 0,05

Le Synacthène est lipolytique dès la dose de 10^{-9} M, seule la dose de 10^{-6} M est lipolytique pour l'IPR. L'action du synacthène est plus importante en Hiver.

TABLEAU 23 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal de lapin de 90 jours nourri "ad libitum" - Influence hormonale - Cycle circadien et circannual

LIPOLYSE exprimée en Glycérol uncles p.Cent mg de lipides totaux									
Témoins	Synecthène M				Témoins	Isoprotéranal M			
0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
ETE - NUIT - Sacrifices à 0 h (4)									
0,13	1,27	1,86	1,83	2,29	0,13	0,20	0,05	0,10	0,41
0,10	0,44	0,38	0,36	0,21	0,10	0,19	0,21	0,20	0,29
0,18		1,95		2,29	0,18	0,20	0,20	0,21	
0,10		1,09		3,33	0,10	0,15	0,06	0,07	
0,13 ± 0,02	0,66* ± 0,42	1,32* ± 0,37	1,10* ± 0,74	2,03* ± 0,66	0,13 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,13 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,35* ± 0,06
HIVER - NUIT - sacrifice à 21 h (4)									
0,18	1,34	3,00	3,34		0,18		0,21		0,72
0,19	0,75	2,88	3,46		0,19		0,14		0,46
0,38	3,04	3,41	4,02		0,38		0,35		1,91
0,14	1,93	3,20	2,96		0,14		0,18		0,36
0,22 ± 0,06	1,77* ± 0,49	3,07* ± 0,18	3,45* ± 0,22		0,22 ± 0,06		0,22 ± 0,05		0,86 ± 0,36
HIVER - NUIT - sacrifice à 4 h (5)									
0,16	2,00	2,68	2,79		0,16		0,18		0,69
0,15	1,95	2,04	2,44		0,15		0,17		0,39
0,10	1,57	2,92	2,99		0,10				0,22
0,35	0,76	4,20	4,48		0,35		0,35		0,78
0,26	1,68	4,62	4,50		0,26		0,41		0,89
0,20 0,04	1,99* 0,22	3,28* 0,48	3,44 0,43		0,20 0,04		0,26 0,06		0,65* 0,15

() Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin sans "hormone" au seuil de 0,05

La lipolyse diurne est plus importante comparativement à l'activité lipolytique nocturne

TABLEAU 25 - Réserves énergétiques hépatiques et constituants plasmatiques du lapereau

de 10 JOURS

Poids corporel (g)	Poids du Foie (g)	Tols Corps x 100		FOIE				PLASMA				
		Tols	Corps	LIPIDES TOTAUX Acides Gras		CHOLESTEROL TOTAL		GLYCOGENE		TRIGLYCERIDES mg p. Cent ml	CHOLESTEROL TOTAL mg p. Cent ml	GLUCOSE mg p. Cent ml
				g p. Cent Foie	g p. Kg Animal	mg p. Cent Foie	mg p. Kg Animal	g p. Cent Foie	g p. Kg Animal			
260	5,30	2,10	4,60	0,94	158	32	0,17	100	173	155		
250	5,70	2,24	3,40	0,76	236	54	0,22	134	165	162		
210	3,71	1,76	2,53	0,45	145	28	0,11	115	241	200		
160	4,33	2,70	1,72	0,47	112	30	0,04	143	230	164		
210	8,47	4,00	5,06	2,04	368	78	0,11	204	167	164		
180	8,33	4,30	1,27	0,57	36	8	0,05	115	195	162		
160	5,80	3,68	0,74	0,27	27	10	0,09	141	221	148		
135	5,34	4,60	3,48	1,63	190	93	0,19	155	358	169		
140	5,00	3,60	2,23	0,80	192	69	0,20	155	343	167		
180	6,27	3,40	6,23	2,17	477	168	0,13	138	233	149		
130 ± 14	5,94 ± 0,48	3,23 ± 0,30	3,13 ± 0,56	1,01 ± 0,22	195 ± 44	57 ± 15	0,15 ± 0,02	138 ± 11	233 ± 24	164 ± 5		

EIE (12)

() Nombre d'animaux

TABLEAU 28 - Cycle circannuel des réserves énergétiques hépatiques et des constituants plasmatiques du lapereau de

38 JOURS

Poids Corporal (g)	Poids du foie (g)	Poids du foie x 100	FOIE				PLASMA				
			Acides Gras g p.Cent g foie	Cholestérol mg p.Cent g foie	Cholestérol total mg p.Kg animal	Glycogène g p.Cent g foie	Triglycé- rides mg p.Cent ml	Cholestérol total mg p.Cent ml	Glucose mg p.Cent ml	Protéines glycosylées micromoles p.g protéines séri- ques	
HIVER (4)											
1050	30,05	2,86	1,93	93	27	0,08	0,04	101	80	155	28,28
1050	38,09	3,63	1,35	80	29	0,13	0,34	41	54	181	28,12
1150	41,78	3,63	2,17	144	52	0,22	0,08	142	60	158	31,52
950	27,94	2,94	1,54	57	20	0,12	0,04	66	68	126	39,52
1050 ± 40	34,5 ± 3,2	3,27 ± 0,21	1,75 ± 0,19	96 ± 17	32 ± 7	0,14 ± 0,03	0,05 ± 0,01	88 ± 22	66 ± 6	155 ± 11	32,11 ± 2,57
ETE (3)											
850	28,07	4,60	2,28	1,05	76			234	74	151	24,96
900	29,65	3,32	4,18	1,38	68	0,11	0,34	111	81	142	
950	45,35	4,77				0,09	0,03	224	70	149	26,68
900 ± 29	34,6 ± 5,3	4,23 ± 0,46	3,23 ± 0,95	1,22 ± 0,17	72 ± 4	0,10 ± 0,01	0,04 ± 0,01	190 ± 39	75 ± 3	147 ± 3	25,94 ± 0,10

() Nombre d'animaux

TABLEAU 30 - Evolution de la quantité d'eau au niveau du foie de lapin de la NAISSANCE à l'âge ADULTE

Eau en g p. Cent g de foie frais						
J0 (6)	J10 (6)	J20 (5)	J28 (7)	J38 (9)	J60 (13)	Adulte(4)
70,31			71,3	71,9	72,3	72,0
64,29	70,2		69,7	69,6	73,5	69,3
74,93	69,8	72,8	75,8	71,2	70,0	
63,40	73,2	73,3	66,9	69,7	67,3	
54,53	72,1	71,6	68,9	72,1	67,5	69,4
74,49	70,9	71,9	69,2	73,3	70,0	67,9
	71,7	70,8	72,3	71,5	68,5	
				71,2	67,2	
				70,2	68,4	
					70,7	
					71,2	
					71,8	
					71,8	
67	71	72	70,6	71,2	70	69,7
± 3	± 1	± 1	± 1,1	± 0,4	± 1	± 0,9

() Nombre d'animaux

Nous n'observons pas de différence significative de la quantité d'eau hépatique au cours de la croissance

TABLEAU 31-32 - Evolution du Poids sec et des lipides totaux de 1 ml de suspension d'hépatocytes contenant au moins 10^6 cellules vivantes

Evolution des proteines totales de 10^6 cellules vivantes

LAPEREAUX A LA NAISSANCE (6)		
Poids sec du milieu biologique de 1 ml de suspension cellulaire		Proteines totales de la suspension cellulaire rapportée à 10^6 cellules vivantes
Poids sec (mg)	Poids sec lipides totaux (mg)	Proteines totales (mg)
1,60	1,43	0,771
1,70	1,30	0,771
1,60	1,08	0,770
1,93	1,10	0,813
1,90	1,53	0,854
1,94	1,53	0,761
+ 1,77 - 0,07	+ 1,33 - 0,08	+ 0,79 - 0,02
LAPEREAUX DE 20 JOURS (7)		
2,79	0,46	1,506
2,05	0,54	1,239
2,20	0,45	0,854
1,77	0,70	1,111
2,00	0,50	1,102
0,90	0,21	1,621
1,00	0,60	1,813
+ 1,82 - 0,26	+ 0,43 - 0,07	+ 1,32 - 0,13

() Nombre d'animaux

Nous observons une forte diminution des lipides totaux au 20^{ème} jour après la naissance ; le poids sec des hépatocytes ne varie pas ; la quantité de proteines totales correspondantes aux seules cellules vivantes, est bien corrélée au poids sec et aux lipides totaux.

TABLEAU 33 - Etude de la lipogenèse spontanée d'hépatocytes isolés de lapereau à la naissance

Influence de l'Insuline (6)

a) LIPOGENESE en C pm p.3. 10⁶ Cellules p. 180 min.

LIPIDES TOTAUX						ACIDES GRAS					
Glucose 0,5 uci		Acétate 0,5 uci		Propionate 0,5 uci		Glucose 0,5 uci		Acétate 0,5 uci		Propionate 0,5 uci	
Témoins 0	Insuline 1µui/ml	Témoins 0	Insuline 1µui/ml	Témoins 0	Insuline 1µui/ml	Témoins 0	Insuline 1µui/ml	Témoins 0	Insuline 1µui/ml	Témoins 0	Insuline 1µui/ml
2000	2804	65	112	258	274	24	65	31	36	18	38
2206	2292	75	72	260	153	45	36	34	37	5	9
2028	2192	95	61	206	123	51	39	31	47	21	26
940	1982	124	119	173	107	30	73	39	33	8	7
1646	1883	116	121	185	208	60	68	35	20	7	
1732	2166	122	91	123	160	68	94	22	26	6	10
1759 -104	2223* -131	100 ± 10	96 ± 10	201 ± 22	150 ± 25	47 ± 7	63* ± 9	32 ± 2	33 ± 2	11 ± 3	18 ± 6

b) LIPOGENESE en C pm p. mg de proteines totales p. 3.10⁶ cellules

2594	3637	64	145	335	355	31	64	40	47	23	47
2861	2973	97	97	337	198	58	47	44	48	6	12
2630	2843	123	79	267	160	66	51	40	41	27	34
1156	2438	153	146	213	132	37	90	48	41	10	9
1927	2205	136	142	217	244	70	81	41	23	8	
2278	2873	160	120	152	210	91	124	29	34	8	13
2241 ± 254	2828* ± 201	126 ± 12	122 ± 12	255 ± 29	217 ± 32	59 ± 9	80* ± 12	40 ± 3	39 ± 4	14 ± 4	23 ± 7

()

Nombre d'animaux

*

Valeur significativement différente de la valeur témoin sans "hormone" au seuil de 0,05

Nous observons la seule utilisation des atomes de carbone du glucose dans la triglycérogenèse ; l'acétate et le propionate n'interviennent pas dans cette même voie. Notons les effets lipogéniques de l'Insuline en présence du glucose comme substrat donneur de carbone (en période diurne).

TABLEAU 34 - Etude de la lipogenèse spontanée d'hépatocytes isolés du lapereau de 20 JOURS

Influence de l'Insuline (7)

a) LIPOGENESE en Cpm. p. 10^6 cellules p. 180 min.

LIPIDES TOTAUX						ACIDES GRAS					
Glucose 0,5 uci		Acétate 0,5 uci		Propionate 0,5 uci		Glucose 0,5 uci		Acétate 0,5 uci		Propionate 0,5 uci	
Témoins 0	Insuline 1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml
1012	1040	16	18	38	42	31	33	10	10	14	16
1041	1725	333	701			33	24	21	81		
1065	1827	303	96			33	27	9	51		
1560	1566	9	7	9	7	22	28	7	9	2	2
914	1240	12	13	3	5	20	14	7	10	Traces	Traces
1795	1623	9	15	9	12	15	24	9	6	6	3
1785	1860	21	24	6	12	21	30	9	9	6	3
1283 + 133	1554* + 116	89 + 57	125 + 97	13 + 6	16 + 7	25 + 3	25 + 2	10 + 2	25* + 11	Traces	Traces

b) LIPOGENESE en Cpm p. mg de proteines totales p 10^6 cellules

672	691	15	15	25	28	21	22	7	7	9	11
840	1392	270	573			27	18	51	135		
1248	2133	354	111			38	33	12	60		
1404	1410	6	6	8	6	20	23	7	9	2	2
829	1125	11	12	3	5	18	13	6	9		
930	1002	8	9	6	6	9	15	6	3	3	3
964	1026	12	12	3	6	12	18	6	6	3	
907 + 97	1255* + 174	97 + 56	105 + 80	9 + 4	10 + 4	21 + 4	20 + 3	14 + 6	33* + 14	Traces	Traces

() Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin sans "hormons" au seuil de 0,05

Comme à la naissance, nous remarquons la capacité de l'hépatocyte à utiliser le carbone du glucose dans la biosynthèse des "lipides totaux" et enfin les effets lipogéniques de l'insuline dans cette voie sont en phase diurne.

TABEAU 35 - Etude de la lipogenèse spontanée d'adipocytes du tissu adipeux du lapereau à la naissance.

Influence de l'insuline (18)

a) LIPOGENESE à partir du GLUCOSE

LIPIDES TOTALS				ACIDES GRAS			
Cpm p. 180 min.d'incubation		n.moles de Glucose converti p.heure		Cpm p. 180 min.d'incubation		n.moles de glucose converti p.heure	
Témoins 0	Insuline 1 µl/ml	Témoins 0	Insuline 1 µl/ml	Témoins 0	Insuline 1 µl/ml	Témoins 0	Insuline 1 µl/ml
1261	1652	973	1197	4	10	7	19
1586	2313	1126	1303	4	17	6	24
2048	3150	1891	2071	0	47	0	79
2593	4606	2245	2473	0	67	0	72
1024	957	2138	2343	0	0	0	0
1010	1209	1236	1455	0	0	0	0
1068	1067	1223	1263	0	0	0	0
± 1513 ± 229	± 2165* ± 530	± 2279 ± 290	± 2594* ± 311	Traces	± 20 ± 10	Traces	± 42 ± 20

Remarque : Les moyennes ± ESM sont corrigées par le coefficient 3/2 afin de comparer quantitativement avec l'incorporation de l'acétate.

b) LIPOGENESE à partir de l'ACETATE

35	141	53	212	28	57	89	119
135	712	120	369	103	359	167	362
344	339	438	509	145	139	848	1084
434	151	423	491	202	60	381	293
113	126	389	421	33	53	227	345
43	36	30	74	7	16	23	67
13	11	59	44	6	9	32	53
± 160 ± 62	± 217 ± 92	± 225 ± 69	± 303* ± 73	± 75 ± 29	± 99* ± 46	± 252 ± 110	± 332* ± 135

Remarque : Dans le cas de l'acétate, la lipogenèse est exprimée en n.moles d'acétate incorporé p.heure.

() : Nombre d'animaux

* : Valeurs significativement différentes de la valeur témoin sans "hormone" correspondante au seuil de 0,05

A ce stade de développement, nous observons une très forte activité lipogénique (triglycérogénèse à partir du glucose et synthèse de novo des acides gras à partir de l'acétate). Remarquons les effets lipogéniques de l'insuline.

TABLEAU 36 - Etude de la Lipogenèse spontanée d'adipocytes du tissu adipeux périrénal du Lapin au 10 JOURS

Influence de l'Insuline (8)

a) LIPOGENESE à partir du GLUCOSE

LIPIDES TOTAUX				ACIDES GRAS			
C p.m p. 180 min d'incubation		n.moles de glucose converti p. heure		C p.m p.180 min d'incubation		n.moles de glucose converti p. heure	
Témoins 0	Insuline 1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml	Témoins 0	Insuline 1 mui/ml
1881	1714	344	328	5	43	7	9
1303	1516	338	403	11	43	9	17
1816	2238	425	477	3	6	15	30
305	435	153	198	3	16	7	36
987	1339	347	409	5	10	13	25
1424	1414	660	1140	5	3	7	5
1302	2822	409	451	12	52	9	21
2174	2463	416	439	32	23	16	10
1300 ± 207	1742* ± 266	500 ± 75	721* ± 148	10 ± 4	25 ± 4	15 ± 2	28* ± 6

Remarque : les moyennes ± ESM sont corrigées par le coefficient 3/2 afin de comparer quantitativement avec l'incorporation de l'acétate.

b) LIPOGENESE à partir de l'ACETATE

132	171	41	51	54	78	19	37
75	102	28	23	22	31	14	19
115	109	40	40	34	21	21	13
18	19	13	14	15	11	19	14
30	27	16	14	16	14	10	18
66	39	81	54	6	17	16	46
87	109	26	30	15	25	9	15
181	288	54	76	47	54	30	34
88 ± 19	108 ± 32	37 ± 8	38 ± 8	26 ± 6	31 ± 8	17 ± 2	25 ± 5

Remarque : Dans le cas de l'Acetate, la lipogenèse est exprimée en n.moles d'acétate incorporé p.heure.

()

Nombre d'animaux

*

Valeurs significativement différentes de la valeur témoin sans "hormone" au seuil de 0,05

Dès le 10^{ème}, nous constatons une chute spectaculaire de la lipogenèse de l'adipocyte et la disparition des effets lipogéniques de l'insuline sur la lipogenèse de novo des acides gras.

TABLEAU 37 - Etude de la lipogenèse spontanée d'adipocytes isolés du tissu adipeux péri-rénal du lapereau de 20 JOURS
Influence de l'insuline (7)

a) LIPOGENESE à partir du GLUCOSE *

LIPIDES TOTAUX				ACIDES GRAS			
Cpm p.180 min d'incubation		n.moles de glucose converti p.heure		Cpm p.180 min d'incubation		n.moles de glucose converti p.heure	
Témoins	Insuline	Témoins	Insuline	Témoins	Insuline	Témoins	Insuline
0	1 µui/ml	0	1µui/ml	0	1 µui/ml	0	1 µui/ml
1261	1652	200	261	15	13	4	4
562	845	74	112	6	14	3	2
1673	1804	435	504	25	14	11	10
2014	2786	636	730	1			
3126	3915	651	728				
3233	3942	821	905	9	4	5	3
1610	2262	703	810		4		3
± 1956	± 2459 *	± 754	± 869 *	± 14	± 11	± 9	± 8
± 363	± 441	± 157	± 168	± 4	± 2	± 3	± 3

Remarque : Les moyennes ± ESM sont corrigées par le coefficient 3/2 afin de comparer quantitativement avec l'incorporation de l'acétate.

b) LIPOGENESE à partir de l'ACETATE

168	108	30	28	53	47	23	20
23	17	5	4	7	8	3	3
119	78	59	37	39	32	30	24
27	52	12	22	10	16	11	15
64	64	19	21	21	20	12	12
69	70	25	27	20	19	14	14
27	27	18	15	18	20	28	22
± 62	± 58	± 24	± 22	± 24	± 23	± 17	± 15
± 15	± 12	± 7	± 4	± 6	± 5	± 4	± 3

Remarque : Dans le cas de l'acétate la lipogenèse est exprimée en n.moles d'acétate incorporé p.heure

() Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin sans "hormons" au seuil de 0.05

Comparativement à la naissance, la lipogenèse de l'adipocyte est plus faible.

TABLEAU 38 - Etude de la lipogenèse spontanée d'adipocytes du tissu adipeux périrénaux
du lapereau de 28 JOURS

Influence de l'Insuline (5)

a) LIPOGENESE à partir du GLUCOSE

LIPIDES TOTALS				ACIDES GRAS			
Cpm p.180 min d'incubation		n.moles de glucose converti p.heure		Cpm p.180 min d'incubation		n.moles de glucose converti p.heure	
Témoins 0	Insuline 1 µui/ml	Témoins 0	Insuline 1 µui/ml	Témoins 0	Insuline 1 µui/ml	Témoins 0	Insuline 1 µui/ml
3806	2511	532	102	38	45	14	17
2528	2742	271	269	4	9	1	2
3191	4181	277	303	4	2	1	1
2582	3154	420	467	39	6	16	2
2130	2360	267	477	7	18	4	9
± 2847 ± 294	± 2990* ± 327	± 530 ± 80	± 485 ± 105	± 18 ± 8	± 16 ± 8	± 11 ± 5	± 9 ± 5

Remarque : Les moyennes ± ESM sont corrigées par le coefficient 3/2 afin de comparer quantitativement avec l'incorporation de l'acétate

b) LIPOGENESE à partir de l'ACETATE

713	1506	91	84	320	836	25	40
1489	1064	259	191	719	485	28	20
223	814	25	75	63	409	12	85
148	160	33	37	48	103	25	59
59	64	18	21	18	21	16	12
± 526 ± 266	± 722* ± 273	± 85 ± 45	± 82 ± 30	± 234 ± 133	± 371* ± 146	± 21 ± 3	± 39 ± 10

Remarque : Dans le cas de l'Acétate la lipogenèse est exprimée en n.moles d'acétate incorporé p.heure

() Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin sans "hormone" au seuil de 0,05

Au sevrage, l'activité lipogénique de l'adipocyte est toujours faible par rapport à la naissance.

TABEAU 40 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux du lapereau à la naissance. Influence hormonale.

LIPOLYSE exprimée en glycérol micromoles p. cent mg de lipides totaux [18]						
Témoins 0	Synacthène M			Témoins 0	Isoprotérénoi M	
	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷		10 ⁻⁸	10 ⁻⁶
0,43	2,70	2,96	3,09	0,43	0,48	2,46
0,22	0,38	0,71	0,51	0,22	0,35	0,88
0,60	2,04	2,48	2,94	0,60	0,74	2,61
0,75	1,76	2,81	2,95	0,75	0,65	1,91
0,89	0,96	5,40	5,75	0,89	0,78	4,07
1,30	2,32	3,91	4,16	1,30	1,49	2,65
0,70	1,69	3,05 *	3,23 *	0,70	0,75	2,43 *
± 0,16	± 0,36	± 0,64	± 0,70	± 0,16	± 0,16	± 0,42

[] Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 5 %

La réactivité lipolytique au synacthène n'apparaît qu'à la dose de 10⁻⁸ M et l'IPR n'est efficace qu'à forte dose de 10⁻⁶ M.

TABLEAU 41 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 10 jours. Influence hormonale.

LIPOLYSE exprimée en glycérol micromoles p. cent mg de lipides totaux [4]						
Témoins	Synacthène M			Témoins	Isoprotérénol M	
	0	10^{-9}	10^{-8}		10^{-7}	0
0,28	2,95	3,25	1,75	0,28	0,29	3,06
0,52	2,84	3,51	2,98	0,22	0,98	3,16
0,22	1,16	1,06	1,84	0,52	0,15	1,82
0,83	8,11	8,46	8,77	0,83	1,14	7,24
± 0,46	± 3,77*	± 4,07*	± 3,84*	± 0,46	± 0,64	± 3,82*
0,14	1,51	1,57	1,67	0,14	0,25	1,18

[] Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" correspondante au seuil de 0,05

Le synacthène est efficace dès la dose de 10^{-9} M et l'IPR, comme à la naissance, n'est efficace qu'à 10^{-6} M.

TABLEAU 42 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 20 jours. Influence hormonale.

LIPOLYSE exprimée en glycérol micromoles p. cent mg de lipides totaux [8]						
Témoins	Synacthène M			Témoins	Isoprotérénol M	
0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶
0,38	6,38	7,40	8,45	0,38		0,86
0,28	3,26	4,22	4,59	0,28	0,42	0,55
0,33	3,89	4,71	4,40	0,33	0,18	0,71
0,32	4,45	4,56	4,52	0,32	0,13	3,81
0,31	3,98	4,24	4,17	0,31	0,49	3,83
0,15	1,86	1,88	2,18	0,15	0,27	1,60
0,05	1,66	1,94	1,97	0,05	0,24	1,64
0,00	3,96	1,98	2,58	0,00	0,24	3,76
0,23	3,68 *	3,87 *	4,11 *	0,23	0,28	2,10 *
±	±	±	±	±	±	±
0,05	0,53	0,67	0,73	0,05	0,01	0,51

[] Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0,05.

Il y a diminution de la lipolyse basale par rapport à celle observée à la naissance, celle-ci ayant débuté dès le 10ème jour ; la sensibilité de l'adipocyte aux agents lipolytiques est comparable à celle observée à 10 jours.

TABLEAU 43 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 28 jours. Influence hormonale.

LIPOLYSE exprimée en glycérol micromoles p. cent mg de lipides totaux [5]						
Témoins	Synacthène M			Témoins	Isoprotérénol M	
	0	10^{-9}	10^{-8}		10^{-7}	0
0,31	4,78	5,39	5,61	0,31	0,21	1,50
0,08	2,42	2,83	2,60	0,08	0,96	0,35
0,23	1,92	2,31	2,37	0,23	0,23	1,35
0,20	2,11	3,11	3,29	0,20	0,13	0,24
0,15	0,48	2,65	2,44	0,15	0,10	0,16
0,19	2,34 *	3,26 *	3,26 *	0,19	0,33	0,72
±	±	±	±	±	±	±
0,04	0,69	0,55	0,61	0,04	0,16	0,29

[] Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0,05.

L'adipocyte du lapereau au sevrage à la même sensibilité au synacthène, en revanche l'efficacité de l'IPR disparaît même à 10^{-6} M.

TABEAU 44 - Activité lipolytique spontanée des adipocytes isolés du tissu adipeux périrénal du lapereau de 38 jours. Influence hormonale.

LIPOLYSE exprimée en Glycérol micromoles p. 100 mg de lipides totaux [6]						
Témoins	Synacthène M			Témoins	Isoprotérénol M	
0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	0	10^{-8}	10^{-6}
0,16	3,13	3,71	3,63	0,16	0,53	3,92
0,15	4,02	5,34	4,26	0,15	0,11	2,45
0,21	3,48	4,01	3,98	0,25	0,33	0,87
0,12	2,62	2,26	2,46	0,12	0,19	2,40
0,09	3,38	2,93	2,63	0,09	0,09	2,81
0,12	1,11	4,02	2,47	0,12	0,11	0,62
± 0,14	± 2,96 *	± 3,71 *	± 3,24 *	± 0,14	± 0,23	± 2,18 *
0,02	0,41	0,43	0,33	0,02	0,07	0,51

[] Nombre d'animaux

* Valeurs significativement différentes de la valeur témoin "sans hormone" au seuil de 0,05.

La lipolyse basale atteint un niveau qu'elle conserve jusqu'à l'âge adulte ; nous observons un maximum de stimulation tant avec le synacthène qu'avec l'IPR.

Mémoire imprimé par le Laboratoire de Physiologie Animale
de la Faculté des Sciences
de LIMOGES - FRANCE

DYNAMIQUE COMPAREE ET REGULATION ENDOCRINE DES RESERVES ENERGETIQUES DE L'ADIPOCYTE ET DE L'HEPATOCYTE CHEZ LE LAPIN : CYCLES PHYSIOLOGIQUES CIRCADIENS ET CIRCANNUELS, CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT.

RESUME : L'objet de ce travail est de révéler chez le lapin au niveau du métabolisme des réserves énergétiques, les rôles respectifs du foie et du tissu adipeux et leur régulation endocrinienne au cours des cycles circadiens, circannuels, de la croissance, du développement et dans le cas de désordres endocrinologiques aigus.

A cette fin nous avons développé des techniques d'études "in vitro" des adipocytes et des hépatocytes. Notre effort a porté sur la préparation d'hépatocytes isolés et la vérification de leur qualité biologique. L'hépatocyte isolé est capable de néoglucogénèse mais aussi de lipogénèse.

Chez le lapin de deux mois nous montrons l'existence de cycles circadiens de la lipogénèse et de la lipolyse de l'adipocyte (lipogénèse nocturne et lipolyse diurne), des propriétés lipogéniques de l'insuline qui s'expriment la nuit, de la lipogénèse de l'hépatocyte qui est maximale le jour, alors que la nuit une stéatose éphémère envahit le foie. Ces propriétés voient leur intensité se modifier au cours du cycle des saisons, en été la lipogénèse de l'adipocyte est maximale ainsi que les effets de l'insuline ; en hiver c'est la lipolyse et les facteurs qui la stimulent qui sont prépondérants.

De la naissance au sevrage de nombreuses modifications métaboliques affectent le foie et le tissu adipeux. Le foie gras de la naissance disparaît en quelques jours alors que l'abondance en glycogène persiste. L'adipocyte voit décroître lors de l'allaitement ses capacités de lipolyse et de lipogénèse. L'insuline, à la naissance, est lipogénique le jour puis perd cette propriété.

A l'occasion des désordres endocrino-métaboliques consécutifs à la surrénalectomie des preuves directes des effets extra-surrénaux de l'ACTH sont apportées ainsi que la mise en évidence de nouvelles anomalies.

MOTS CLES : Lapin - cycles physiologiques - hépatocyte - adipocyte - lipogénèse - lipolyse - croissance - insuline - ACTH.

JURY : Président B. ASSELAH
Membres M. BENSALÉM
B. DESBALS
P. DESCHAUX
F. HADJ BEKKOUCHE
P. PETKOV
C. ZIDANE

Date de soutenance :

LABORATOIRE D'ACCUEIL : Laboratoire de Physiologie Animale
UER des Sciences Exactes et Naturelles
123, rue Albert Thomas
F - 87060 - LIMOGES CEDEX