

## **Chapitre 2 : La mélatonine**

### **2.1. Introduction**

La mélatonine, souvent appelée hormone du sommeil, est surtout connue comme étant l'hormone centrale de régulation des rythmes chronobiologiques, et d'un certain point de vue, de pratiquement l'ensemble des sécrétions hormonales, chez tous les mammifères et chez la plupart des espèces animales complexes. Cette neurohormone est synthétisée à partir d'un neurotransmetteur, la sérotonine, qui dérive elle-même du tryptophane, un acide aminé essentiel. Elle est sécrétée par la glande pinéale (ou épiphyse) en réponse à l'absence de lumière.

On sait que la mélatonine est sécrétée durant la nuit par la glande pinéale chez les Vertébrés et que cette sécrétion est sous le contrôle de l'horloge biologique. Le rôle de cette sécrétion variable est encore hypothétique. La durée de la sécrétion varie au cours l'année, étant donné que la longueur de la nuit varie avec les saisons. L'information photopériodique est transmise à l'organisme *via* la durée de la sécrétion de mélatonine. Aussi, de nombreux auteurs s'intéressent au rôle de la mélatonine dans les fonctions saisonnières comme la reproduction et la croissance.

La mélatonine semble avoir de multiples fonctions, autres qu'hormonales chez les Mammifères, en particulier comme antioxydant. Elle semble aussi jouer un rôle dans le système immunitaire. Il a été récemment montré que diverses algues et plantes produisent aussi de la mélatonine. L'organisme peut en extraire à partir de nombreuses plantes (dont par exemple le riz).

### **2.2. Rôles de la mélatonine**

La mélatonine est considérée par certains biochimistes comme une hormone primordiale, car elle régule la sécrétion de la plupart des hormones humaines (paracrines et endocrines). La mélatonine agit différemment selon son origine :

- celle produite dans la glande pinéale et à partir du tractus gastro-intestinal agit comme une hormone endocrine car elle diffuse dans le sang,
- celle produite par la rétine agit comme une hormone paracrine.

La mélatonine est une hormone monoaminée qui dérive du tryptophane. La mélatonine, sécrétée par l'épiphyse, est synthétisée à partir de l'acide aminé tryptophane qui est transformé en sérotonine avant de donner la mélatonine. Cette hormone circule librement dans le sang et agit sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques transmembranaires.

La mélatonine est sécrétée par la glande pinéale ou épiphyse, mais aussi en beaucoup plus faible quantité, par la rétine. Elle présente différentes actions majeures :

- régulation chrono biologique ;
- diminution du stress ;
- régulation du sommeil ;
- réduction des risques cardio-vasculaires ;
- détermination de l'espérance de vie.

Ces multiples effets, sont expliqués par l'omniprésence de cette hormone dans le règne vivant, depuis les algues unicellulaires jusqu'à l'homme. Phénomène rare en biologie, sa composition chimique est identique chez l'ensemble des espèces. Ce caractère universel en fait le produit majeur d'adaptation à la vie sur terre et explique donc son importance.

### **2.3. Mode d'action de la mélatonine**

L'information lumineuse est perçue par la rétine et, après un trajet nerveux, elle est transformée en un signal endocrinien, le rythme de sécrétion de mélatonine. Cette hormone est sécrétée uniquement pendant la nuit. La mélatonine agit au niveau du système nerveux central pour modifier la sécrétion pulsatile de LHRH. Son action sur les neurones à LHRH n'est pas directe, mais elle met en jeu des inter-neurones. Par ailleurs, la modification de sécrétion de LHRH est observable avec un délai important par rapport au changement du rythme de sécrétion de mélatonine, de 40 à 60 jours chez la brebis. Les modifications de sécrétion de LHRH induisent à leur tour des changements de sécrétion des gonadotropines et en conséquence, des variations d'activité des gonades (**De Reviers, 1996**).

Contrairement à ce qui existe chez les Mammifères, la perception de l'information lumineuse est, chez les Oiseaux, beaucoup plus importante par voie transcrânienne que par voie oculaire. Ainsi, par exemple, l'obscurcissement du crâne par de l'encre de Chine bloque la réponse sexuelle du moineau aux jours longs, alors que la privation oculaire est sans effet. La lumière transmise par voie intracrânienne est perçue grâce à un pigment photorécepteur, probablement la rhodopsine (**Foster et Follet, 1985**) et ceci à la fois par l'hypothalamus lui-même et via la glande pinéale. Il reste néanmoins possible que, si les yeux ne sont pas indispensables à la stimulation lumineuse de la reproduction, ils jouent cependant un rôle dans la fonction synchronisatrice des rythmes lumineux circadiens. Durant les phases obscures, la glande pinéale produit, chez les Oiseaux comme chez les Mammifères, des quantités importantes de mélatonine. Cependant la pinéalectomie ne semble pas modifier la photosensibilité d'oiseaux sauvages. Le rôle de la mélatonine est donc, chez ces espèces, loin d'être aussi important et aussi bien démontré que chez les Mammifères.

Chez la caille japonaise, le rôle de la mélatonine sur la rythmicité circadienne est encore controversé (**Lumineau *et al.*, 2002**). L'augmentation de la photopériode de printemps stimule la sécrétion de la gonadolibérine (GnRH) et la maturation des gonades en conséquence. Toutefois, la reproduction se termine avant le retour des photopériodes courtes. Ceci est la conséquence d'un effet de second long-photopériodes l'induction de photoréfractaire. Ce double rôle des photopériodes longues est nécessaire pour donner l'asymétrie des saisons de reproduction. En règle générale, la régression des gonades par photoréfraction est associée à une diminution massive de la GnRH hypothalamique, essentiellement d'un renversement de la condition pré-pubère. Bien que la saison de reproduction soit déterminée principalement par le contrôle photopériodique des neurones à GnRH, la prolactine peut être importante pour déterminer le moment exact de la régression des gonades. Au niveau moléculaire, les horloges circadiennes aviaires semblent fonctionner d'une manière similaire à celles des Mammifères. La mesure du temps photopériodique implique l'interaction entre un rythme circadien de photoinduction et, contrairement aux Mammifères, des photorécepteurs cérébraux profonds. Leur emplacement exact demeure incertain. Bien que les yeux et la glande pinéale génèrent un cycle quotidien de sécrétion de mélatonine, ce signal photopériodique n'est pas utilisé au moment de la reproduction saisonnière. Au lieu de cela, les réponses photopériodiques semblent impliquer une interaction directe entre les photorécepteurs et les neurones à GnRH. Les hormones thyroïdiennes sont néanmoins nécessaires pour faire fonctionner ce système. En plus de la fonction gonadique, le chant est également affecté par la photopériode, l'augmentation en volume étant en partie due à une augmentation du nombre de cellules à la suite de la neurogenèse (**Dawson *et al.*, 2001**).

#### **1.4. Régulation de la synthèse de mélatonine**

Chez les Vertébrés, la lumière régule l'activité de la glande pinéale en jouant sur le taux de transcription de l'AA-NAT (**Pevet, 1998**). Chez les Vertébrés non mammaliens, l'épiphyse est à la fois le lieu de synthèse de la mélatonine et le lieu d'intégration du message photique (**Mayer *et al.*, 1997**). La transduction du signal lumineux se fait par l'intermédiaire d'un photorécepteur membranaire. Le second messenger synchronise l'horloge qui contrôle l'activité de l'AA-NAT dans le pinéaloocyte (**Collin *et al.*, 1998**). Chez les Mammifères, l'information lumineuse perçue au niveau de la rétine est transportée à la glande pinéale par voie neuronale (**Pevet, 1998**).

## Chapitre 3 : Matériel et méthodes :

### 3.1. Matériel biologique et conditions d'élevage :

Des pigeons domestiques mâles *Columba livia* provenant de la région d'Annaba durant la période de reproduction (début du mois de mars) ont été achetés dans le commerce. Les animaux sont élevés dans des cages métalliques de [60×54×52] cm équipées de mangeoires et d'abreuvoirs. Les pigeons sont acclimatés aux conditions de l'animalerie à une température de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  et une humidité relative de 75%. Ils reçoivent une nourriture à base de blé dur et de l'eau de boisson à volonté.

Après leur adaptation, les animaux sont pesés et répartis en 6 lots de 6 pigeons chacun, dont 4 lots reçoivent un traitement à la mélatonine (**Tab. 1**), durant toute la période expérimentale.

**Tableau 1:** Constitution des lots expérimentaux :

Répartition des pigeons	Programme photopériodique	Dose de mélatonine (mg/ml)
T1 (Témoin)	Photopériode naturelle	–
Lot 2	18L : 06D	3
Lot 3	18L : 06D	6
T2 (Témoin)	08L : 16D	–
Lot 5	24L : 00D	3
Lot 6	24L : 00D	6

Les lots 2 et 5 reçoivent une dose de mélatonine de 3mg/ml, tous les jours à la même heure. Les lots 3 et 6 reçoivent, dans les mêmes conditions, une dose de mélatonine de 6 mg/ml.

### 3.2. Méthodes

#### 3.2.1. Prélèvements sanguins

A la fin de la période expérimentale, les pigeons sont pesés puis sacrifiés, et le sang est recueilli dans des tubes citratés. Après centrifugation à 5000 tours/minute pendant 30 minutes, le plasma est récupéré dans des tubes Eppendorff et congelé à  $-18^\circ\text{C}$  jusqu'au moment des dosages.

### **3.2.2. Prélèvement des organes**

Lors du sacrifice des pigeons, le foie, le cerveau et les testicules sont prélevés et pesés à l'aide d'une balance de précision. Puis les gonades sont fixées dans du Bouin alcoolique pour la réalisation des coupes histologiques.

Les testicules sont mesurés et le volume testiculaire est calculé d'après la formule (**Dawson *et al.*, 1985**) :

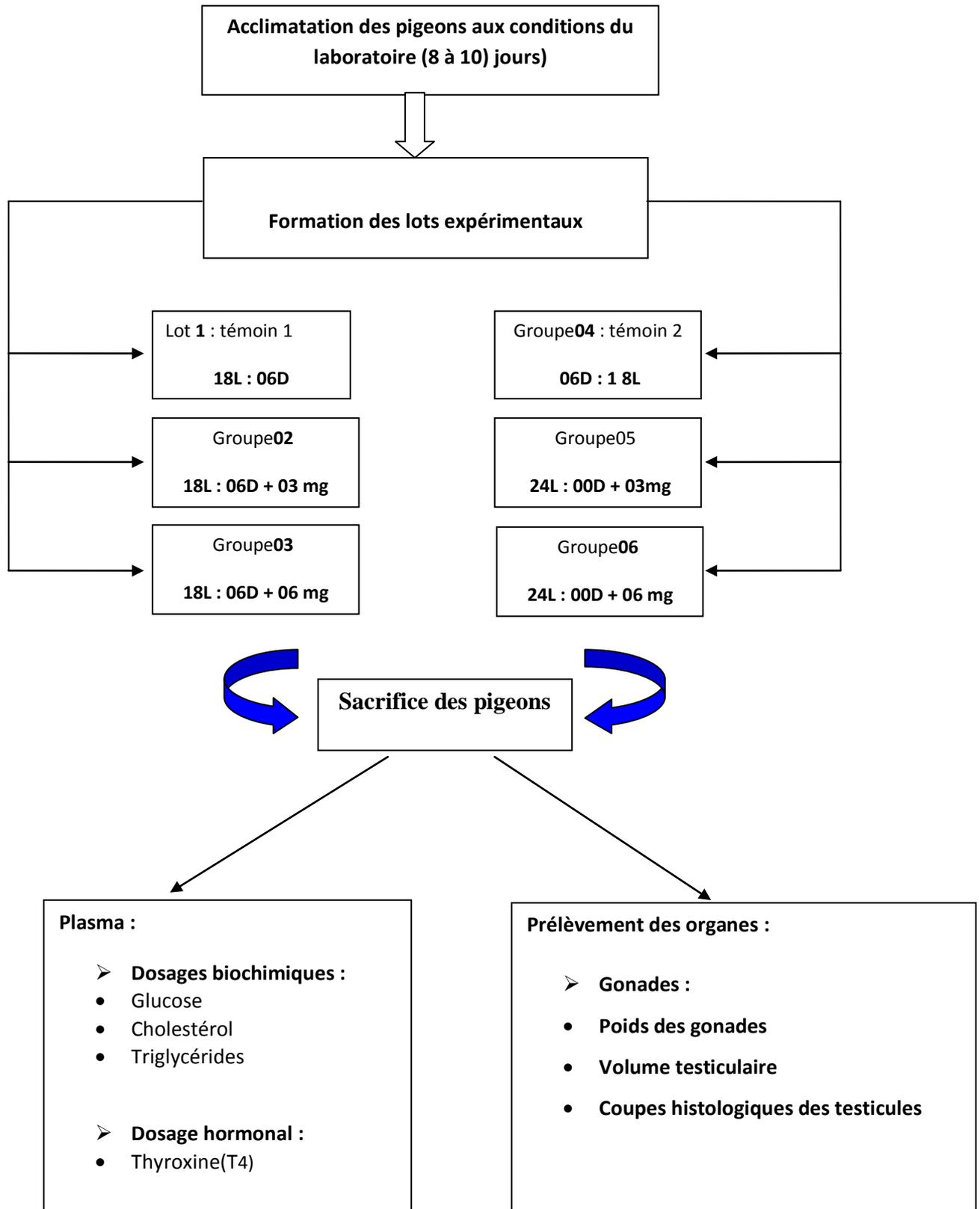
$$V \text{ (mm}^3\text{)} = 4/3 \pi a^2 b$$

V = volume testiculaire (mm<sup>3</sup>)

a = ½ largeur de la gonade

b = ½ longueur de la gonade

## PROTOCOLE EXPERIMENTAL

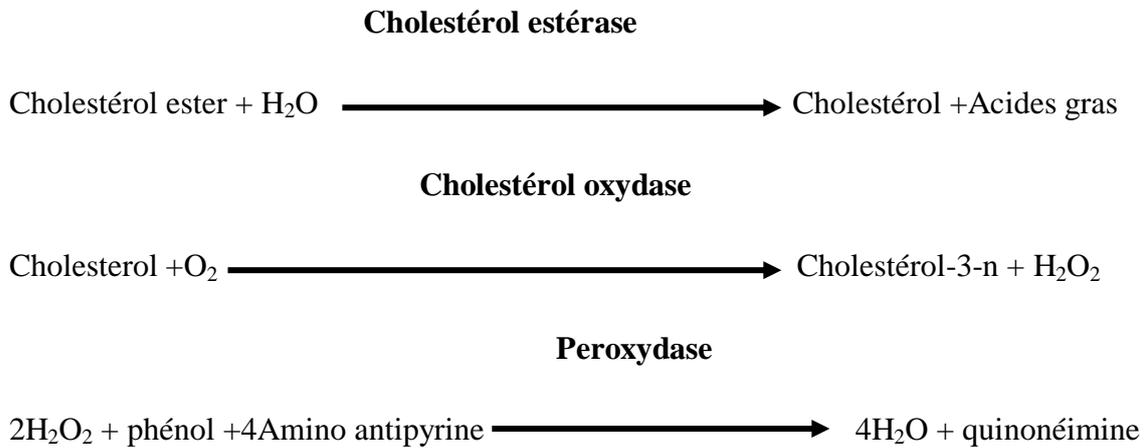


### 3.2.3. Dosages biochimiques

#### 3.2.3.1. Cholestérol

##### a. Principe

Le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. La cholestérol estérase hydrolyse les esters, et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est formé dans la réaction d'oxydation enzymatique du cholestérol sous l'action de la cholestérol oxydase. Cette dernière réagit avec le phénol pour produire la quinonéimine (Thomas, 1992) :



##### b. Mode opératoire

	Standard	Echantillon	Blanc
Standard	10 µl	-	-
Echantillon	-	10 µl	-
Blanc	1 µl	1 µl	1 ml

On mélange à l'aide d'un agitateur et on laisse incuber pendant 10 minutes à 20-25°C ou pendant 05 minutes à 37°C, puis on lit la densité optique (DO) à 500 nm. La coloration est stable pendant 60 minutes à l'abri de la lumière.

##### c. Calcul de la concentration

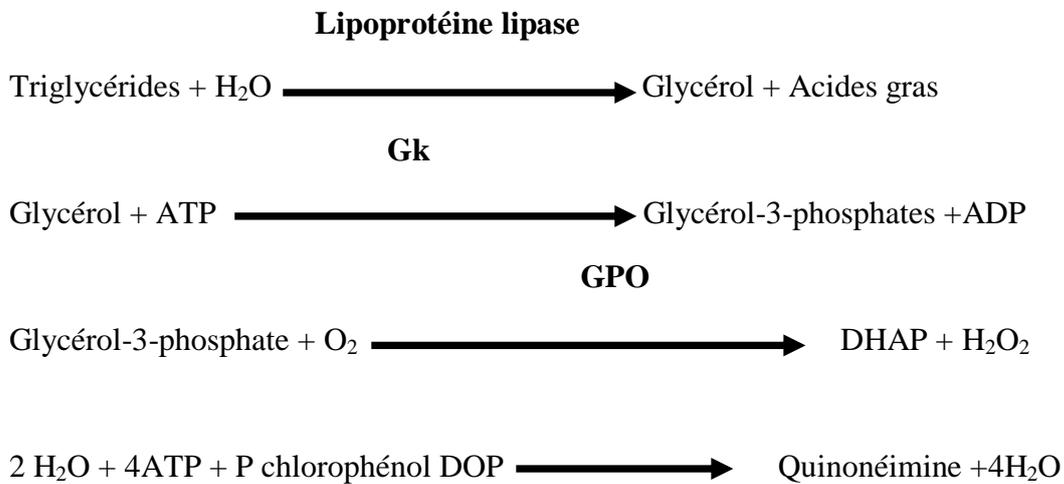
La concentration du cholestérol plasmatique est calculée d'après la formule suivante :

$$\text{[Cholestérol g/l]} = \frac{\text{E échantillon}}{\text{E standard}} \times \text{[Etalon]}$$

### 3.2.3.2. Triglycérides

#### a. Principe

Selon la détermination enzymatique de **Jacobs (1975)**, les triglycérides sont enzymatiquement hydrolysés en glycérol et en acides gras libres. Le glycérol, sous l'effet de la glycérol-kinase et de la glycérol-3-phosphate oxydase, forme  $H_2O_2$ . La concentration de  $H_2O_2$  est déterminée à travers les réactions suivantes:



#### b. Mode opératoire

	Standard	Echantillon	Blanc
Standard	10 $\mu$ l	-	-
Echantillon	-	10 $\mu$ l	-
Blanc	1 ml	1 ml	1 ml

On mélange à l'aide d'un agitateur et on laisse incuber pendant 10 minutes à 20-25°C ou 05 minutes à 37°C. On lit la densité optique (DO) à 500nm. La coloration est stable pendant 60 minutes à l'abri de la lumière.

#### c. Calcul de la concentration

La concentration en triglycérides plasmatiques est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Triglycérides g/l}] = \frac{\text{E échantillon}}{\text{E standard}} \times [\text{étalon}]$$

### 3.2.3.3. Glucose

#### a. Principe

Le glucose est mesuré après une oxydation enzymatique en présence du glucose oxydase, le peroxyde d'hydrogène formé réagit grâce à l'action catalytique d'une peroxydase, avec du phénol et la 4-aminophénazone pour former un composé rouge violet de quinonéimine qui sert d'indicateur coloré (**Trinder, 1969**)

#### GOD



#### POD



#### b. Mode opératoire

	Standard	Echantillon	Blanc
Standard	10 µl	-	-
Echantillon	-	10 µl	-
Blanc	1 ml	1 ml	1 ml

On mélange, puis on incube 25 minutes à 25°C ou 10 minutes à 37°C. On lit l'absorbance à 500 nm dans les 60 minutes.

#### c. Calcul de la concentration

La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

#### D.O. échantillon

$$[\text{Glucose g/l}] = \frac{\text{D.O. échantillon}}{\text{D.O. Etalon}} \times \text{N}$$

#### D.O. Etalon

**D.O.** : Densité optique ;

**N** : concentration de l'étalon = 1 g/l.

### **3.2.4. Dosage de la thyroxine**

Le dosage de la  $T_4$  plasmatique a été effectué par le test d'électro-chimiluminescence (E.C.L.I.A.), qui est adapté aux dosages immunologiques sur les analyseurs Elecsys 1010 (Wheeler et Lazarus, 1994).

Les réactifs, prêts à l'emploi, sont contenus dans un coffret Elecsys de 100 tests.

#### **a. Principe**

Le test immunologique est basé sur le principe de la compétition utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la  $T_4$ . La  $T_4$  endogène, libérée par l'action de l'acide 8-amillino-1-naphthalène sulfonique (A.N.S.), entre en compétition, pour les sites de fixation des anticorps, anti-  $T_4$  marqués au rhuténium, avec la  $T_4$  exogène ajoutée lors de la première incubation.

#### **b. Etapes du dosage**

- **1<sup>ère</sup> incubation** : une prise d'essai de 15  $\mu$ l est mise en présence de  $T_4$  marquée au rhuténium et d'A.N.S. La  $T_4$  liée aux protéines porteuses est libérée par l'action de l'A.N.S.
- **2<sup>ème</sup> incubation**: les microparticules tapissées de streptavidine sont ajustées dans la cuvette réactionnelle, ainsi que les anticorps anti  $T_4$  marqués à la biotine.
- La  $T_4$  endogène et la  $T_4$  biotinylée exogène entrent en compétition vis à vis des anticorps.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant.
- L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage dans une solution de lavage.
- Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production d'une luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de référence mémorisée. Le réajustement de la courbe par l'appareil est effectué à l'aide de 2 solutions de  $T_4$  Cal Set.

### **3.2.5. Histologie des testicules :**

Pour chaque pigeon, on prélève un testicule qui est mis séparément dans un flacon contenant du Bouin alcoolique.

#### **a. Préparation du Bouin alcoolique :**

On ajoute 21 ml d'eau distillée à 100 ml d'éthanol à 95°. Puis on dissout 1g d'acide picrique de coloration jaunâtre dans 100 ml de la solution préalablement préparée.

Pour obtenir le Bouin alcoolique, on ajoute à 75ml de cette solution, 5ml d'acide acétique et 25ml de formol.

#### **b. Déshydratation des échantillons :**

Les tissus fixés sont déshydratés les échantillons à l'aide d'un automate qui permet le passage automatique et progressif des échantillons dans des bains d'éthanol de titrage croissant (70°, 90° et 100°).

#### **c. Eclaircissage et inclusion**

Les échantillons déshydratés sont éclaircis dans 3 bains de xylène. Puis ils sont placés dans 2 bains de paraffine à l'étuve (45 °C) pendant 24 heures.

La mise en bloc se fait dans des barres de Leukart.

#### **d. Coupe :**

Des coupes de 5µm sont ensuite effectuées et disposées sur des lames sur lesquelles on a déposé une goutte d'eau gélatinée.

#### **e. Coloration :**

Pour cette opération, les lames sont placées dans :

- 2 bains de xylène pendant dix minutes pour chacun.
- 2 bains d'éthanol pendant dix minutes pour chacun.
- 1 bain d'eau.
- La coloration se fait par l'hématoxyline pendant dix minutes.

Les lames sont ensuite rincées à l'eau courante puis colorées à l'éosine pendant cinq minutes. Elles sont ensuite passées dans deux bains de xylène pendant deux minutes pour chacun.

#### **f. Montage :**

Après la coloration, on procède au montage qui se fait par le dépôt d'une goutte d'Eukitt sur laquelle on place une lamelle.

Enfin, les lames sont prêtes à être observées au microscope optique équipé d'un appareil photographique.

#### **3.2.6. Etude statistique**

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  erreur standard. L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du test  $t$  de Student pour la comparaison de moyennes, tandis que la comparaison multiple des moyennes a fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA) à deux critères de classification par le logiciel "Mini tab" (Weisberg, 1985).