

**Université Sidi Mohamed Ben Abdellah  
Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès**

## **THESE**

Présentée à La Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès  
pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR**

Discipline : Biologie  
Option : Neuroendocrinologie

par

**Youssef BARAKAT**

**Plasticité phénotypique des neurones  
du noyau paraventriculaire parvicellulaire  
hypothalamique liée au stress d'immobilisation :  
Approche morphofonctionnelle chez la gerboise**

Soutenue le 4 Décembre 2006 devant la commission d'examen

**F.Z. SQUALI**, Professeur à la Faculté des Sciences DM- Fès..... Président  
**J.R. PAPE**, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux 1.....Rapporteur  
**A. ALAOUI**, Professeur à la Faculté des Sciences DM- Fès.....Rapporteur  
**S. EL OUEZZANI**, Professeur à la Faculté des Sciences DM- Fès.....Examineur  
**A. AMARTI**, Professeur à la Faculté de Médecine de Fès.....Examineur  
**R. MAGOUL**, Professeur à la Faculté des Sciences DM- Fès.....Directeur de Thèse

**A ma famille,  
A tous ceux qui m'ont apporté leur amitié et leur soutien**

# Remerciements

Au terme de ce travail de Doctorat, je tiens à exprimer mes sincères remerciements,

Au Professeur Rabia MÂGOUL, qui a été pour moi une directrice de recherche grandement appréciée. Son intérêt constant, son immense disponibilité, sa compréhension et son honnêteté lui ont valu mon profond respect et toute ma gratitude.

Au Professeur Gérard TRAMU, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire des Régulations Neuroendocriniennes de l'Université de Bordeaux 1 où j'ai réalisé une partie de mon travail et à qui je rends hommage pour ses qualités humaines exceptionnelles.

Au Docteur Jean-Rémi PAPE à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour sa disponibilité, son intérêt pour mon travail, ses conseils, ainsi que son enthousiasme et la confiance qu'il m'a témoignée durant mes travaux de Doctorat à Bordeaux 1.

Au Professeur Abdelilah ALAOUI, qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de mon travail et d'accepter de participer au jury. Je lui exprime ma reconnaissance pour ses encouragements dans le lancement de ce projet.

Au Professeur Fatima-Zahra Squali à qui j'exprime ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury.

Au Professeur Seloua El Ouezzani qui a accepté d'examiner ce manuscrit et de faire partie du jury de thèse.

Au Professeur Docteur Afaf AMARTI qui, malgré ses nombreuses obligations, a accepté de juger ce manuscrit et de siéger parmi les membres du jury.

Je remercie également Monsieur Michel CHAIGNIAU, pour son assistance technique en terme d'analyse d'image et sa disponibilité généreuse.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du Laboratoire de Neuroendocrinologie et Environnement Nutritionnel et Climatique de Fès qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Enfin, je souhaite remercier collectivement tous les membres du Laboratoire des Régulations Neuroendocriniennes de Bordeaux, à qui j'exprime ma reconnaissance pour leur aide scientifique et pour leur amitié en particulier Madame Pierrette LAFON.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au Laboratoire de Neuroendocrinologie et Environnement Nutritionnel et Climatique de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès dirigé par le professeur Rabia Mâgoul en collaboration avec le Laboratoire des Régulations Neuroendocriniennes de l'Université de Bordeaux 1 dirigé par le professeur Alain Sarrieau.

Ces travaux ont donné lieu aux publications et communications suivantes :

**Y. Barakat**, J. R. Pape, M. Boutahricht, S. El Ouezzani, A. Alaoui, M. Chaigniau, G. Tramu and R. Magoul. Immunocytochemical Detection of CCK and CRH Neuropeptides in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of the Jerboa (*Jaculus Orientalis*) : Modulation by Immobilization Stress. **J. Neuroendocrinology** (2006); 18 : 767-775.

**Y. Barakat**, J. R. Pape, M. Boutahricht, S. El Ouezzani, A. Alaoui, M. Chaigniau, L. Barakat, G. Tramu and R. Magoul . Vasopressin-Containing Neurons of the Hypothalamic Parvicellular Paraventricular Nucleus of the Jerboa: Plasticity Related to Immobilization Stress. **Neuroendocrinology** ( sous presse, 2006).

**Y. Barakat**, J. R. Pape, M. Boutahricht, S. El Ouezzani, A. Alaoui, G. Tramu and R. Magoul (2005): Neuroendocrine Plasticity related to the Environmental Stress : Impact of Immobilization Stress on the CCK Neuronal System of the hypothalamic Paraventricular Nucleus. 5<sup>ème</sup> Congrès international PAEMS sur les Mutagènes et les Carcinogènes Environnementaux, Fès, 24-26 Novembre, Abstract P68.

**Y. Barakat**, J. R. Pape, M. Boutahricht, S. El Ouezzani, A. Alaoui, G. Tramu and R. Magoul (2006): Stress et plasticité des systèmes neuroendocrines hypothalamiques. Semaine nationale de la Science, Fès 17-21 Avril 2006.

**Y. Barakat**, J. R. Pape, M. Boutahricht, S. El Ouezzani, A. Alaoui, M. Chaigniau, G. Tramu and R. Magoul (2006): Vasopressin Containing Neurons in the Hypothalamic Parvicellular Paraventricular Nucleus of the Jerboa: Plasticity Related to Immobilization Stress. 5<sup>th</sup> Mediterranean conference of Neurosciences, Marrakech, 13-15 December 2006.

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	6
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	7
<b>INTRODUCTION</b> .....	9
<b>I. Le noyau paraventriculaire hypothalamique : composante majeure de l'axe neuroendocrinien corticotrope</b> .....	10
<b>II. Contrôle nerveux de l'axe corticotrope</b> .....	13
1. <i>Les circuits impliqués dans l'activation</i> .....	13
2. <i>Les circuits impliqués dans l'inhibition</i> .....	14
3. <i>Le contrôle catécholaminergique</i> .....	15
4. <i>Le contrôle sérotoninergique</i> .....	18
5. <i>Le contrôle de l'axe corticotrope par un éventuel nouveau neurotransmetteur cérébral, l'Anandamide</i> .....	19
<b>III. Le contrôle humoral de l'axe corticotrope par les glucocorticoïdes</b> .....	20
1. <i>Le rôle des neurones à CRH</i> .....	20
2. <i>Le rôle de l'hippocampe</i> .....	24
<b>IV. Les relations entre glucocorticoïdes et catécholamines centrales dans le contrôle de l'axe corticotrope</b> .....	24

<b>V. Les relations entre glucocorticoïdes et cytokines dans le contrôle de l'axe Corticotrope.....</b>	<b>25</b>
<b>VI. Relation entre le stress et la plasticité phénotypique des neurones du NPV.....</b>	<b>26</b>
<b>VII. Objectifs du travail.....</b>	<b>28</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>33</b>
<b>I. Groupes expérimentaux.....</b>	<b>33</b>
<b>II. Préparation du tissu.....</b>	<b>34</b>
<b>III. Procédure immunohistochimique.....</b>	<b>34</b>
<b>1. Principe .....</b>	<b>34</b>
<b>2. Immunosérums.....</b>	<b>35</b>
a. Anticorps anti-CCK .....	<b>35</b>
b. Anticorps anti-CRH .....	<b>35</b>
c. Anticorps anti-OXY .....	<b>35</b>
d. Anticorps anti-AVP .....	<b>36</b>
<b>3. Protocol immunohistochimique .....</b>	<b>36</b>
<b>IV. Double immunohistochimie.....</b>	<b>37</b>
<b>V. Analyse tissulaire.....</b>	<b>38</b>
<b>VI. Analyse quantitative.....</b>	<b>38</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>39</b>

## **PREMIERE PARTIE**

**Etude de la plasticité phénotypique des neurones à CRH et à CCK  
dans la partie parvicellulaire du NPV suite à un stress d'immobilisation  
chez la gerboise**

### **Résultats.....39**

- I. Etude de la distribution topographique des neurones CCK-IR dans les  
régions hypothalamique et limbique des gerboises contrôles.....39**
- II. Etude comparative de l'expression de la CCK et de la CRH au niveau de la  
partie parvicellulaire du NPV chez des gerboises contrôles et stressées  
(stress d'immobilisation).....39**
- III. Etude de la coexpression intraneuronale de la CCK et de la CRH au niveau  
de la partie parvicellulaire du NPV et de l'éminence médiane (EM).....40**

### **Discussion.....41**

---

## **DEUXIEME PARTIE**

**Etude de la plasticité phénotypique des neurones à AVP dans la partie  
parvicellulaire du NPV suite à un stress d'immobilisation chez la gerboise**

## **Résultats.....44**

- I. Etude de la distribution topographique des neurones AVP-IR dans le NPV des gerboises contrôles.....44**
  
- II. Etude comparative de l'expression de l'AVP au niveau de la partie parvicellulaire du NPV chez des gerboises contrôles et stressées (stress d'immobilisation).....44**
  
- III. Etude de la coexpression intraneuronale de l'AVP avec la CCK et la CRH (AVP/CCK et AVP/CRH) au niveau de la partie parvicellulaire du NPV et de l'éminence médiane (EM).....44**

## **Discussion.....46**

---

### **TROISIEME PARTIE**

**Etude de la plasticité phénotypique des neurones à OXY dans la partie parvicellulaire du NPV suite à un stress d'immobilisation chez la gerboise**

## **Résultats.....49**

- I. Etude de la distribution topographique des neurones OXY-IR au sein du NPV des gerboises contrôles.....49**



**II. Etude comparative de l'expression de l'OXY au niveau de la partie parvicellulaire du NPV chez des gerboises contrôles et stressées (stress d'immobilisation).....49**

**III. Etude de la coexpression intraneuronale de l'OXY avec la CCK et la CRH (OXY/CCK et OXY/CRH) au niveau de la partie parvicellulaire du NPV et de l'éminence médiane (EM).....49**

**Discussion.....51**

---

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....55**

**FIGURES.....60**

**BIBLIOGRAPHIE .....81**

**RESUME .....108**

**ABSTRACT .....109**

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ACTH : adrenocorticotropin Hormone  
AM : amygdale  
ANA : l'anandamide  
ARC : noyau arqué  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messagers  
AVP : vasopressine  
CC : corps calleux  
CC : gerboise contrôle colchicinisée  
CCK : cholécystokinine  
Cpu : caudé-putamen  
CRH : corticotropin-releasing hormone  
EM : éminence médiane  
GnRH : gonadotropine- releasing hormone  
HHS : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien  
IL : interleukine  
MPO : aire préoptique médiane  
NC : le groupe contrôle non colchicinisé  
NPV : noyau paraventriculaire  
NPY : neuropeptide  
NS : groupe stressé non colchicinisé  
NT : neurotensine  
OX : chiasma optique  
OXY : ocytocine  
PB : tampon phosphate  
RCH : aire rétrochiasmatique  
SC : gerboise stressée colchicinisée  
SON : noyau supra optique  
TRH : thyrotropine-releasing hormone  
TT : Tampon TRIS  
TV : tampon veronal sodique  
TX : triton X-100  
5 HT : sérotonine

# **AVANT-PROPOS**

L'hypothalamus joue un rôle primordial dans les fonctions végétatives et endocrines de l'organisme, ainsi que dans le contrôle de divers comportements tels les comportements émotionnels. Il intervient dans le maintien de l'homéostasie hormonale et dans les réponses adaptatives du système endocrine face aux situations stressantes de tous ordres.

Sous l'effet d'un stress, l'hypothalamus est stimulé au niveau du noyau paraventriculaire (NPV) hypothalamique dont les neurones disposent de propriétés neurosécrétoires essentiellement peptidiques. Les neuropeptides sécrétés sont déversés dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire pour engendrer la sécrétion de stimulines par les cellules glandulaires de l'adénohypophyse.

Le NPV, composé de neurones magno- et parvicellulaires, médie la réponse neuroendocrinienne au stress principalement via les neurones effecteurs parvicellulaires situés dans la région périventriculaire. Ils sont considérés comme le chef d'orchestre de la réponse neuroendocrinienne au stress ; les efférences de ces neurones sont apposées aux vaisseaux portes de l'éminence médiane pour y déverser leur contenu à destination du lobe antérieur de l'hypophyse. Le principal facteur hypophysiotrope déversé dans le sang porte pour stimuler l'antéhypophyse afin de libérer la corticotropine (ACTH) dans la circulation générale est un peptide qui a été séquencé par Vale et al. (1981), la corticotropin-releasing factor (CRF) actuellement nommée la corticotropin-releasing hormone (CRH).

L'ACTH agit à son tour sur les cellules de la cortico-surrénale qui libèrent les glucocorticoïdes (cortisol ou corticostérone). L'hyperactivation du système corticotrope a pour but principal la mobilisation énergétique pour assurer l'effort adaptatif. Les glucocorticoïdes peuvent aussi contrôler la réaction inflammatoire et la réponse immunitaire. En fait, Les glucocorticoïdes viennent relayer et amplifier principalement au niveau énergétique l'action des catécholamines qui sont responsables de la plupart des réponses immédiates à l'agression (tachycardie, augmentation de la pression artérielle, redistribution du sang des territoires viscéraux vers les muscles et le cerveau, augmentation du diamètre pupillaire, broncho-dilatation, accroissement de la thermogenèse, hyperglycémie), en favorisant la production de sucres à partir de sources non glucidiques. Cette énergie est principalement orientée vers les organes qui interviennent dans l'effort adaptatif (tissu cérébral et muscles).

Les neurones à CRH sont bien connus pour leur formidable plasticité sécrétoire. Ces neurones sont capables de moduler en fonction des circonstances physiologiques ou pathologiques l'expression d'autres neuropeptides dits accessoires comme la vasopressine (AVP), la cholécystokinine (CCK), l'ocytocine (OXY) et la neurotensine (NT). Ces

neuropeptides peuvent être exprimés dans les neurones à CRH dans des situations de stress chronique ou aigu et accompagnent la CRH dans son action sur l'antéhypophyse pour potentialiser ses effets sur la sécrétion d'ACTH hypophysaire dans des situations de forte sollicitation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Ainsi, en étudiant l'expression de ces neuropeptides, il nous est possible d'avoir une vue d'ensemble du comportement de ces neurones parvicellulaires qui sont doués d'une grande plasticité sécrétoire pouvant être régulée par le type de stresser et peut-être aussi en fonction de l'espèce. C'est ce concept de plasticité des systèmes neuroendocrines hypothalamiques liée au stress environnemental que nous évaluons sur un modèle animal très intéressant pour ce genre d'études, la gerboise en captivité. Il s'agit en effet d'un animal fortement exposé à des conditions environnementales contraignantes sources de divers types de stress pour l'animal.

# **INTRODUCTION**

Le terme STRESS vient du latin « stringere » qui signifie tendre ou raidir. A la notion historique de stress s'attachent deux noms, ceux de Hans SELYE et de Walter CANNON. En 1935, Walter CANNON précise le fonctionnement du système sympathique et de la médullosurrénale dans la sollicitation des composés énergétiques pour se préparer à l'action. En 1936, Hans SELYE caractérise la réaction d'alarme qui permet à l'organisme de s'adapter à de nouvelles conditions permettant de maintenir l'homéostasie du milieu intérieur, c'est le syndrome général d'adaptation (SGA). SELYE remarque également que chaque individu réagit de manière différente, ce qui met l'accent sur les différences interindividuelles. Les mécanismes neurophysiologiques mis en jeu au cours du stress sont nombreux, non spécifiques et font intervenir des composantes nerveuses, endocriniennes et immunologiques.

Les mécanismes d'adaptation au stress mettent en jeu deux systèmes neuroendocriniens couplés, mais relativement autonomes : l'axe catécholaminergique et l'axe corticotrope (**Figure 1, page 31**). Il s'agit d'un réseau complexe d'interactions entre le système d'alarme (essentiellement nerveux) et le système de défense (essentiellement hormonal). Ainsi, au cours des situations de stress, il y a une activation conjuguée des systèmes catécholaminergiques central et périphérique et de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien. La structure et le fonctionnement de ces deux systèmes sont bien différents. Le premier système, le système autonome sympathique dont un des organes cibles est la glande médullosurrénale qui libère la noradrénaline (NA) et l'adrénaline (A) dans la circulation sanguine. Le second, plutôt neuroendocrinien, recrute séquentiellement les neurones à corticolibérine (CRH) du noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus, les cellules corticotropes de l'adénohypophyse et les cellules corticosurréaliennes, et permet ainsi une augmentation des niveaux de glucocorticoïdes circulants. Le cortisol est l'hormone principale chez l'homme, les bovins et les ovins, le chien, le porc, des mammifères hibernants alors que la corticostérone domine chez les volailles, le lapin et les rongeurs de laboratoire (Girod., 1980; Saboureau et al., 1980; Shivatcheva et al., 1988).

Ces deux grands systèmes neuroendocriniens ne sont pas uniquement câblés de manière parallèle, mais interagissent à tous niveaux. A la suite d'une agression, l'ensemble des facteurs nerveux et hormonaux qui participent au syndrome général d'adaptation va enclencher une réponse coordonnée des cellules médullo et cortico-surréaliennes pour permettre à l'organisme de s'adapter aux conditions créées par un environnement hostile.

Le stress d'immobilisation appartient à une catégorie des stress neurogéniques (Allen et al., 1973) qui provoquent une mobilisation bien soutenue de l'axe hypothalamo-



hypophyso-surrénalien (HHS). Ces stress sont caractérisés par l'intégration et la prise en compte de l'ensemble des modalités sensorielles avant d'initier la réponse et aucun d'entre eux ne présente une menace directe pour le maintien de l'homéostasie. Par contre, les stress systémiques dont la surrénalectomie, l'hémorragie, l'hyperosmolarité chronique, la stimulation du système immunitaire et l'éther, provoquent aussi une mobilisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en activant directement le NPV par un recrutement spécifique des afférences viscérales et présentent une menace directe pour l'homéostasie.

La réponse au stress dépend directement de l'intensité et de la nature de l'agent stressant ainsi que de la capacité de contrôle qu'a l'animal sur lui. Le stress manuel aigu d'immobilisation par force représente un moyen efficace pour déclencher l'activation de l'axe HHS initiée tout d'abord au niveau des neurones paraventriculaires de l'hypothalamus et qui se traduit par une augmentation de la synthèse et de la libération de la CRH. Le résultat de cette activation est une augmentation de l'ACTH et par la suite de la corticostérone (Wong et al., 2000). Contrairement au stress aigu d'immobilisation, le stress chronique d'immobilisation peut provoquer une perturbation de différents rythmes circadiens liée à une hypersécrétion journalière de la mélatonine (Rodrigues et al., 2000). Au fait, les données obtenues sur l'effet de cette forme de stress divergent selon les auteurs. En effet, elles ont montré soit une augmentation, soit une stabilisation ou encore une diminution de l'expression d'ARNm de la CRH dans le NPV (Bonaz et al., 1998; Xin-Ming et al., 1997).

## **I. Le noyau paraventriculaire hypothalamique : composante majeure de l'axe neuroendocrinien corticotrope**

L'axe corticotrope constitue un des deux systèmes neuroendocriniens mis en route par les mécanismes d'adaptation au stress. Il semble destiné en premier lieu à supprimer ou à atténuer les effets du stress aigu, une fois que l'individu a trouvé la bonne réponse adaptative. Il a été, depuis H. Selye (1936), au centre des études neuroendocriniennes du stress. La mise en route de l'axe corticotrope semble destinée en premier lieu à supprimer ou à atténuer les effets du stress aigu, notamment ceux induits par les catécholamines, une fois que l'individu a trouvé la bonne réponse adaptative. Cette mise en route de l'axe corticotrope serait corrélée à la mise en route de mécanismes cognitivo-affectifs permettant de contrôler la situation.

Le système hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien ou axe corticotrope a une organisation typique des grands systèmes neuroendocriniens. Une glande endocrine

périphérique, la glande corticosurrénale, sécrète les hormones glucocorticoïdes responsables de la plupart des effets physiologiques de l'activation du système, sous le contrôle d'une hormone hypophysaire, la corticotropine ou ACTH (Adrenocorticotropin Hormone), elle-même sous la dépendance d'un noyau hypothalamique (le NPV) dont l'activité est régulée par les centres nerveux supérieurs.

Le NPV est en effet un noyau important dans la médiation des réponses au stress. Sur le plan anatomique, il peut être grossièrement subdivisé en deux principales portions caractérisées selon la taille des cellules, il s'agit des parties magnocellulaire et parvicellulaire (Gurdjian., 1927; Krieg., 1932 ; Armstrong et al., 1980; Swanson et Kuypers, 1980). Avec le développement des techniques d'immunohistochimie et de marquage rétrograde, la compartimentation du NPV a été davantage raffinée en fonction de l'hétérogénéité des neurones au niveau de leur contenu neurochimique, de leur morphologie et leurs projections afférentes et efférentes (Armstrong et al., 1980; Swanson et Kuypers., 1980; Rho et Swanson., 1989) suggérant ainsi l'existence d'une communication intercellulaire (Van Den Pol., 1982). En conséquence, les réponses du NPV à des stimuli particuliers requièrent une activité neuronale intégrée qui doit être, vraisemblablement, coordonnée entre et à l'intérieur des populations neuronales qui le constituent. Aussi, le NPV ne doit pas être défini comme une entité neuroanatomique fonctionnelle à unique vocation hypophysiotrope mais plutôt comme une structure hétérogène impliquée dans des processus physiologiques variés. Sa complexité biologique se reflète dans l'extraordinaire variété morphofonctionnelle des types cellulaires qui le constituent. La complexité de l'organisation neuroanatomique du NPV se reflète aussi au niveau des fonctions que ce noyau exerce. Ainsi, le NPV assure principalement le contrôle de deux fonctions neuroendocrinienne et végétative.

La vocation hypophysiotrope du NPV est liée à l'activité de ses neurones parvicellulaires. Leurs neurosécrétions déversées dans le sang porte hypophysaire influence la libération d'hormones par les cellules glandulaires du lobe antérieur de l'hypophyse. L'identité neurochimique de cette population neuronale est souvent associée à deux neuropeptides principaux, la CRH et la Thyrotropin-Releasing-Hormone. La CRH a été identifiée comme étant le candidat hypophysiotrope principal commandant la réponse hypophyso-surrénalienne au stress. Les neurones parvicellulaires à CRH se projettent dans la zone externe de l'éminence médiane pour former le système hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Wiegand et Prie., 1980; Lechan et al., 1982; Antoni et al., 1983; Swanson et al., 1983) et jouent un rôle majeur dans la sécrétion hormonale d'ACTH par le lobe antérieur de l'hypophyse (Antoni.,

1986) qui elle-même est responsable en périphérie de la libération des glucocorticoïdes par la surrénale.

Ces neurones endocrines parvicellulaires présentent une arborisation dendritique semblable à celle des neurones magnocellulaires avec des interactions dendritiques importantes entre ces deux populations (Van den Pol., 1982). Des techniques immunohistochimiques au niveau ultrastructural (Liposits et al., 1983-1985) ont montré que les neurones à CRH sont principalement localisés dans la région dorsale de la partie médiane parvicellulaire et présentent des épines somatiques et dendritiques où des contacts synaptiques de fibres afférentes peuvent s'effectuer. De plus, les axones magnocellulaires passent dans la région parvicellulaire et pourraient aussi établir des contacts synaptiques avec les neurones à CRH (Léranth et al., 1983).

Cette population neuronale parvicellulaire a aussi été identifiée sur le plan neurochimique par la présence de deux principaux neuropeptides, la CRH et la TRH qui définissent à eux deux les deux grandes populations parvicellulaires neuroendocriniennes du NPV (Antoni et al., 1983; Brownstein et al., 1982; Kawano et al., 1991). A ces deux populations neuronales s'ajoute un grand nombre de neurones à somatostatine qui se projettent sur l'éminence médiane externe (Kawano et Shigeo., 1988) et de neurones dopaminergiques, (Swanson et al., 1981; Kawano et Daikoku., 1987) lesquels se projettent respectivement sur le lobe intermédiaire et le lobe postérieur de l'hypophyse (Goudreau et al., 1995). Ces deux dernières populations neuronales périventriculaires sont proches du troisième ventricule (Swanson et al., 1986; Kiss et al., 1991). Malgré la présence d'une distinction plutôt stricte entre ces différentes populations, les neurones endocrines du NPV (toutes populations confondues) établissent des liens fonctionnels étroits par des contacts synaptiques réciproques formant un réseau complexe capable d'intégrer les diverses activités neuroendocriniennes. Ces connexions synaptiques ont été mises en évidence entre les neurones à CRH parvicellulaires et les neurones à TRH et somatostatine, et entre les neurones à ocytocine magnocellulaires et les neurones à somatostatine parvicellulaires (Hisano et al., 1992-1993-1995).

Par le peptide spécifique qui la caractérise, chaque population parvicellulaire semble pouvoir être individualisée sur le plan fonctionnel. Cependant, le phénotype chimique de ces neurones neurosécrétoires n'est pas immuable et peut évoluer selon les circonstances (Kiss et Palkovitz., 1984; Swanson et al., 1986). A cet égard, les neurones à CRH reflètent bien cette formidable capacité qu'ont les neurones en général à exprimer une variété importante d'autres neuropeptides dont l'expression dépend des conditions expérimentales. En conséquence, la cartographie biochimique de ces différentes populations neuronales parvicellulaires devra

toujours être établie en tenant compte de l'état physiologique de l'animal et éventuellement du sexe ou de l'espèce.

## **II. Contrôle nerveux de l'axe corticotrope**

Il existe des mécanismes hormonaux et aussi neuronaux qui permettent d'éviter tout débordement de la réponse hypothalamique, et de maintenir le taux de corticostérone plasmatique dans des limites tolérables pour l'organisme.

### ***1. Les circuits impliqués dans l'activation***

Selon les données anatomiques et pharmacologiques, il ne fait aucun doute que le système catécholaminergique du tronc cérébral participe au contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. En fait un stress aigu est capable d'induire une expression de la protéine Fos, en tant que marqueur de l'activité neuronale, dans les neurones catécholaminergiques du tronc cérébral et aussi du NPV ce qui suggère l'existence d'une relation fonctionnelle entre ces différents territoires (Chan et al., 1993; Cullinan., 1995). De plus, certaines études ont montré l'existence d'un rôle des neurones catécholaminergiques dans l'activité sécrétoire de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien après une hémorragie, ou une stimulation du système immunitaire (Plotsky et al., 1989; Ericsson et al., 1994). Ainsi, après une stimulation du système immunitaire, la lésion des voies catécholaminergiques entraîne la disparition de l'activité Fos dans le NPV. Cependant, après un choc électrique, l'expression de la protéine Fos dans le NPV ne semble pas inhibée par la section des voies catécholaminergiques (Li et al., 1996), ce qui suggère l'utilisation d'un circuit neuronal alternatif pour ce stresser. Les circuits neuronaux impliqués dans la réponse au stress semblent donc spécifiques de la nature du stresser.

Les voies excitatrices peuvent aussi faire participer les structures limbiques. Ainsi les lésions de l'amygdale provoquent une diminution de l'activité de l'axe corticotrope suite à une surrénalectomie bilatérale (Allen et Allen., 1975). De plus, des stimulations électriques de cette structure se traduisent par une libération de corticostérone (Dunn et Whitener., 1986). La lésion de l'amygdale se traduit par une chute de la réponse corticotrope à une stimulation phobique alors que la même lésion après un stress à l'éther est sans effet (Feldman., 1994). Ce résultat suggère encore une spécificité des voies neuronales en fonction de la nature du

stresseur.

Le noyau du lit de la strie terminale est une structure située à l'interface entre le système limbique et le NPV. Les lésions du noyau du lit de la strie terminale se traduisent par une diminution de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien induite par la peur (Gray., 1993), tandis qu'une stimulation provoque une libération de corticostérone (Dunn., 1987). Cette structure est considérée comme un relais de l'information limbique à destination du NPV (Moga et al., 1989).

L'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien peut concerner aussi le locus coeruleus (noradrénergique) et le noyau du raphé dorsal (sérotoninergique). Ces deux structures sont fortement impliquées dans la réponse du cerveau au stress (Gann., 1977; Dunn., 1987; Cullinan., 1995) mais leur projection sur le NPV est plutôt limitée. Ces deux structures peuvent alors influencer indirectement l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien par des structures cérébrales relais.

L'acétylcholine et le glutamate sont aussi capables de stimuler le NPV. Des récepteurs de type AMPA, NMDA et kaïnate ont été mis en évidence sur les neurones parvicellulaires du NPV (Decavel et Van den Pol., 1992; Van den Pol., 1994), mais l'origine de l'innervation glutamatergique reste à identifier. L'innervation cholinergique dans le NPV est extrêmement faible suggérant que l'action de l'acétylcholine sur le noyau passe par des voies nerveuses locales hypothalamiques (Ruggiero, 1990).

## ***2. Les circuits impliqués dans l'inhibition***

Le facteur limitant le plus important dans la réponse hypothalamique au stress est représenté par les glucocorticoïdes. Pour maintenir leur propre concentration plasmatique dans un intervalle tolérable pour l'organisme, les glucocorticoïdes sont capables de rétroagir sur les neurones parvicellulaires du NPV afin de freiner l'activité de l'axe corticotrope. Plusieurs chemins d'accès aux neurones endocrines du NPV sont plausibles. Ils peuvent être directs sur les neurones parvicellulaires eux-mêmes (Whitnall., 1993) ou indirects par l'hippocampe. La capacité des glucocorticoïdes à inhiber les neurones parvicellulaires est évoquée par l'existence de leurs récepteurs sur les neurones parvicellulaires (Uht., 1988). Cependant l'inhibition de l'activité de l'axe peut se produire en l'absence de toute rétro-action négative exercée par les glucocorticoïdes (Jacobson et al., 1989). En conséquence, l'inhibition peut se produire par voie neuronale. De plus, la totale désafférentation du NPV se traduit par une activation de l'ARNm CRH et AVP, soulignant alors l'existence d'une inhibition

neuronale tonique sur l'axe corticotrope (Herman et al., 1990). L'hippocampe contient des récepteurs de haute affinité aux glucocorticoïdes et semble jouer le rôle de garde fou de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Des lésions de l'hippocampe se traduisent par une potentialisation de la sécrétion de corticostérone induite par un stress, alors qu'une stimulation provoque une inhibition de l'axe corticotrope (Herman et al., 1989; Jacobson et Sapolsky., 1991). L'ensemble de ces données donne à l'hippocampe une place essentielle dans le contrôle de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien par des structures supérieures. Cependant, la participation de l'hippocampe à la réponse de l'axe n'est pas toujours vérifiée. En effet, les lésions de l'hippocampe potentialisent l'augmentation de l'ACTH et de la corticostérone plasmatique après un stress d'immobilisation, mais sont inefficaces dans les réponses ACTH et corticostérone à l'hypoxie (Bradbury et al., 1993).

Ces actions inhibitrices sont aussi exercées par le noyau arqué, l'aire préoptique médiane, le noyau suprachiasmatique et le noyau ventromédian (Viau et Meaney., 1991; Buijs., 1993; Larsen., 1994; Suemaru., 1995). En effet, la lésion de chacune de ces régions provoque une augmentation de la sécrétion basale de corticostérone et augmente l'amplitude et la durée de la réponse hypothalamique au stress. La participation de ces structures hypothalamiques dans la médiation des effets inhibiteurs des glucocorticoïdes sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est illustrée par l'effet de la corticostérone qui, administrée dans l'aire préoptique médiane, inhibe les réponses hypothalamiques à un stress d'immobilisation.

### ***3. Le contrôle catécholaminergique***

Les relations neuroanatomiques étroites des systèmes catécholaminergique et sérotoninergique avec le NPV et tout particulièrement avec les neurones à CRH donnent une importance de premier ordre à chacun de ces systèmes dans le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

La région catécholaminergique A1 est fortement impliquée dans le contrôle de l'homéostasie cardiovasculaire (Ciriello et al., 1986; Reis., 1986). Des stimulations électriques de la région A1, augmentent l'activité des neurones AVP magnocellulaires dans le NPV (Day et al., 1984-1985) et évoquent une élévation des taux plasmatiques de l'AVP (Blessing et Willoughby., 1985; Kubo et al., 1985). Des effets similaires ont été observés après stimulation de la région A2 (Day et al., 1984; Kubo et Maso., 1984) montrant ainsi que des fibres originaires de cette région innervent la région magnocellulaire, et sont

capables de stimuler directement la population des neurones à AVP. La région A2 du noyau du tractus solitaire possède un rôle clé dans la régulation des processus cardiovasculaires (Palkovits et Zaborszky., 1977). En effet, la libération d'ACTH induite par une hémorragie peut être prévenue par une lésion électrolytique du noyau du tractus solitaire mais aussi des régions A1 et C1 (Darlington et al., 1986; Carlson et Gann., 1987).

Le noyau du tractus solitaire peut recevoir des projections somatosensorielles via le tractus spinosolitaire (Menetrey et Basbaum., 1987) et jouer alors un rôle dans les interactions somato-viscérales, comme celle des réponses CRH-ACTH à un stimulus douloureux (Feldman et Conforti., 1981). En effet, une stimulation des nerfs trijumeaux se traduit par une potentialisation de la réponse ACTH à une hémorragie (Bereiter et al., 1982). Par contre, Bereiter et al., (1982) soulignent que le stimulus douloureux seul est incapable de provoquer une augmentation d'ACTH, suggérant ainsi que les mécanismes responsables de cette potentialisation sont extrêmement complexes.

Le locus coeruleus (A6) est un candidat potentiel pour médier l'information nociceptive aux neurones du NPV. En effet, l'activité cellulaire du locus coeruleus augmente fortement après un stimulus douloureux et donc stressant (Foote et al., 1983).

Les neurones du locus coeruleus sont sensibles aux variations des paramètres cardiovasculaires (Ward et al., 1980) et la lésion électrolytique du locus coeruleus se traduit par une inhibition de l'effet dépressif exercé par les barorécepteurs sur l'activité des neurones hypothalamiques (Banks et Harris., 1984). L'ensemble de ces données essentiellement électrophysiologiques est en faveur d'un rôle stimulateur des projections catécholaminergiques sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

Les données pharmacologiques sont plus contradictoires. L'injection intracérébroventriculaire d'agonistes ou d'antagonistes catécholaminergiques se traduit par des effets inhibiteurs toniques (Scapagnini et al., 1972; Ganong et al., 1976) ou facilitateurs (Abe et Hiroshige., 1974; Al-Damluji et al., 1990; Kiss et Aguilera., 1992) sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Chez le rat, l'injection intracérébroventriculaire de clonidine ( $\alpha_2$  agoniste) et de noradrénaline inhibe l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Cette inhibition est stoppée par l'utilisation d'yohimbine ( $\alpha_2$  antagoniste) (Weiner et Ganong., 1978). Ce résultat est en complète contradiction avec d'autres (Abe et Hiroshige., 1974; Szafarczyk et al., 1987) où il est montré que l'injection de noradrénaline ou de phényléphrine en intracérébroventriculaire se traduit par une activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, effet pouvant être bloqué par immunoneutralisation du CRH mais pas de l'AVP

(Takao et al., 1988). Cette activation de l'axe corticotrope pouvait être reproduite par une injection intracérébroventriculaire de méthoxamine ( $\alpha 1$ -agoniste) (Al-Damluji et al., 1990; Kiss et Aguilera., 1992). L'utilisation de la prazosine ( $\alpha 1$ -antagoniste) permet d'inhiber la libération de CRH et d'ACTH (Al-Damluji et al., 1990; Kiss et Aguilera., 1992). Le propranolol ( $\beta$ -bloquant) injecté en intracérébroventriculaire augmente la sécrétion d'ACTH. Toutefois l'injection d'un agoniste de type  $\beta$  n'a aucun effet. De plus, l'injection intracérébroventriculaire de  $\beta$ -bloquant se traduit par une inhibition de la synthèse d'ACTH (Takao et al., 1988; Plotsky., 1987).

L'activation des voies ascendantes catécholaminergiques durant un stress augmente la libération de noradrénaline dans le NPV (Pacak et al., 1992; Vetrugno et al., 1993). De plus, l'injection intracérébroventriculaire ou locale dans le NPV d'agoniste  $\alpha 1$  se traduit par une libération d'ACTH et de CRH (Al-Damluji et al., 1990; Kiss et Aguilera., 1992), effet bloqué par un antagoniste  $\alpha 1$  (Kiss et Aguilera., 1992). En conséquence, les voies catécholaminergiques ascendantes en provenance du tronc cérébral et se projetant dans le NPV peuvent moduler l'expression de la CRH dans les neurones parvicellulaires, à travers semble-t-il les récepteurs  $\alpha 1$ , et être ainsi impliquées dans l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en réponse au stress.

La déplétion du contenu hypothalamique en catécholamines par inhibition de leur synthèse ou section des voies afférentes par des procédés physiques ou chimiques altère l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Le blocage spécifique de la synthèse d'adrénaline par un inhibiteur de la phényléthanol-amine-N- méthyltransférase se traduit par une augmentation du nombre de cellules immunoréactives à la CRH, 5 jours après le traitement, ce qui est interprété comme une perte du contrôle inhibiteur exercé par l'adrénaline sur la synthèse de la CRH (Mezey et al., 1984). Par opposition, Spinedi et NegroVillar., (1983) montrent une réduction parallèle dans le contenu hypothalamique de CRH et d'adrénaline 12 heures après le traitement par un inhibiteur de la phényléthanol-amine-N-méthyltransférase sans changer toutefois le taux plasmatique basal d'ACTH. En accord avec ces résultats, Sawchenko., (1988) note une diminution de l'immunoréactivité CRH dans l'éminence médiane externe et le NPV 14 jours après section des voies ascendantes (faisceau médian du télencéphale). A l'inverse, des transections similaires ne provoquent pas de variation de l'expression de l'ARNm CRH (Swanson et Simmons., 1989), suggérant alors que les catécholamines agissent sur les mécanismes post-transcriptionnels et de maturation de la préproCRH.

Par ailleurs, la réponse ACTH induite par un stress est atténuée après transection des



voies noradrénergiques (Szafarczyk et al., 1985; Gaillet et al., 1991-1993). Ce phénomène est réversible après injection intracérébroventriculaire de noradrénaline (Szafarczyk et al., 1985; Barbanel et al., 1991). La libération de noradrénaline dans le NPV a été mesurée par microdialyse et les différents paramètres hormonaux d'activation de l'axe corticotrope ont été évalués en périphérie chez des rats soumis à différents stressseurs: l'immobilisation, l'exposition au froid, l'hémorragie, l'hypoglycémie provoquée par injection d'insuline et un stimulus douloureux. Tous les stressseurs utilisés provoquent une augmentation de noradrénaline et de ses métabolites dans le NPV ainsi qu'une sécrétion d' ACTH et de corticostérone. Cependant, les niveaux de noradrénaline sont plus importants après une immobilisation et un stimulus douloureux. Les concentrations d'ACTH sont quant à elles plus importantes après l'hypoglycémie provoquée par injection d'insuline et hémorragie et les concentrations de corticostérone sont plus importantes suite à une immobilisation, une hémorragie ou un stimulus douloureux. Ainsi, sauf pour le choc thermique et l'hémorragie, il existe une forte corrélation positive entre l'activation du système noradrénergique et l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Pacak et al., 1993).

#### ***4. Le contrôle sérotoninergique***

La participation de la sérotonine dans les réponses neuroendocriniennes du NPV au stress est très controversée. La déplétion par la p-chlorophényl-alanine de la sérotonine dans l'hypothalamus ne provoque aucune variation de l'expression de l'ARNm c-fos et CRH dans le NPV ainsi que des taux plasmatiques d'ACTH chez l'animal normal ou stressé après une injection d'une solution saline hypertonique ou un stress de contention ou une stimulation immunitaire (Harbuz et al., 1993; Conde et al., 1998). Des résultats opposés ont montré que la sérotonine pouvait stimuler l'expression de l'ARNm CRH dans le NPV hypothalamique par des récepteurs de types 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>3</sub> présents sur les neurones à CRH (Laflamme et al., 1996; Kageyama et al., 1998). De plus, la libération d'ACTH induite par différents stress (immobilisation, éther, nage forcée ou stress immun) peut être modulée par les voies sérotoninergiques du noyau du raphé (Jorgensen et al., 1998). Ces nombreux désaccords sont certainement dus aux différents procédés expérimentaux utilisés pour étudier la participation du système sérotoninergique dans le contrôle de l'activité de l'axe corticotrope.

### ***5. Le contrôle de l'axe corticotrope par un éventuel nouveau neurotransmetteur cérébral, l'Anandamide***

L'éthanolamide d'Arachidonyl, également appelé l'anandamide (ANA) est un cannabinoïde endogène isolé à partir du cerveau de porc (Devane et al., 1992). Des études pharmacologiques ont indiqué que l'ANA mime le composé psychoactif de la marijuana qui est le tétrahydrocannabinol  $\Delta^9$  (THC) même si leurs structures chimiques sont tout à fait différentes (Kulkarni S.K. et al., 1996). L'ANA se lie de manière spécifique au récepteur cannabinoïde présent dans le cerveau, le récepteur CBI (Devane et al., 1992). Plusieurs régions du système nerveux central expriment des taux élevés du récepteur CBI comme le cervelet, l'hippocampe, le striatum (Herkenham, 1995), et contiennent des concentrations relativement élevées d'ANA. Ces données parmi d'autres (Perwee, 1995) indiquent que l'ANA est probablement un neurotransmetteur spécifique du récepteur CBI.

Par ailleurs, des données indiquent que les cannabinoïdes endogènes et exogènes peuvent stimuler la fonction corticosurrénalienne, par l'intermédiaire d'un mécanisme central non encore déterminé (Puder et al., 1982 ; Weidenfeld et al., 1994).

Les travaux de Wenger et al. (1997) avaient pour objectif d'identifier le ou les sites hypothalamiques où l'ANA pourrait activer l'axe HHS en utilisant l'expression de la protéine FOS comme indice d'activation cellulaire et l'immunohistochimie comme approche morphofonctionnelle pour détecter les sites d'une telle expression grâce à des anticorps anti-FOS. Le C-FOS, étant un gène précoce rapidement induit suite à un stimulus externe et une activation synaptique, se lie à des sites spécifiques dans le génome pour moduler le taux de transcription de gènes (Hofman et al., 1993). Ainsi l'induction du FOS a été employée couramment comme marqueur de l'activité neuronale dans le SNC. L'ANA administré chez le rat par voie intrapéritonéale stimule l'expression de la protéine FOS (45 min après l'injection) dans les neurones la partie parvicellulaire du NPV hypothalamique (Wenger et al., 1997). Parallèlement à cette stimulation FOS, Les taux sériques d'ACTH et de corticostérone, mesurés par dosage radioimmunologique, augmentent également de manière significative (Wenger et al., 1997).

Ces données montrent que le site d'action de l'ANA pour l'activation de l'axe HHS est la partie parvicellulaire du NPV. Cette activation peut se produire par l'intermédiaire d'un récepteur central possible des cannabinoïdes pour lequel le SR 141716 (antagoniste sélectif et efficace de récepteurs au cannabinoïde) n'est pas un antagoniste efficace (Wenger et al., 1997).

### **III. Le contrôle humoral de l'axe corticotrope par les glucocorticoïdes (Figure 2, page 32)**

Le stress déclenche l'ensemble des réponses neuroendocriniennes dont la résultante est une sécrétion d'ACTH par l'adénohypophyse et de corticostérone par la glande surrénale. C'est l'activité des neurones à CRH du NPV qui détermine le niveau de la réponse endocrinienne hypophysaire et surrénalienne. La sécrétion de glucocorticoïdes est un élément clé dans la réponse au stress, en ce sens qu'ils jouent un rôle essentiel dans l'établissement de réponses physiologiques adaptées au stress en agissant à différents niveaux des systèmes physiologiques existants. L'une de leurs actions est de contrôler leur propre niveau de sécrétion en autorégulant leur synthèse par action sur l'hypothalamus et plus précisément sur les neurones à CRH. Ce rétrocontrôle des glucocorticoïdes prévient d'éventuelles surproductions de ces hormones stéroïdiennes dont l'effet peut être délétère pour l'organisme (hypertension, immunosuppression, ostéoporose, désordres cognitifs). Leur rôle de "garde-fou" de l'activité de l'axe corticotrope s'exerce sur différents sites neuronaux.

#### ***1. Le rôle des neurones à CRH***

Dans les conditions physiologiques, il existe un pattern circadien dans la sécrétion de corticostérone plasmatique (Krieger., 1975-1977; Ruhmann-Wennhold et Nelson., 1977). Les niveaux les plus bas se situent le matin et les plus élevés en début de soirée. De nombreux facteurs peuvent moduler les concentrations de corticostérone. Ainsi, des lésions du noyau suprachiasmatique (horloge circadienne) altèrent les oscillations stéroïdiennes plasmatiques (Krieger et al., 1977; Cascio et al., 1987). Les projections catécholaminergiques et sérotoninergiques du raphé dorsal semblent aussi influencer le rythme circadien endocrine (Szafarczyk et al., 1985; Feldman et al., 1987). Ces oscillations stéroïdiennes semblent essentielles au maintien de l'activité basale de l'axe corticotrope (Jacobson et al., 1988).

Chez un animal surrénalectomisé, les taux d'ACTH sont très élevés. Pour maintenir cette concentration à un niveau identique à celui observé chez l'animal normal, il est nécessaire de supplémenter l'animal en corticostérone avec des taux qui peuvent être différents si l'expérimentation se déroule le matin ou le soir (Dallman et al., 1987). En effet, le matin, des concentrations basses de corticostérone sont suffisantes pour maintenir un niveau de sécrétion d'ACTH semblable à celui d'un animal normal (Akana et al., 1986). Cependant,

les taux qui doivent être utilisés le soir pour maintenir une concentration d'ACTH normale s'avèrent être considérablement plus élevés. Ce résultat suggère donc que les effets inhibiteurs des glucocorticoïdes sont considérablement diminués au cours du rythme circadien. Ce phénomène est peut-être dû à des influences stimulatrices nerveuses ou hormonales sur la sécrétion d'ACTH qui pourraient interagir avec l'effet rétrocontrôle inhibiteur des glucocorticoïdes au cours du rythme circadien (Dallman et al., 1987).

Il paraît donc évident que le rythme circadien de la fonction corticotrope résulte d'une interaction complexe entre des éléments neuronaux et endocriniens.

Ce sont des études pharmacologiques qui ont montré que les récepteurs de type I pouvaient intervenir de façon plus évidente que les récepteurs de type II dans la régulation basale de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Ratka et al., 1989). De plus, le rétrocontrôle en soirée des glucocorticoïdes paraît impliquer plus profondément les récepteurs de type I (Dallman et al., 1989). En tenant compte de la répartition neuroanatomique de ces récepteurs, il paraît certain que les mécanismes de rétrocontrôle des glucocorticoïdes sur le système nerveux central sont extrêmement complexes. En effet, le rétrocontrôle peut se produire à quatre niveaux anatomiques essentiels. Les glucocorticoïdes peuvent agir directement au niveau pituitaire pour inhiber la synthèse ou la libération d'ACTH (Schacter et al., 1982; Bienberg et al., 1982; Keller et Dallman., 1984; Widamair et Dallman., 1984; Dayanithi et Antoni., 1989). Ce rétrocontrôle fait participer les récepteurs de type II (Funder., 1984; Mc Ewen et al., 1986) dont la localisation dans les cellules corticotropes hypophysaires a été démontrée (Antakly et Eisen., 1984). Cependant, ces effets inhibiteurs peuvent se produire par l'intermédiaire d'autres régions extra-hypothalamiques. Ainsi, la présence de récepteurs de type II sur les neurones catécholaminergiques du tronc cérébral donne à cette population neuronale la possibilité de médier les effets inhibiteurs des glucocorticoïdes sur l'activité de l'axe corticotrope (Sawchenko., 1988). De plus, les récepteurs de type I présents dans l'hippocampe sont considérés comme des sites essentiels dans le contrôle inhibiteur tonique de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Ratka et al., 1989).

La présence de récepteurs de type II dans le NPV, tout particulièrement dans les neurones à CRH (Agnati et al., 1985) et les effets excitateurs de la surrénalectomie, ou inhibiteurs de la corticostérone sur l'expression de l'ARNm CRH ont largement contribué à attribuer au NPV une place privilégiée dans le rétrocontrôle inhibiteur des glucocorticoïdes sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Jingami et al., 1985). La section des voies

hypophysiotropes du NPV chez des animaux surrénalectomisés n'a pas d'effet sur la synthèse et la sécrétion d'ACTH hypophysaire et conforte l'idée que des éléments neuronaux situés en amont de l'hypophyse (hippocampe et NPV) interviennent comme des sites essentiels dans le processus de rétrocontrôle des glucocorticoïdes (Dallman et al., 1989). Cependant au niveau hypophysaire, il a été montré une action inhibitrice des glucocorticoïdes sur les effets excitateurs de l'AVP et de la CRH sur la sécrétion d'ACTH par des cellules hypophysaires en culture (Russel et al., 1969). Cette action des glucocorticoïdes se ferait en prévenant la fixation de la CRH sur son récepteur pituitaire, fournissant alors un mécanisme de rétrocontrôle inhibiteur des glucocorticoïdes au niveau hypophysaire (Childs et al., 1986; Schwartz et al., 1986).

Au cours du rythme circadien, les fluctuations des concentrations d'ACTH et de corticostérone sont sinusoïdales et parallèles. L'expression de l'ARNm de la CRH augmente graduellement du matin au soir et précède toujours les variations sécrétoires, puis chute brusquement lorsque le pic de corticostérone devient élevé (Kwak et al., 1992). La surrénalectomie ne prévient pas la diminution de l'ARNm de la CRH le soir. Cependant, le matin, l'expression est considérablement augmentée et cet effet est réversible par de faibles concentrations de corticostérone. Les variations diurnes de l'ARNm de la CRH sont donc sous la dépendance des glucocorticoïdes le matin mais pas le soir (Kwak et al., 1993). Le rythme alimentaire a souvent été associé au rythme diurne de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Krieger et Hauser., 1978). Ainsi, la privation de nourriture pendant 4 jours diminue les niveaux d'ARNm CRH dans le NPV par comparaison avec un animal nourri de libitum (Brady et al., 1990). Il serait alors possible de penser que la diminution de l'expression de l'ARNm CRH en soirée soit sous la dépendance de processus physiologiques en relation avec le comportement alimentaire.

En tenant compte d'une régulation temporelle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien qui a largement été démontrée (Keller et Dallman., 1984), la corticostérone peut inhiber la sécrétion et la biosynthèse de CRH par des mécanismes cellulaires différents. Ainsi, il a été mis en évidence un effet rapide du rétrocontrôle des glucocorticoïdes sur la sécrétion de CRH dans les minutes qui suivent leur application ou l'établissement d'un stress bref. Cette inhibition apparaît être dépendante de la concentration de corticostérone plasmatique (Dallman et Yates., 1969; Jones et al., 1972; Keller et Dallman., 1984; Jacobson et Sapolsky., 1991). Une inhibition à plus long terme de l'expression de l'ARNm de la CRH semble être dépendante de la concentration absolue et de la durée d'exposition aux

glucocorticoïdes (Keller et Dallman., 1984). Ce rétrocontrôle est génomique en ce sens qu'il affecte la synthèse de la CRH en se fixant sur des récepteurs cytosoliques dont le rôle est de moduler la transcription de gènes cibles en agissant sur des sites nucléaires spécifiques régulateurs (glucocorticoïd response element ou GRE).

La surrénalectomie stimule l'expression de l'ARNm CRH dans le NPV (Swanson et Simmons., 1989). Cet effet est réversible après injection systémique de corticostérone ou de dexaméthasone (un agoniste des récepteurs de type II). Un effet dose dépendant des glucocorticoïdes sur l'expression de l'ARNm CRH a été largement démontré (Young et al., 1986; Swanson et Simmons., 1989; Watts et Sanchez-Watts., 1995b). La régulation de cette expression peut se faire au niveau des cellules à CRH où de nombreux récepteurs de type II ont été mis en évidence (Agnati et al., 1985; Swanson et Simmons., 1989). L'injection systémique ou locale dans le NPV de dexaméthasone est capable d'inhiber la synthèse de CRH mais de façon surprenante, la corticostérone appliquée localement dans le NPV est incapable à de faibles doses d'inhiber la synthèse de CRH (Kovacs et Mezey., 1987; Sawchenko., 1987a-1987b-1987c). Ce résultat laisse envisager la présence d'intermédiaires dans l'action obligatoire de la corticostérone sur l'activité de l'axe corticotrope (relation hippocampe-hypothalamus).

La complexité des mécanismes de régulation par la corticostérone, de l'expression de l'ARNm de la CRH prend toute son ampleur lorsque l'on s'intéresse aux modifications d'expression de l'ARNm de la CRH dans d'autres types cellulaires. Ainsi, la CRH est aussi présente dans le noyau du lit de la strie terminale (partie latérale), la région centrale de l'amygdale et à un moindre degré dans l'hypothalamus latéral, le bulbe olfactif, le cortex pré frontal et cingulaire. Dans les régions du tronc cérébral près du locus coeruleus (noyau de Barrington, centre de contrôle de la miction) sa présence a été montrée (Swanson et al., 1983; Gray., 1990; Valentino et al., 1993; Valentino., 1994). La corticostérone est capable de stimuler l'expression de l'ARNm de la CRH dans la partie dorsale parvicellulaire du NPV, l'amygdale et le noyau du lit de la strie terminale. Cependant dans le néocortex, le noyau de Barrington et l'hypothalamus latéral, la corticostérone n'a pas d'effet sur l'expression de la CRH (Swanson et Simmons., 1989; Imaki et al., 1991; Makino et al., 1995; Watts et Sanchez-Watts., 1995b). De plus, des chocs électriques répétés montrent une augmentation de l'expression de l'ARNm de la CRH dans le noyau Barrington et le NPV avec une diminution dans le bulbe olfactif (Imaki et al., 1991). Ces résultats montrent l'existence d'une

régulation différentielle régionale spécifique des glucocorticoïdes sur l'expression de l'ARNm CRH.

## ***2. Le rôle de l'hippocampe***

De nombreuses études montrent que la formation hippocampique joue un rôle important dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Des lésions de l'hippocampe ou des voies efférentes (fornix) provoquent une hypersécrétion de corticostérone et d'ACTH (Fendler et al., 1961; Knigge., 1961; Wilson et al., 1980; Sapolsky et al., 1984). Cette augmentation de l'activité de l'axe se traduit aussi au niveau hypothalamique par une augmentation de l'expression de l'ARNm de la CRH et de l'AVP dans la région parvicellulaire du NPV (Herman et al., 1989). L'application iontophorétique de glucocorticoïdes sur l'hippocampe supprime la réponse au stress, tandis que l'application d'antagonistes augmente la concentration de corticostérone plasmatique (Bradbury et Dallman., 1989). Une réduction du nombre des récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe est associée à une hypersécrétion de glucocorticoïdes suite à un stress (Sapolsky et al., 1989). De plus, il semble exister une relation inverse entre le taux hippocampique de récepteurs aux glucocorticoïdes et le taux circulant de CRH hypophysaire (Sapolsky et al., 1990). Dans un autre contexte, des stimulations électriques de l'hippocampe sont capables de diminuer la concentration plasmatique de corticostérone (Dunn et Orr., 1984). L'ensemble de ces données laisse fortement supposer l'existence d'un contrôle inhibiteur tonique de l'hippocampe sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, médié vraisemblablement par les glucocorticoïdes circulants.

## **IV. Les relations entre glucocorticoïdes et catécholamines centrales dans le contrôle de l'axe corticotrope**

Un excès de glucocorticoïdes inhibe la libération et la synthèse de la CRH du NPV (Frim et al., 1990; Makino et al., 1995) et augmente le turnover hypothalamique de noradrénaline (Nakagawa et al., 1983; Pacak et al., 1992). La transection bilatérale des voies ascendantes noradrénergiques diminue l'expression de l'ARNm de la CRH et cette lésion bloque l'augmentation de l'ARNm de la CRH suite à un stress d'immobilisation (Pacak et al., 1995). La surrénalectomie augmente la libération, induite par le stress d'immobilisation, de

noradrénaline dans le NPV. De plus, des implants de corticostérone sont capables de reverser ces effets (Pacak et al., 1993). La présence de récepteurs aux glucocorticoïdes sur les neurones aminergiques du tronc cérébral a aussi été démontrée (Harfstrand et al., 1986). De plus, la densité des récepteurs  $\alpha 2$  dans le NPV est corrélée positivement aux concentrations hormonales de glucocorticoïdes à l'inverse des récepteurs de type  $\alpha 1$  (Cummings et Seybold., 1988). Cependant, il a été montré une action faible mais stimulatrice des glucocorticoïdes sur l'expression des récepteurs  $\alpha 1$  (Plotsky., 1987). L'ensemble de ces données suggère fortement que les glucocorticoïdes peuvent inhiber la synthèse de l'ARNm de la CRH par l'intermédiaire des voies aminergiques. Cependant, ces résultats ne sont pas forcément toujours vérifiés. Ainsi, la lésion des voies ascendantes fait bien baisser l'expression de l'ARNm de la CRH chez le rat normal. Par contre, chez l'animal surrénalectomisé, bien que l'expression de l'ARNm de la CRH soit baissée après transection, la surexpression due à la surrénalectomie reste encore présente (Sawchenko., 1988). La régulation de l'ARNm de la CRH par les glucocorticoïdes fait donc participer les voies catécholaminergiques, mais il semblerait plutôt que l'effet dominant des glucocorticoïdes implique d'autres structures telles que l'hippocampe et le NPV.

## **V. Les relations entre glucocorticoïdes et cytokines dans le contrôle de l'axe corticotrope**

Après une stimulation du système immunitaire, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien peut être activé pendant plusieurs jours (Besedovsky et al., 1986). L'animal présente un hypercorticisme et est devenu résistant au rétrocontrôle des glucocorticoïdes. La stimulation du système immunitaire se traduit par une libération de diverses cytokines dont les plus importantes sont l'interleukine-1 (IL-1) , l'interleukine6 (IL-6) et le Tumeur Necrosis Facteur- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). L'IL-1 stimule l'axe corticotrope (Berkenbosch et al., 1987). Cette stimulation s'effectue au niveau des cellules à CRH du NPV via des mécanismes qui restent à élucider. Cependant, la stimulation de l'axe par les cytokines peut aussi s'exercer sur l'hypophyse et la corticosurrénale (Koenig et al., 1990; Andreis et al., 1991). Les glucocorticoïdes agissent en retour sur le système immunitaire en inhibant la synthèse de nombreuses cytokines (IL-2 et INF $\gamma$ ) lesquelles sont essentielles pour la prolifération des lymphocytes T (Heath et al., 1992). Ils peuvent aussi programmer la mort cellulaire des lymphocytes T et B immatures et des lymphocytes T matures (Zubiega et al., 1992) et inhiber



la production d'interféron de type a par les monocytes (Rossol et al., 1989). Les glucocorticoïdes exercent donc un effet immunosuppresseur certain sur l'activité du système immunitaire.

L'hyperactivité de l'axe corticotrope suite à une stimulation du système immunitaire a été interprétée comme une conséquence des effets délétères des cytokines sur l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes de type I dans l'hippocampe. Ces récepteurs ont un rôle important dans le maintien de l'activité basale de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et d'une certaine sensibilité de cet axe au stress (Ratka et al., 1989). Par leur intermédiaire l'hippocampe évite que l'axe corticotrope ne s'emballe. En conséquence, le blocage ou la diminution numérique des récepteurs de type I modifie le rétrocontrôle des glucocorticoïdes sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Une stimulation du système immunitaire provoque une déficience en récepteurs de type I sans que le nombre de récepteurs de type II soit modifié (Schübitz et al., 1994). Ainsi, l'augmentation de l'activité de l'axe corticotrope et la résistance au rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes au cours d'une stimulation du système immunitaire peut être dû aux effets délétères des cytokines sur les récepteurs de type I hippocampiques. C'est ce déséquilibre entre les récepteurs de type I et de type II qui peut expliquer l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien au cours de la réponse immune.

## **VI. Relation entre le stress et la plasticité phénotypique des neurones du NPV**

La CRH au niveau du NPV est considérée comme l'acteur principal dans le contrôle de l'axe corticotrope suite à un stress. Ainsi, les neurones à CRH ont une grande capacité à coexprimer d'autres neuropeptides et de ce fait ces neurones constituent un prototype cellulaire pour l'étude de la colocalisation de neuropeptides. Parmi les neuropeptides associés à la CRH dans les neurones parvicellulaires du NPV, on peut trouver la Neurotensine (NT), la cholécystokinine (CCK), la vasopressine (AVP), l'enképhaline, et l'angiotensine- II (Ceccatelli et al., 1989b; Hökfelt et al., 1984-1987; Pretel et Piekut., 1990; Sawchenko et al., 1984a-1984b; Swanson et al., 1986). Cette diversité dans l'expression phénotypique peut aussi s'observer à un moindre degré, dans les neurones magnocellulaires du NPV. En effet, les neurones ocytocinergiques ou vasopressinergiques peuvent dans certaines circonstances physiologiques synthétiser respectivement de la CRH, de l'enképhaline, de la CCK ou de la

dynorphine, de la galanine (Lightman et Young., 1987; Villar et al.1990; Watts., 1992a-1992b). Afin de visualiser ces neuropeptides dans les neurones à CRH, le recours à des injections intracérébroventriculaires de colchicine a été nécessaire pour favoriser l'accumulation du peptide dans les corps cellulaires et, permettre ainsi sa détection par diverses techniques immunohistochimiques.

Les neurones de la région médiane parvicellulaire du NPV contiennent dans les conditions basales surtout de la CRH et de l'enképhaline et à un moindre degré de l'AVP, de la CCK et de l'ocytocine (OXY) (Swanson et Simmons., 1989; Ceccatelli et al., 1991; Watts et Sanchez-Watts., 1995a; Condes-Lara et al., 2003). Cependant, dans certaines circonstances d'activation de l'axe corticotrope, la synthèse des ARNm de l'AVP, de la CCK et de l' OXY peut augmenter rapidement (Lightman et Young., 1987; Bartanusz et al., 1993; Watts et Sanchez-Watts., 1995a-1995b; Giovannelli et al.,1992).

La NT parvicellulaire du NPV est sujette à des fluctuations suite à un stress. Ainsi l'expression de l'ARNm de la NT est induite par un choc hypovolémique ou un stress à l'éther (Watts., 1991; Watts et Sanchez-Watts., 1995a ). La NT peut participer à la réponse des neurones à CRH , elle pourrait être libérée par les neurones à CRH et agir par une action paracrine sur les terminaisons nerveuses présynaptiques et intervenir ainsi dans l'activité de l'axe corticotrope.

la CCK parvicellulaire peut aussi être impliquée dans la réponse corticotrope à une forte stimulation. En effet, une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide provoque une forte synthèse de l'ARNm CCK dans les neurones à CRH parvicellulaires (Juaneda et al., 2001). Plusieurs arguments ont donné à la CCK un rôle hypophysiotrope. En effet, elle est présente dans les neurones à CRH (Ceccatelli et al., 1989b) et dans les mêmes granules sécrétoires contenant la CRH (Juaneda et al., 1999a). En conséquent, La CCK peut agir en synergie avec la CRH pour réguler la sécrétion d'ACTH hypophysaire (Porter et Sander., 1981; Reisine et Jensen., 1985; Mezey et al., 1985).

L'AVP peut aussi participer dans certains cas à la réponse corticotrope à une stimulation de l'axe corticotrope. En fait, l'AVP peut être colocalisée avec la CRH dans les neurones parvicellulaires du NPV chez le rat surrénalectomisé (Tramu et al., 1983; Kiss et al., 1984; Sawchenko et al., 1984b) et dans les mêmes granules sécrétoires des terminaisons nerveuses de l'éminence médiane externe, suggérant alors une libération concomitante des deux neuropeptides dans le sang porte. De plus, l'AVP et la CRH stimulent la sécrétion d'ACTH hypophysaire ( Gillies et al., 1982; Turkelson et al., 1982; Vale et al., 1983).

## VII. Objectifs du travail

La plasticité neuronale du NPV parvicellulaire peut être solidement représentée par la plasticité des neurones à CRH qui constituent un prototype cellulaire unique pour l'étude de la plasticité sécrétoire. Ces neurones parvicellulaire ont la possibilité de moduler en fonction des conditions environnementales l'expression d'autres neuropeptides dits accessoires : l'AVP, la CCK, la NT et l'OXY. Cette flexibilité dans l'expression neuropeptidique semble indispensable pour une adaptation sécrétoire dans le but de déclencher une réponse hypophysaire en adéquation avec différents types de stressseurs, et peut-être aussi avec l'espèce. C'est ce concept de plasticité des systèmes neuroendocriniens hypothalamiques lié au stress environnemental que nous évaluons sur un modèle animal très intéressant pour ce genre d'études, la gerboise en captivité.

Cette espèce représente un matériel biologique intéressant pour évaluer et comprendre un certain nombre de régulations neuroendocriniennes liées à l'environnement en particulier pour étudier la plasticité phénotypique des neurones à CRH, à CCK, à AVP et à OXY dans le NPV parvicellulaire suite à un stress neurogénique d'immobilisation.

La gerboise est un rongeur subdésertique sauteur de la famille des Jaculidae, de l'ordre des Rodentia. Elle vit dans un biotope caractérisé par des variations climatiques très larges, où les écarts thermiques journaliers et saisonniers sont très importants, liés à la sécheresse de l'air et à une aridité élevée d'où la rareté de l'eau et de la nourriture durant certaines périodes rudes de l'année. Des études physiologiques réalisées sur la gerboise ont montré de grandes capacités d'adaptation de cet animal aux conditions rigoureuses de l'environnement désertique (Andjus et al., 1974; Baddouri et al., 1984; Baddouri et al., 1987; Raji et Nordmann., 1994). La gerboise mène une vie nocturne et s'abrite dans des terriers dont elle modifie la profondeur en fonction des saisons (Kirmiz., 1962). Pendant l'hiver, lorsque les conditions climatiques sont défavorables (températures très basses, biotope couvert de neige, rareté de nourriture) l'animal rentre en hibernation (El Hilali et Veillat, 1975). Cette réaction comportementale est accompagnée de réactions physiologiques adaptatives puissantes, comme l'hypothermie et le ralentissement de toutes fonctions vitales (El Hilali et Veillat., 1975).

Pour faire face à ces conditions défavorables, la gerboise déclenche une cascade de régulations neuroendocriniennes adaptatives impliquant différents neuropeptides hypothalamiques. En effet, la privation de nourriture et l'hibernation induisent une

augmentation importante dans le noyau arqué de l'expression du neuropeptide Y (NPY) qui est connu pour régler la dépense énergétique (El Ouazzani et al., 1999-2001) et du nouveau neuropeptide l'EM66 (Boutahricht et al., 2005). L'état d'hibernation caractérisé par une hypothermie est accompagné d'un ralentissement de ses principales fonctions vitales (El Hilali et Veillat., 1975). Des paramètres tels que la glycémie et le cortisol chez les mammifères hibernants sont connus pour diminuer durant l'hibernation comparativement à l'état actif (Saboureau et al., 1980; Shivatcheva et al., 1988). La gerboise montre également des variations saisonnières de l'expression hypothalamique de plusieurs neuropeptides tels l'AVP (Baddouri et al., 1984), la GnRH (El Ouazzani et al., 2000), le NPY (Lakhdar-Ghazal et al., 1995), et la  $\beta$ -endorphin (El Ouazzani et al., 2005), qui affecte son activité sexuelle. Ainsi, chez la gerboise les neuropeptides hypothalamiques jouent probablement un rôle intégrateur dans de nombreux mécanismes de régulations neuroendocriniens qui conditionnent les comportements sexuel et alimentaire et/ou la dépense énergétique afin de faciliter l'adaptation des animaux aux variations bioclimatiques.

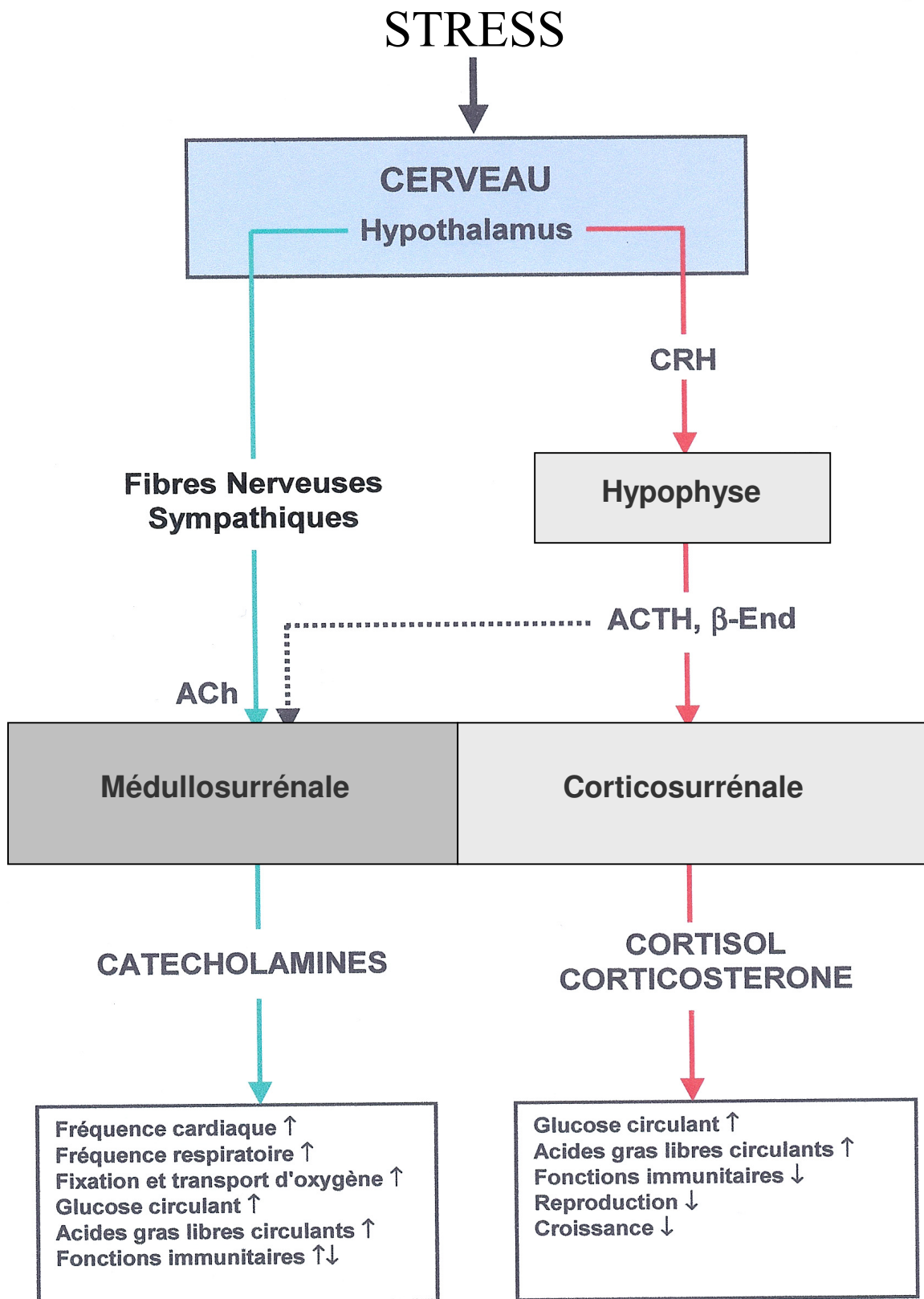
Par ailleurs, la gerboise en captivité ne se reproduit pas au laboratoire même si l'expression neuronale de la GnRH intracérébrale est similaire à celle chez la gerboise qui vit dans son biotope naturel (El Ouazzani et al., 2000). Un tel blocage de la reproduction chez la gerboise en captivité peut être lié au stress de l'animal, inhibant ainsi son comportement copulatoire. Par conséquent, d'éventuelles études des mécanismes de la réponse au stress devraient être d'une importance fonctionnelle réelle pour expliquer la modulation du stress chez cette espèce. La gerboise est donc incontestablement un modèle biologique qui suscite un grand intérêt pour étudier les régulations neuroendocriniennes liées aux facteurs de l'environnement.

Le présent travail a pour objectif majeur d'explorer une éventuelle plasticité neuroendocrine impliquant la CRH et des neuropeptides dits accessoires tels la CCK, l'AVP et l'OXY au sein du NPV parvicellulaire chez la gerboise mise dans une circonstance de stress aigu. Pour atteindre cet objectif, nous avons étudié, par immunohistochimie, l'expression de ces neuropeptides dans le NPV hypothalamique parvicellulaire de la gerboise soumise à un stress d'immobilisation et mené par la suite une comparaison avec la gerboise contrôle.

Nous avons procédé dans un premier temps à l'étude de la distribution topographique des systèmes neuronaux exprimant ces neuropeptides et à leur comparaison à ce qui est connu chez le rat.

Nous avons exploré dans un deuxième temps l'impact du stress d'immobilisation sur une telle expression par une analyse quantitative du nombre de neurones immunoréactifs pour chaque peptide et ceci à l'état contrôle et à l'état stressé.

Une analyse qualitative et quantitative des neurones coexprimant CRH/CCK, CRH/AVP, AVP/CCK, CRH/OXY ou CRH/CCK a par la suite été effectuée par une procédure de double immunohistochimie en vue de mieux cerner le phénotype chimique des neurones parvicellulaires à l'état contrôle et dans cette circonstance de stress aigu.



**Fig 1:** Représentation schématique des deux axes neuroendocrines de réponse au stress: l'axe catécholaminergique et l'axe corticotrope

**Abréviations:** CRH, corticotropin releasing hormone; ACTH, adrenocorticotropic hormone;  $\beta$ -End,  $\beta$ -endorphine; Ach, acétylcholine;  $\uparrow$ , activation;  $\downarrow$ , inhibition.



## **MATERIELS ET METHODES**



## I. Groupes expérimentaux

Les animaux utilisés dans ce travail sont des gerboises adultes mâles et femelles ayant un poids moyen de 130 à 170 grammes. Les gerboises ont été capturées pendant la saison du printemps-été dans les hauts plateaux du Moyen Atlas, et particulièrement dans la région de boulemane (altitude : 1565 m). Elles ont été placées dans une animalerie où règnent des conditions naturelles de photopériode et de température. Placées dans des cages par groupe de 5 (mâles et femelles) par cage, les gerboises reçoivent à volonté de la nourriture composée de grains d'orge, de tournesol et de feuilles de laitue. Les animaux captivés subissent, avant toute expérimentation, une période d'adaptation aux conditions d'animalerie d'au moins 4 semaines.

Pour étudier l'effet d'une exposition aiguë à un stress neurogénique sur l'expression immunohistochimique des neuropeptides étudiés, deux groupes de gerboises mâles adultes ont été constitués :

- Un groupe contrôle (CC, n=5 pour chaque expérimentation) a été sacrifié 24 heures après injection de 100 µg de colchicine (sigma), dissoute dans un volume de 10-µl de sérum physiologique (NaCl 9 ‰), dans le ventricule latéral. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées sont par rapport au bregma : Antéro-postériorité : -0.6 mm, latéralité: 2 mm, profondeur : -3.5 mm (Paxinos et Watson, 1986) avec un ajustement réalisé pour la gerboise. Le recours à des injections intracérébroventriculaires (ICV) de colchicine a été nécessaire pour favoriser l'accumulation de ces neuropeptides dans les corps cellulaires en bloquant le transport antérograde par désorganisation du système microtubulaire et ainsi renforcer le stockage des neuropeptides dans les péricaryons (Norström et al., 1971 ; Alonso 1986). En effet, cette drogue est nécessaire pour visualiser les corps cellulaires à CCK et à CRH.

- Le second groupe de gerboises (SC, n=5 pour chaque expérimentation) a été exposé à un stress aigu d'immobilisation. Pour cela, l'animal est entouré d'un torchon et immobilisé manuellement par ses pattes postérieures sauteuses pour une durée de 30 minutes. Au terme de l'immobilisation, les gerboises ont été anesthésiées puis traitées à la colchicine, selon la procédure précédemment décrite, pour être sacrifiées 24 heures plus tard.

Tous les animaux ont été sacrifiés entre 10 heures et 12 heures du matin, période durant laquelle ils sont le moins actifs. Cela prévient toute interférence des résultats avec d'éventuelles variations journalières.

Deux groupes additionnels d'animaux contrôle et stressés (n=2) non traités à la colchicine ont été similairement sacrifiés et traités afin de détecter les fibres CCK- et CRH-immunoréactives au sein de l'éminence médiane.

## **II. Préparation du tissu**

Les animaux ont été anesthésiés avec une solution de pentobarbital sodique (40 mg/kg) et perfusés par voie intracardiaque avec 50 ml d'une solution de NaCl 9 ‰ suivi de 300 ml d'un mélange de paraformaldéhyde à 4 % et d'acide picrique à 0,2 % (Somogyi et Takagi, 1982) dans du tampon phosphate (PB) à 0,1 M, pH 7,4.

Les cerveaux ont été prélevés du crâne avec soin avec l'hypophyse attachée ventralement, afin de préserver l'éminence médiane. Les blocs ont été post-fixés dans le même fixateur de perfusion pendant 24 heures à 4°C, et immergés par la suite durant toute la nuit dans du tampon veronal sodique (TV. 0,1 M. pH 7,4) contenant du saccharose à 20%. Les cerveaux ont été enrobés dans du Tissue-Tek. Ils ont été ensuite congelés dans de l'isopentane à -80°C et stockés à la même température jusqu'à utilisation.

Pour le marquage immunohistochimique, des sections frontales d'une épaisseur de 14 µm ont été réalisées au cryostat à partir des cerveaux congelés, une coupe sur deux a été récupérée sur toute l'étendue rostro-caudale du NPV et de l'EM. Les coupes ont été déposées sur des lames gélatinées et stockées à -80°C.

## **III. Procédure immunohistochimique**

La technique d'immunohistochimie a été utilisée pour détecter dans le tissu cérébral des neuropeptides tels la CCK, la CRH, l'AVP et l'OXY.

### ***1. Principe***

Les sites antigéniques en question du tissu nerveux ont été détectés grâce à la technique indirecte d'immunoperoxydase faisant intervenir successivement deux immunoglobulines G, la deuxième étant couplée à la peroxydase. La procédure consiste à :

- appliquer dans un premier temps l'anticorps primaire spécifique de l'antigène recherché et que l'on veut visualiser. Il est préparé chez le lapin.

- puis appliquer dans un deuxième temps l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase, dirigé contre l'anticorps primaire et préparé chez la chèvre,
- et enfin révéler l'activité peroxydasique grâce à un substrat le 4 chloro-1- naphтол et donc la position de l'antigène recherché.

## ***2. Immunosérums***

La spécificité des anticorps a été testée notamment par des techniques classiques permettant de tester ainsi la spécificité de la réaction immunohistochimique comme :

- \* Omettre le réactif (antisérum ou anticorps) primaire.
- \* Remplacer le réactif (antisérum ou anticorps) primaire par un sérum non immun ou préimmun.
- \* Omettre le système de révélation (anticorps secondaire marqué par exemple).
- \* Inhiber l'activité de l'antisérum à l'aide de l'antigène en préincubant le réactif primaire (antisérum ou anticorps) avec l'antigène. Les sites de liaison occupés par l'antigène ne pourront ainsi plus se fixer sur les molécules reconnues dans les tissus. Il s'agit donc d'un test d'inhibition ou de compétition.

### *a. Anticorps anti-CCK*

L'anticorps anti-CCK a été préparé chez le lapin (Pr Tramu) contre un immunogène constitué de CCK couplé à la thyroglobuline bovine par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. La spécificité de cet anticorps a été précédemment démontrée par Juaneda et al. (1999).

### *b. Anticorps anti-CRH*

L'anticorps anti-CRH a été préparé chez le lapin (Pr Tramu) contre un immunogène constitué de CRH couplé à la thyroglobuline bovine par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. La spécificité de cet anticorps a été précédemment démontrée par Tramu et al. (1984) et Juaneda et al. (1999).

### *c. Anticorps anti-OXY*

L'anticorps anti-OXY (16083, tebu-bio) est un anticorps polyclonal préparé chez le lapin contre un immunogène constitué de l'OXY couplé à thyroglobuline bovine par l'intermédiaire d'un agent de couple le glutaraldéhyde.

#### *d. Anticorps anti-AVP*

L'anticorps anti-AVP est un anticorps polyclonal préparé chez le lapin (Pr tramu) contre un immunogène constitué de l'AVP couplé à thyroglobuline bovine par l'intermédiaire du glutaraldéhyde comme agent de couplage. La spécificité de cet anticorps a été précédemment démontrée par Tramou et al. (1984).

### **3. Protocole immunohistochimique**

La technique utilisée est une technique d'immunoperoxydase indirecte, le chromogène utilisé étant le 4 chloro-1- naphthol. Dans un premier temps, les coupes ont été plongées sous agitation et pendant 10 min dans un bain de tampon véronal 0,1 M contenant 0,01% de thimérosal (TV). Les coupes ont été par la suite incubées, sous agitation pendant 2 heures, dans un mélange de TV, de triton X-100 à 0,2% (TV-TX) et de caséine à 0,4%. Le triton X-100 est un détergent utilisé pour perméabiliser le tissu et donc améliorer la pénétration des anticorps dans les tissus. Puis, les coupes ont été incubées, pendant une nuit à température ambiante, avec l'anticorps anti-CCK dilué au 1/300 dans du TV-TX, l'anticorps anti-CRH dilué au 1/300 dans du TV-TX, l'anticorps anti-AVP dilué au 1/300 dans du TV-TX ou avec l'anticorps anti-OXY au 1/500 dans du TV-TX.

Après deux rinçages de 20 min dans du TV-TX et un rinçage de 30 min sous agitation dans du TV, les coupes de cerveau ont été incubées, pendant 2 heures à température ambiante, avec un anticorps anti-IgG de lapin préparé chez la chèvre et conjugué à la peroxydase (Jakson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) dilué au 1/150 dans du TV. Après trois rinçages de 10 min dans du TV et deux bains de 2 min dans de l'eau distillée, l'activité peroxydasique a été révélée grâce au substrat 4 chloro-1-naphthol dans du Tampon TRIS (TT) 0,05, pH 7,6 contenant de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%). En effet, l'eau oxygénée libérée d'une façon progressive en présence du 4 chloro-1-naphthol et de l'enzyme catalytique peroxydase va permettre l'oxydation du 4 chloro-1-naphthol dont le résultat correspond à un précipité de couleur violette (produit soluble dans l'alcool, l'acétone). L'activité peroxydasique est stoppée grâce à un rinçage dans de l'eau distillée au moment où l'on observe sous le

microscope un marquage conséquent (entre 4 et 10 min). Au fait, le temps de la révélation dépend de l'anticorps utilisé, de la température ambiante du labo et aussi d'autres paramètres expérimentaux pouvant intervenir dans la variation de ce temps. Les coupes de cerveaux ainsi traitées sont ensuite montées entre lame et lamelle en utilisant comme milieu de montage de la glycérine et enfin observées sous microscope pour être photographiées.

#### **IV. Double immunohistochimie**

Elle a pour but d'étudier une éventuelle coexpression : CCK/CRH, CCK/AVP, CCK/OXY, AVP/CRH et OXY/CRH dans les mêmes neurones au niveau de la partie parvicellulaire de NPV ou fibres au niveau de l'EM (externe et interne). Cela permettrait de mieux comprendre la fonction hypophysiotrope de chaque neuropeptide dans notre modèle animal, la gerboise. Cette étude a été possible grâce à l'utilisation de la procédure d'éluion, qui consiste à effacer un premier marquage et par la suite à faire un deuxième marquage afin de repérer les cellules doublement immunoréactives (Tramu et al., 1978; Bello et al., 1992). Pour valider cette technique, on a effectué pour chaque réaction de double marquage un contrôle qui consiste à appliquer un sérum de lapin à la place du deuxième anticorps, afin de mettre en évidence l'effacement du premier marquage.

Après la réalisation du premier marquage immunohistochimique et la prise de photos microscopiques, les lames sont plongées dans un bain d'eau distillée pour enlever les lamelles et les traces de glycérol et par la suite dans un bain d'acétone pendant quelques secondes jusqu'à effacement du marquage. Le précipité bleu violet issu du 4-Cl 1-Naphtol oxydé est en effet un produit soluble. Immédiatement après, ces lames ont été immergées dans de l'eau distillée (2x2 minutes) afin d'éviter tout dessèchement des coupes. Dans un deuxième temps, les coupes sont rincées respectivement avec un mélange de permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ , 2.5%) et d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 5%) pendant 1 minute, et avec une solution de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (0.1%) pendant quelques secondes, puis avec de l'eau distillée (2 min) et finalement avec du TV (30 min). Pour faire un deuxième marquage après effacement du premier, les coupes sont incubées dans un anticorps primaire durant la nuit et à une température ambiante. La suite de la procédure immunohistochimique est réalisée telle qu'elle a été décrite précédemment.

Cette procédure a permis d'analyser la répartition topographique des cellules doublement marquées au niveau du NPV postérieur et antérieur d'une part et de quantifier les cellules doublement marquées afin de comparer les deux groupes d'animaux d'autre part.

## **V. Analyse tissulaire**

L'observation du marquage immunohistochimique dans les coupes histologiques a été effectuée sous microscope photonique d'Aristoplan Leitz (Leica, Heidelberg, Allemagne) et des photos microscopiques ont été prises avec le même microscope relié à un appareil-photo de Leica DC300. La prise de photos numériques à différents grossissements (x 2,5 ; x 5 ; x 6 ; x 12 ; x 16 ; x 20 ; x 25 ; x 40 ; x 50) a été possible grâce à l'utilisation d'un logiciel Leica ID50 et ont été utilisés.

Pour réaliser une cartographie rostro-caudale des neurones CCK-immunoréactifs (CCK-IR) dans les régions hypothalamique et limbique, l'identification neuranatomique de ces structures est basée sur les données issues de l'atlas du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1986) et sur celles précédemment publiées et qui prennent en considération la différence entre le rat et le gerboise ( El Ouezzani et al., 2000, Boutahricht et al., 2005).

Le comptage des cellules immunopositives a été effectué par observation directe sous microscope.

## **VI. Analyse quantitative**

La quantification des cellules immunoréactives (CCK-IR, CRH-IR, AVP-IR et OXY-IR) dans le NPV parvicellulaire a été réalisée sur des coupes qui représentent les différentes parties du NPV, et une valeur moyenne a été calculée pour chaque animal. Les résultats ont été représentés par la moyenne du nombre relatif des cellules immunoréactives par coupe et par groupe expérimental plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (moyenne  $\pm$  SEM). Pour l'analyse quantitative du nombre de cellules doublement marquées chez les deux groupes d'animaux au niveau des parties antérieure et postérieure du NPV, les valeurs obtenues représentent la moyenne du nombre relatif de cellules doublement marquées par coupe et par zone (moyenne  $\pm$  SEM). L'analyse statistique entre chaque groupe a été déterminée en utilisant le test d'égalité des variances (F-test) suivi d'un test de student (t-test),  $P < 0.05$  étant considéré comme significatif.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **PREMIERE PARTIE**

**Etude de la plasticité phénotypique des neurones à  
CRH et à CCK dans la partie parvicellulaire du  
NPV suite à un stress d'immobilisation chez la  
gerboise**



## ***Résultats***

### **I. Etude de la distribution topographique des neurones CCK-IR dans les régions hypothalamique et limbique des gerboises contrôles**

Notre étude immunohistochimique menée chez la gerboise, utilisant des anticorps anti-CCK, a montré la présence de neurones CCK-IR dans l'hypothalamus et l'amygdale (Fig. 3A). Plus précisément, la majorité de ces neurones occupent l'aire préoptique médiane (MPO), les noyaux supraoptique (SON) et paraventriculaire (NPV) hypothalamiques, l'aire rétrochiasmatique (RCH), le noyau arqué (ARC) et les divers noyaux de l'amygdale (AM). Ce pattern de distribution topographique des neurones CCK-IR est comparable chez les gerboises contrôles (groupe CC) et stressées (groupe SC) et ne dépend en aucun cas des conditions expérimentales auxquelles les gerboises ont été soumises.

### **II. Etude comparative de l'expression de la CCK et de la CRH au niveau de la partie parvicellulaire du NPV chez des gerboises contrôles et stressées**

Comme mentionné précédemment, le pattern de distribution des cellules CCK-IR au niveau de la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise ne dépend pas des conditions expérimentales (groupe SC comparé au groupe CC ; Fig. 4A, B). Dans les deux groupes expérimentaux, la localisation des neurones CCK-IR est limitée au secteur parvicellulaire adjacent au troisième ventricule (Fig. 2A, B, C) et l'utilisation d'un fort grossissement optique nous a permis d'évaluer la densité ainsi que la disposition précise de ces cellules (Figs. 3B et 4A', B').

L'analyse quantitative du nombre de cellules CCK-IR dans la partie parvicellulaire du NPV a révélé une différence significative du nombre moyen de ces cellules-IR dans les deux groupes contrôle et stressé ( $t = 3,23$  ;  $7,95 \pm 0,53$  versus  $18,65 \pm 2,15$  ;  $*P < 0,05$  ; Fig. 6). Ceci représente une importante augmentation de 135% chez le groupe d'animaux stressés (SC) par rapport au groupe d'animaux contrôles (CC).

Le pattern de distribution des cellules CRH-IR au niveau de la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise contrôle est le même que celui observé chez la gerboise stressée (Fig. 5A, B), aussi ce pattern de distribution apparaît différent de celui des cellules CCK-IR. En

effet, les cellules CRH-IR sont plus latérales et décalées vers la partie magnocellulaire (Figs. 3B et 1A, B). L'observation au fort grossissement optique des cellules CRH-IR au niveau de la partie parvicellulaire du NPV chez les deux groupes d'animaux montre d'une façon plus claire la disposition de ces cellules-IR ainsi que leur densité qui apparaît plus forte chez le groupe stressé (Fig. 5A', B'). L'analyse quantitative du nombre de cellules CRH-IR dans le NPV parvicellulaire a montré une différence significative dans le nombre moyen des cellules-IR chez les deux groupes contrôle et stressé ( $t = 30,22$  ;  $27,00 \pm 0,76$  versus  $61,45 \pm 0,86$  ;  $***P < 0,001$  ; Fig. 6 ). Ceci représente une importante augmentation de 128% chez le groupe SC par rapport au groupe CC.

### **III. Etude de la coexpression intraneuronale de la CCK et de la CRH au niveau de la partie parvicellulaire du NPV et de l'éminence médiane (EM)**

La fiabilité de la procédure d'éluion a été validée en démontrant sur la même section l'efficacité de l'effacement du premier marquage à la CCK avant d'appliquer le deuxième marquage à la CRH (Fig. 7A, B). On note une parfaite discordance dans les patterns de distribution des neurones à CCK et ceux à CRH (Fig. 3B). De plus, les neurones à CCK ne paraissent jamais immunoreactifs pour la CRH chez les deux groupes d'animaux CC et SC (Fig. 7C, D). En corrélation avec l'absence de double marquage CCK/CRH, les neurones CCK-IR du NPV occupent habituellement une position plus médiane par rapport à celle des neurones CRH-IR (Fig ; 3B) et donc une discordance dans leurs patterns de distribution. Quelque soit le groupe expérimental étudié, on observe une présence très discrète des fibres CCK-IR au niveau de la zone interne de l'éminence médiane (Fig. 2D, E). Concernant la zone externe, la densité de ces fibres est extrêmement faible (Fig. 2D, F). A la différence des fibres CCK-IR, la majorité des fibres CRH-IR est localisée au niveau de la zone externe de l'éminence médiane, formant un plexus très dense (Figs. 1C, D et 8D). La zone interne montre une densité moindre des fibres CRH-IR (Fig. 8B). Suite à l'utilisation de la procédure d'éluion, nous avons clairement démontré que la CCK n'est jamais coexprimée dans les fibres à CRH au niveau de la zone externe et interne de l'éminence médiane aussi bien chez les animaux contrôles que stressés (Fig. 8A, B, C, D).

## *Discussion*

Suite à l'étude immunohistochimique que l'on a menée chez la gerboise colchicinisée, on constate que les neurones immunopositifs à la CCK et à la CRH sont présents dans le NPV parvicellulaire, site hypothalamique connu pour jouer un rôle pilote dans la commande de la réponse neuroendocrine suite à un stress (Sawchenko et al., 1984b et 1987a; Harbuz et al., 1990; Herman et al., 1995; Karalis et al., 1997; Bartanusz et al., 1993). Ces résultats corrélaient bien ceux trouvés chez le rat (Kiss et al., 1984; Swanson et al., 1986; Ceccatelli et al., 1989).

Dans les deux groupes expérimentaux, la distribution des neurones CCK-immunoreactifs (CCK-IR) a été limitée au secteur parvicellulaire du côté adossé au troisième ventricule. Chez la gerboise, on a noté l'absence de cellules CCK-IR dans la partie magnocellulaire du NPV contrairement aux résultats trouvés chez le rat. Par conséquent la CCK ne semble pas être impliquée dans la régulation osmotique chez la gerboise, suggérant des différences interspécifiques de la réponse neuroendocrinienne entre les deux espèces.

Au niveau de l'éminence médiane de la gerboise, les fibres CCK-IR se trouvent principalement dans la zone interne. Dans la zone externe, la présence de ces fibres est extrêmement faible tandis que les fibres CRH-IR formant un plexus très dense sont concentrées principalement dans la zone externe. En conséquence, le pattern de distribution des fibres CCK-IR et CRH-IR au niveau de l'éminence médiane chez la gerboise est différent de celui du rat (Juaneda et al., 1999). Ceci est en accord avec le résultat qui montre l'absence de toute coexpression de la CCK et de la CRH au niveau des mêmes fibres.

Malgré la très faible présence des fibres CCK-IR au niveau de la zone externe de l'éminence médiane qui peut être liée à une libération plus importante de la CCK dans le sang porte chez la gerboise comparée au rat, on ne peut exclure un éventuel rôle hypophysiotrope de la CCK chez la gerboise.

En outre, nous avons examiné l'effet du stress d'immobilisation sur la densité des neurones à CCK et à CRH au niveau de la partie parvicellulaire du NPV. Le stress d'immobilisation aigu fait partie de nombreux types de stress neurogéniques qui activent l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien. Il constitue un stimulus stressant intéressant à étudier car il induit une augmentation d'expression de l'ARNm et du peptide CRH parvicellulaire du NPV ainsi qu'une hypersécrétion d'ACTH suivie d'une hypersécrétion de la corticostérone

(Wong et al., 2000). De façon différente, un stress d'immobilisation chronique peut provoquer en plus la perturbation de différents rythmes circadiens provenant de l'hypersécrétion journalière de la mélatonine (Rodrigues et al., 2000). La présente étude pour laquelle on a employé le stress aigu d'immobilisation montre qu'une immobilisation de 30 minutes provoque une augmentation significative du nombre de neurones à CRH au niveau de la partie parvicellulaire du NPV, indiquant une plasticité neuroendocrinienne de la CRH liée au stress d'immobilisation chez la gerboise. Aussi, le nombre de neurones CCK-IR dans la partie parvicellulaire du NPV a augmenté de manière significative chez les gerboises soumises à un stress d'immobilisation comparées aux contrôles, montrant que le stress d'immobilisation peut stimuler l'expression de la CCK au niveau parvicellulaire du NPV. Ceci suggère qu'en plus de la CRH, la CCK est un des neuropeptides impliqués dans la réponse au stress en contrôlant l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien chez la gerboise. D'autres nouveaux neuropeptides récemment identifiés dans l'hypothalamus de la gerboise, tel que l'EM66 peuvent également participer aux mécanismes neuroendocriniens de régulation permettant à l'animal de s'adapter aux stimuli stressants (Boutahricht et al., 2005).

Etant donné que la CCK participe à la plasticité phénotypique des neurones à CRH en fonction des circonstances (Juaneda et al., 2001; Tilders., 1993), nous avons également étudié chez les gerboises contrôles et stressées, par double immunohistochimie, l'éventuelle colocalisation de ces deux neuropeptides dans la partie parvicellulaire du NPV et au niveau de l'éminence médiane. Contrairement au rat (Mezey et al., 1985; Juanda et al., 2001), les résultats chez la gerboise prouvent que la CCK n'est jamais coexprimée dans les neurones à CRH des animaux contrôles et stressés et mettent en évidence que la CCK et la CRH ne sont pas colibérées dans le sang porte dans certaines conditions physiologiques et expérimentales. Ceci est à rapprocher du fait que contrairement au rat, les neurones CRH-IR de la gerboise ont montré un pattern de distribution tout à fait différent de celui des neurones CCK-IR dans la partie parvicellulaire du NPV et l'éminence médiane. L'augmentation de l'expression de la CCK suite à un stress d'immobilisation ne semble pas être complètement destinée à la projection periportale. Puisque d'une part, les neurones à CRH chez la gerboise n'expriment pas la CCK et, d'autre part, les neurones à CCK du NPV sont fortement sollicités au moment du stress d'immobilisation, la destination des projections de ces neurones à CCK reste inconnue. Tenant compte de la divergence anatomique des deux systèmes neuronaux, il est peu probable qu'il y ait une interaction intracellulaire entre la CCK et la CRH chez la gerboise. Par contre, une éventuelle régulation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-

surrénalien par la CCK sur peut être exercée par une interaction intercellulaire entre la CCK et la CRH.

Les résultats actuels suggèrent une différence interspécifique dans le mécanisme des régulations neuroendocriniennes entre rat et gerboise. A ce propos, les données précédentes ont montré que la gerboise semble avoir un système hypothalamo-neurohypophysaire « down-regulé» comparativement au rat. En effet, le contenu de la vasopressine et sa libération à partir du lobe neural ne changent pas suite à une déshydratation chez la gerboise par rapport à son contrôle (Ragi et al., 1994). Puisque les deux espèces ont deux styles de vie différents, il n'est pas étonnant que pour faire face aux conditions sévères et stressantes qui caractérisent l'environnement de vie de la gerboise, celle-ci déclenche diverses régulations adaptatives neuroendocriniennes impliquant des mécanismes hypothalamiques qui peuvent être différents de ceux du rat.

Chez les mammifères en hibernation, l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien montre un autre aspect fonctionnel qui diverge par rapport à celui du rat. A ce propos, le résultat final de l'activation de l'axe implique la libération périphérique de cortisol (Saboureau et al., 1980 ; Shivatcheva., 1988) ) et non pas de corticostérone comme chez le rat ( Juaneda., 1999).

En conclusion, la présente étude menée chez la gerboise montre bien la présence de CCK et de CRH dans les neurones de la partie parvicellulaire du NPV. Aussi, nos résultats argumentent bien leur implication respective dans le contrôle du stress. L'absence de la CCK dans les neurones parvicellulaires à CRH du NPV chez les gerboises contrôles et stressées, suggère que les mécanismes de régulation de la réponse au stress impliquant la CRH et la CCK sont différents chez la gerboise comparée au rat. En conséquence, les présents résultats viennent renforcer davantage l'idée que les mécanismes physiologiques adaptatifs aux conditions environnementales varient d'une espèce à l'autre.

## **DEUXIEME PARTIE**

**Etude de la plasticité phénotypique des neurones à  
AVP dans la partie parvicellulaire du NPV suite à un  
stress d'immobilisation chez la gerboise**

# Résultats

## **I. Etude de la distribution topographique des neurones AVP-IR dans le NPV des gerboises contrôles**

Suite à l'immunohistochimie utilisant des anticorps anti-AVP, on a observé une importante densité des neurones AVP-IR qui occupent la partie parvicellulaire du NPV de la gerboise stressée (Fig. 9A, B, C). Les corps cellulaires AVP-IR sont principalement concentrés dans les noyaux médians du NPV parvicellulaire tout au long de son extension rostro-caudale. Un tel pattern de distribution topographique des neurones AVP-IR ne dépend en aucun cas des conditions expérimentales auxquelles les gerboises ont été soumises puisqu'il est comparable chez les deux groupes de gerboises contrôles et stressées.

## **II. Etude comparative de l'expression de l'AVP au niveau de la partie parvicellulaire du NPV chez des gerboises contrôles et stressées**

Pour explorer l'effet du stress d'immobilisation sur l'expression de l'AVP dans la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise, l'analyse quantitative du nombre de cellules AVP-IR dans la partie parvicellulaire du NPV montre qu'aucune différence significative n'existe entre les deux nombres moyens des cellules AVP-IR chez les deux groupes contrôle et stressé ( $t = 0,78$  ;  $70.45 \pm 1.67$  versus  $72.25 \pm 1.62$  ;  $P < 0,05$  ; Fig. 11 ).

## **III. Etude de la coexpression intraneuronale de l'AVP avec la CCK et la CRH (AVP/CCK et AVP/CRH) au niveau de la partie parvicellulaire du NPV et de l'éminence médiane**

Pour étudier la coexpression AVP/CCK et AVP/CRH dans la partie parvicellulaire du NPV et de l'éminence médiane, la fiabilité du procédé d'élution a été validée en démontrant sur la même coupe l'efficacité de l'effacement du premier marquage c'est à dire la première réaction IHC à l'AVP avant la réalisation du deuxième marquage c'est à dire la réaction IHC à la CCK ou à la CRH. En effet, on observe, sur la même coupe, la disparition complète de certaines cellules qui étaient fortement marquées (première réaction) et qui ne sont donc pas

doublement marquées (Figs. 12A, B; 13A, B). Les résultats obtenus montrent que plusieurs neurones AVP-IR sont également CCK-IR (Fig. 12A, B) ou CRH-IR (Fig. 13 A, B) chez les deux groupes d'animaux stressés et contrôles. L'emplacement des cellules doublement marquées AVP/CCK semble différent de celui des cellules AVP/CRH : en fait les cellules AVP/CCK doublement immunopositives ont une position plus médiane que celles des cellules AVP/CRH-IR (Fig. 14A, B). Ceci corrèle parfaitement les résultats précédemment obtenus concernant le pattern de distribution des neurones CCK-IR au niveau de la partie parvicellulaire du NPV qui occupent une position plus médiane que celle des neurones CRH-IR (Fig. 3B).

La double immunohistochimie effectuée au niveau de l'éminence médiane a révélé que quelque soit le groupe expérimental étudié, on observe une très forte densité de fibres AVP-IR formant un plexus au niveau de la zone interne de l'éminence médiane (Fig. 10A, B). Au niveau de sa zone externe, on note la présence d'un réseau moins dense de fibres AVP-IR en particulier autour des capillaires (Fig. 10A, C). A la différence des fibres AVP-IR, la majorité des fibres CRH-IR forme un plexus très dense au niveau de la zone externe de l'éminence médiane de la gerboise; tandis que la zone externe contient très peu de fibres CRH-IR (Fig. 13D). Ces résultats relatifs à la distribution topographique des fibres AVP-IR et CRH-IR au niveau de l'éminence médiane corrélerent ceux qui démontrent très clairement que l'AVP est coexprimée dans les fibres à CRH au niveau de la zone externe de l'éminence médiane aussi bien chez le groupe contrôle non colchicinisé (NC) (Fig. 13C, D) que chez le groupe stressé non colchicinisé (NS).

En ce qui concerne la coexpression CCK/AVP dans l'éminence médiane, elle est bien présente au niveau de sa zone externe chez les gerboises contrôles et stressées (Fig. 12C, D). Une analyse quantitative comparative chez les deux groupes d'animaux (contrôles et stressés) du nombre de cellules AVP/CCK au niveau de la partie parvicellulaire du NPV montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux nombres moyens de cellules doublement immunomarquées chez les deux groupes d'animaux contrôles et stressés ( $t = 0,93$  ;  $5,15 \pm 0,25$  versus  $4,9 \pm 0,11$  ;  $P < 0,05$  ; Fig. 15A). La même analyse quantitative du nombre de cellules AVP/CRH doublement marquées montre qu'aucune différence significative n'existe entre les deux nombres moyens de ces cellules doublement immunomarquées chez les deux groupes contrôles et stressés ( $t = 1,65$  ;  $8,1 \pm 0,15$  versus  $8,53 \pm 0,22$  ;  $P < 0,05$  ; Fig. 15A ). En fait, dans les deux cas de double marquage étudiés (AVP/CCK et AVP/CRH), le nombre des cellules doublement marquées reste insensible aux conditions expérimentales auxquelles les animaux ont été soumis.



Une autre analyse quantitative comparative dans les deux parties postérieure et antérieure du NPV du nombre des cellules doublement marquées chez le groupe d'animaux contrôles, montre que la coexpression AVP/CCK est quantitativement plus importante dans le NPV postérieur par rapport au NPV antérieur ( $t = 10,25$  ;  $7,2 \pm 0,27$  versus  $3,1 \pm 0,2$  ;  $***P < 0,001$  ; Figs. 14A et 15B). Par contre la coexpression AVP/CRH est quantitativement plus importante dans le NPV antérieur par rapport au NPV postérieur ( $t = 7,29$  ;  $11,2 \pm 0,67$  versus  $5 \pm 0,39$  ;  $***P < 0,001$  ; Figs. 14B et 15B ).

## *Discussion*

Notre étude immunohistochimique chez la gerboise montre que des neurones AVP-IR sont présents dans la partie parvicellulaire du NPV. Le mode de distribution des neurones AVP-IR dans le NPV chez la gerboise ressemble à celui observé chez le rat (Sawchenko et Swanson., 1982; Sawchenko., 1984). D'autre part, la présence de neurones AVP-IR dans la partie magnocellulaire du NPV chez la gerboise constitue un argument en faveur de l'implication de l'AVP dans la régulation osmotique chez cette espèce.

Des données fonctionnelles préalables ont prouvé que la gerboise semble avoir un système hypothalamo-neurohypophysaire « down-régulé » comparativement au rat. Ainsi, le contenu et la libération de la vasopressine à partir du lobe neural de la gerboise sont quantitativement semblables chez des animaux contrôles ou déshydratés (Raji et al., 1994).

Au niveau de l'éminence médiane, les fibres AVP-IR se trouvant principalement dans la zone interne et forment un plexus très dense, alors qu'au niveau de la zone externe se forme un plexus beaucoup moins dense. Enfin, le mode de distribution des fibres AVP-IR dans l'éminence médiane de la gerboise ressemble à celui observé chez le rat (Zimmerman et al., 1977; Villar., 1994) et suggère un effet hypophysiotrope certain de l'AVP chez la gerboise.

Par ailleurs, on constate que, dans l'éminence médiane externe de la gerboise, les fibres AVP-IR forment un plexus moins dense que celui formé par les fibres CRH-IR. En ce qui concerne les fibres CCK-IR de l'éminence médiane externe, leur distribution est très limitée. Au passage, notons que les résultats trouvés dans cette deuxième partie du travail concernant le pattern de distribution des fibres CRH-IR et CCK-IR au niveau de l'éminence

médiane de la gerboise correspondent parfaitement à ceux trouvés dans la première partie de ce travail (Barakat et al., 2006).

Nous avons ensuite examiné l'effet du stress d'immobilisation sur la densité des neurones à AVP au niveau de la partie parvicellulaire du NPV. Le stress aigu d'immobilisation fait partie de nombreux types de stress neurogéniques qui activent l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et constitue à cet égard un stimulus stressant intéressant à étudier car induisant une augmentation d'expression de l'ARNm et du peptide CRH parvicellulaire du NPV ainsi qu'une hypersécrétion d'ACTH suivie d'une hypersécrétion de corticostérone (Wong et al., 2000). La présente étude qui a employé un stress aigu d'immobilisation de 30 minutes ne provoque aucun changement significatif du nombre des cellules AVP-IR au niveau de la partie parvicellulaire du NPV. Cependant, on a montré dans les résultats de la première partie de ce travail que le même stress aigu d'immobilisation provoquait une forte augmentation du nombre des neurones à CRH et à CCK au niveau de la partie parvicellulaire du NPV, soulignant la plasticité neuroendocrinienne de la CRH et de la CCK dans la régulation de la réponse au stress chez la gerboise (Barakat et al., 2006). Ceci suggère que, chez la gerboise, la CRH et la CCK sont parmi les neuropeptides engagés dans la réponse aux stimuli stressants impliquant l'activité de l'axe corticotrope. Contrairement à la CCK et à la CRH, l'expression de l'AVP au niveau du NPV parvicellulaire ne dépend pas du stress aigu d'immobilisation. De telles conclusions avaient été tirées précédemment chez le rat (Juaneda et al., 1999). Cependant, d'autres travaux indiquent qu'un stress aigu d'immobilisation d'une durée de 2 heures provoque une augmentation significative de l'ARNm de la AVP parvicellulaire chez le rat (Bartanusz et al., 1993). Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, nous ne pouvons exclure que la durée du stimulus joue un rôle critique dans le contrôle de la plasticité neuronale phénotypique au sein du NPV. Ces données suggèrent également une éventuelle différence entre la gerboise et le rat dans les mécanismes de régulation de la réponse au stress impliquant l'AVP, la CCK et la CRH (Barakat et al., 2006). Encore une fois, ceci pourrait renforcer l'idée d'une variation interspécifique dans les mécanismes physiologiques adaptatifs aux conditions environnementales.

Du fait que l'AVP participe à la plasticité phénotypique des neurones à CRH dans le NPV en fonction des circonstances physiologiques (Sawchenko et al., 1984; Tramu et al., 1983; Watts et al., 1995), nous avons étudié dans ce travail la coexpression AVP/CRH dans les neurones de la partie parvicellulaire du NPV et au niveau des fibres de l'éminence médiane chez des gerboises contrôles et stressées. Les résultats ont montré que les neurones à AVP coexprimaient la CRH au niveau de la partie parvicellulaire du NPV et que les fibres à AVP

coexprimaient la CRH dans la zone externe de l'éminence médiane, ceci à la fois chez les gerboises contrôles et stressées. Des résultats comparables ont été décrits chez le rat (Whitnall et al., 1987). Ceci peut suggérer, chez la gerboise, un rôle autocrine, paracrine ou endocrine de l'AVP parvicellulaire qui ne dépendrait pas du stress aigu d'immobilisation puisque ni l'expression de l'AVP ni la coexpression AVP/CRH ne présentent de fluctuation suite à un stress d'immobilisation de 30 minutes. D'autre part, le nombre de cellules parvicellulaires coexprimant AVP/CRH est quantitativement plus important dans le NPV antérieur; ce qui pourrait laisser supposer que la population antérieure à CRH aurait un potentiel plastique plus élevé.

Ce travail a par ailleurs montré que le niveau de coexpression AVP/CCK ne dépend pas du stress du fait que le nombre de cellules AVP/CCK ne change pas suite à un stress d'immobilisation. Une telle coexpression est quantitativement plus importante dans le NPV postérieur que dans le NPV antérieur.

Ces derniers résultats démontrent la présence d'au moins deux populations neuronales à AVP dans la partie parvicellulaire du NPV de la gerboise puisque CCK et CRH ne colocalisent jamais à ce niveau (Barakat et al., 2006). Nos résultats corroborent les données préalables suggérant l'existence de plusieurs groupes de neurones phénotypiquement distincts dans la partie parvicellulaire du NPV, chacun étant caractérisé par sa capacité à régler l'expression du neuropeptide en fonction d'un stimulus spécifique (Watts et al., 1995; Tilders et al., 1993).

En conclusion, la présente étude, après avoir cerné la présence d'AVP dans les neurones de la partie parvicellulaire du NPV de la gerboise, a montré que le taux d'expression d'AVP n'était pas influencé par un stress aigu d'immobilisation. Après avoir été mises en évidence, les colocalisations AVP/CRH et AVP/CCK dans les neurones parvicellulaires du NPV se montrent également insensibles au stress aigu d'immobilisation : ceci suggère des différences entre la gerboise et le rat dans les mécanismes de régulation de la réponse neuroendocrinienne à un stress impliquant la CRH, la CCK ou l'AVP. La présence des colocalisations AVP/CRH et AVP/CCK et l'absence d'une colocalisation CCK/CRH chez les gerboises contrôles et stressées démontrent la présence d'au moins deux populations neuronales à AVP dans la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise.

## **TROISIEME PARTIE**

**Etude de la plasticité phénotypique des neurones à  
OXY dans la partie parvicellulaire du NPV suite à  
un stress d'immobilisation chez la gerboise**

## *Résultats*

### **I. Etude de la distribution topographique des neurones OXY-IR au sein du NPV des gerboises contrôles**

les neurones OXY-IR sont situés dans les noyaux médians du NPV parvicellulaire, s'étendant tout au long de son extension rostro-caudale. Plus on s'éloigne du troisième ventricule vers la partie latérale, plus la densité des neurones augmente jusqu'à ce qu'elle atteigne son maximum au voisinage de la partie magnocellulaire (Fig. 16A, B, C). Cette dernière contient des cellules de grande taille fortement marquées et formant un amas très dense de cellules qui occupent la partie la plus latérale du NPV. De ce fait cette partie est beaucoup plus facile à identifier. Cette distribution topographique des neurones OXY-IR ne dépend en aucun cas des conditions expérimentales auxquelles les gerboises ont été soumises. En effet, elle est similaire chez les deux groupes de gerboises contrôle (CC) et stressé (SC).

### **II. Etude comparative de l'expression de l'OXY au niveau de la partie parvicellulaire du NPV chez des gerboises contrôles et stressées**

Une analyse quantitative du nombre de cellules OXY-IR dans la partie parvicellulaire du NPV a été indispensable pour évaluer l'impact du stress d'immobilisation (1/2 h) sur l'expression de l'OXY dans la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise. Cette analyse montre qu'aucune différence significative n'existe entre les deux nombres moyens de ces cellules-IR chez les deux groupes d'animaux contrôle et stressé ( $t = 0,47$  ;  $98,18 \pm 2,76$  versus  $99,8 \pm 2,11$  ;  $P < 0,05$  ; Fig. 20A ).

### **III. Etude de la coexpression intraneuronale de l'OXY avec la CCK et la CRH (OXY/CCK et OXY/CRH) au niveau de la partie parvicellulaire du NPV et de l'éminence médiane**

La procédure d'éluion nous a permis, encore une fois, d'effectuer une double réaction immunohistochimique et donc un double marquage sur la même coupe afin d'étudier la coexpression OXY/CCK et OXY/CRH dans la partie parvicellulaire du NPV et de l'éminence

médiane. Elle nous a permis aussi d'évaluer l'effet du stress d'immobilisation sur de telles coexpressions.

La fiabilité de cette procédure d'éluion a été validée en démontrant sur la même coupe l'efficacité de l'effacement du premier marquage à OXY (tête de flèche blanche) avant la réalisation du second marquage. En fait, on observe sur la même coupe la disparition complète de certaines cellules fortement marquées (première réaction à OXY) qui ne seront pas CRH -doublement marquées (Fig. 18A, B, C, D).

Plusieurs neurones OXY-IR coexpriment la CRH (flèche noire; Fig. 18A, B) et peu de cellules la CCK (flèche noire ; Fig. 18C, D) chez les deux groupes d'animaux stressés et contrôles. La distribution topographique des cellules doublement marquées OXY/CCK semble différente de celle des cellules OXY/CRH. Ainsi les cellules OXY/CCK doublement marquées sont situées en position plus médiane par rapport aux cellules OXY/CRH (Figs. 18A, B, C, D et 21A, B). Ceci corrobore parfaitement les résultats précédemment trouvés sur le pattern de distribution des neurones CCK-IR au niveau de la partie parvicellulaire du NPV qui ont une position plus médiane que celle des neurones CRH-IR (Fig. 3B).

Chez les deux groupes expérimentaux étudiés contrôle (NC) et stressé (NS), on observe une très forte densité de fibres OXY-IR formant un dense plexus au niveau de la zone interne de l'éminence médiane (Fig. 17A, B). Au niveau de la zone externe, on observe une faible présence de fibres OXY-IR en particulier autour des capillaires (Fig. 17A, C). A la différence des fibres OXY-IR, la majorité des fibres CRH-IR forme un plexus très dense au niveau de la zone externe de l'éminence médiane de la gerboise; tandis que la zone interne contient très peu de fibres CRH-IR (Fig. 13D). Les données de la double immunohistochimie montrent la colocalisation de l'OXY dans les fibres à CRH au niveau de la zone externe et interne de l'éminence médiane (Fig. 19A, B, C, D) bien que leurs patterns respectifs de distribution paraissent différents. Ces résultats ont été observés chez les deux groupes d'animaux contrôles et stressés non colchicinisés. Par contre, on n'a jamais pu observer, chez les gerboises contrôles et stressées, la coexpression de la CCK et de l'OXY au niveau des mêmes fibres de l'éminence médiane.

L'analyse quantitative comparative du nombre de cellules OXY/CCK doublement marquées au niveau de la partie parvicellulaire du NPV chez les deux groupes d'animaux contrôles et stressés montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux moyennes du nombre de ces cellules-IR dans les deux groupes d'animaux contrôles et stressés ( $t = 1$  ;  $0,89 \pm 0,04$  versus  $0,83 \pm 0,04$  ;  $P < 0,05$  ; Fig. 20B ).

L'analyse quantitative du nombre de cellules OXY/CRH doublement marquées montre qu'aucune différence significative n'existe entre les deux nombres moyens de ces cellules-IR chez les deux groupes contrôle et stressé ( $t = 0,72$  ;  $6,5 \pm 0,45$  versus  $5,98 \pm 0,57$  ;  $P < 0,05$  ; Fig. 20B). Aussi dans les deux cas étudiés de double marquage (OXY/CCK et OXY/CRH), le nombre des cellules-IR doublement marquées reste insensible aux conditions expérimentales auxquelles les animaux ont été soumis.

Une autre analyse quantitative comparative du nombre de cellules doublement marquées dans les deux parties postérieure et antérieure du NPV chez le groupe d'animaux contrôles, montre que la coexpression OXY/CRH est quantitativement plus importante dans le NPV antérieur par rapport au NPV postérieur ( $t = 5,11$  ;  $4,4 \pm 0,38$  versus  $2,1 \pm 0,25$  ;  $***P < 0,001$  ; Figs. 20C et 21B). En raison du manque de données (faible présence de doubles marquages OXY/CCK), il ne semble pas fiable d'appliquer l'analyse quantitative du nombre de cellules doublement marquées OXY/CCK dans les deux parties postérieure et antérieure du NPV. Par contre, les cellules doublement marquées OXY/CCK présentent une homogénéité de leur pattern de distribution à travers toute la partie parvicellulaire du NPV (Fig. 21A).

## *Discussion*

Une étude immunohistochimique du pattern de distribution des neurones à OXY dans le NPV de la gerboise est utile pour mieux comprendre la plasticité de ces neurones en particulier suite à un stress aigu. En fait, en plus d'une présence classique des neurones à OXY dans la partie magnocellulaire du NPV, on trouve également chez la gerboise des neurones à OXY dans la partie parvicellulaire du NPV connue pour leur rôle clé dans la réponse neuroendocrinienne liée au stress (Sawchenko et al., 1984; Bartanusz et al., 1993; Paulmyer-Lacroix., 1995). Le mode de distribution des neurones OXY-IR dans le NPV chez la gerboise ressemble à celui observé chez le rat (Sawchenko et Swanson, 1982 ; Condes-Lara et al 2003). Au niveau de l'éminence médiane de la gerboise, nous avons mis en évidence :

- 1) une très forte densité de fibres OXY-IR formant un plexus dense au niveau de la zone interne, et

- 2) au niveau de la zone externe une présence plutôt faible de fibres OXY-IR distribuée en particulier autour des capillaires sanguins.

Ce pattern de distribution ressemble à celui déjà décrit chez le rat (Villar., 1994 ; Antoni et al., 1988). Ces résultats ainsi que ceux relatés précédemment sur le pattern de distribution des fibres à CRH dans le NPV et l'EM nous permettent d'entrevoir des similitudes avec l'OXY en particulier au sujet des efférences des neurones à CRH et OXY qui sont apposées aux vaisseaux portes de l'éminence médiane pour y déverser leur contenu à destination du lobe antérieur de l'hypophyse. Ce mode de distribution qui suggère un effet hypophysiotrope de l'OXY a été observé chez d'autres espèces (Kikusui et al., 1997).

En considérant les résultats obtenus au niveau de la zone externe de l'éminence montrant que les fibres à CRH forment un plexus très dense contrairement aux fibres à CCK et OXY moins nombreuses, nous pouvons désormais dégager le degré d'implication de chacun de ces neuropeptides dans le contrôle de la fonction hypophysiotrope chez la gerboise dans les conditions expérimentales choisies.

Nous avons aussi examiné l'effet du stress d'immobilisation sur la densité des neurones à OXY au niveau de la partie parvicellulaire du NPV. Le stress aigu d'immobilisation fait partie de nombreux types de stress neurogéniques qui activent l'axe hypothalamo- hypophyso-surrénalien. Les raisons du choix particulier de ce type de stress ont été déjà citées dans la première et la deuxième partie de ce travail. Donc, la présente étude basée sur un stress aigu d'immobilisation a montré qu'une immobilisation de 30 minutes ne provoque aucun changement significatif du nombre des cellules OXY-IR au niveau de la partie parvicellulaire du NPV. Après avoir suivi la même procédure expérimentale, les résultats de la première partie de ce travail ont montré qu'un stress aigu d'immobilisation provoquait une forte augmentation du nombre des neurones à CRH et à CCK au niveau de la partie parvicellulaire du NPV, soulignant la plasticité neuroendocrinienne de la CRH et de la CCK dans la régulation de la réponse au stress chez la gerboise (Barakat et al., 2006). Par conséquent, contrairement à la CCK et à la CRH qui sont impliqués dans la réponse aux stimuli stressants en mobilisant l'activité de l'axe corticotrope, l'expression parvicellulaire de l'OXY comme celle de l'AVP (voir deuxième partie de ce travail) ne dépend pas du stress aigu d'immobilisation. Cependant, des données obtenues chez le rat ont montré que suite à un stress osmotique, une augmentation de l'activité métabolique de l'OXY a été observée non seulement dans la partie magnocellulaire mais aussi dans la partie parvicellulaire du NPV, indiquant que l'OXY parvicellulaire peut être impliquée dans la réponse au stress (Giovannelli et al., 1992). Par ailleurs, d'autres travaux ont montré une évidente implication



des cellules à OXY du NPV parvicellulaire dans la médiation des signaux induits par un stress osmotique et le nombre limité des neurones à OXY activés peut expliquer leurs spécialisations fonctionnelles sélectives pour ce type de stress (Pirnik et al., 2004). D'autres résultats ont démontré que le stress osmotique (1h) et le stress d'immobilisation (2h) sont des stimuli puissants qui peuvent augmenter l'expression des neurones à OXY au niveau du NPV (Pirnik et Kiss., 2005). Compte tenu de ces résultats, nous ne pouvons pas exclure que la durée et le type du stimulus jouent un rôle critique dans le contrôle de la plasticité des neurones à OXY du NPV. Ces données suggèrent également la présence d'une différence supplémentaire entre la gerboise et le rat dans les mécanismes de régulation de la réponse au stress impliquant l'OXY, et les autres facteurs peptidiques étudiés tels l'AVP, la CCK et la CRH (Barakat et al., 2006).

Compte tenu du fait 1) que l'OXY participe à la plasticité phénotypique des neurones à CRH dans le NPV magnocellulaire (Sawchenko et al., 1984a ), 2) de l'importance du rôle de l'OXY dans la régulation de la fonction hypophysio-corticotrope (Antoni et al., 1988), et 3) de la rareté des résultats sur l'étude de la plasticité phénotypique des neurones à OXY dans la partie parvicellulaire du NPV, nous avons recherché la coexpression CRH/OXY dans les neurones du NPV parvicellulaire et dans les terminaisons présentes dans l'éminence médiane. Chez les gerboises contrôles ou stressées, nos résultats ont montré que les neurones à OXY coexprimaient la CRH et que les fibres à OXY de la zone externe coexprimaient la CRH. Ceci pourrait suggérer chez la gerboise un rôle autocrine, paracrine ou endocrine de l'OXY parvicellulaire qui ne dépendrait pas du stress aigu d'immobilisation puisque ni l'expression de l'OXY ni la coexpression OXY/CRH ne présentent de fluctuation suite à un stress d'immobilisation de 30 minutes. D'autre part, signalons que le nombre de neurones parvicellulaires coexprimant OXY/CRH est quantitativement plus important dans le NPV antérieur, suggérant une probable plasticité phénotypique de la population neuronale à CRH.

Les neurones parvicellulaires à OXY coexpriment la CCK aussi bien chez les gerboises contrôles et que chez les stressées. Cette coexpression est indépendante du stress du fait que le nombre de cellules OXY/CCK reste faible et constant. La coexpression de ces deux neuropeptides au niveau de l'éminence médiane externe est indétectable. On peut expliquer cette absence de coexpression :

- 1) par la très faible densité des fibres à OXY à ce niveau dans les conditions expérimentales choisies,

- 2) ainsi que par la possible projection de ces neurones à OXY/CCK vers des sites cérébraux extra-hypothalamiques.

Ces résultats montrent chez la gerboise la présence d'au moins deux populations neuronales distinctes à OXY dans le NPV parvicellulaire puisque la CCK et la CRH ne colocalisent jamais à ce niveau et que l'OXY est colocalisée avec la CRH et la CCK.

Nos résultats confirment, par conséquent, l'existence de plusieurs groupes de neurones phénotypiquement distincts dans la partie parvicellulaire du NPV, chacun étant caractérisé par sa capacité à régler l'expression du neuropeptide en fonction d'un stimulus spécifique (Watts et al., 1995; Tilders et al., 1993).

En conclusion les données relatives à l'ocytocine ont montré :

1) la présence d'OXY dans les neurones de la partie parvicellulaire du NPV de la gerboise

2) le niveau d'expression de l'OXY, évalué par le nombre de neurones OXY immunoréactifs, ne dépend pas du stress aigu d'immobilisation. De la même façon, les colocalisations OXY/CRH et OXY/CCK ne dépendent pas du stress aigu d'immobilisation suggérant des différences entre la gerboise et le rat dans les mécanismes de régulation de la réponse neuroendocrinienne au stress impliquant la CRH, la CCK, l'AVP ou l'OXY. La présence des colocalisations OXY/CRH et OXY/CCK et l'absence d'une colocalisation CCK/CRH chez les gerboises contrôles et stressées démontre, comme pour l'AVP, la présence d'au moins deux populations neuronales à OXY dans la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Dans le cadre d'étude de la plasticité phénotypique des neurones à CRH de la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise suite au stress, l'immobilisation aigue entraîne bien une augmentation significative du nombre des cellules exprimant la CRH. Ceci montre que, chez la gerboise comme chez le rat, le stress aigue d'immobilisation provoque l'activation de l'axe corticotrope via une augmentation de l'expression de la CRH parvicellulaire. Cependant, le stress chronique est à l'origine de résultats contradictoires puisqu'il peut entraîner soit une augmentation, soit une stabilisation ou encore une diminution de l'expression d'ARNm à CRH dans le NPV. Ceci renforce l'hypothèse que les neurones à CRH sont capables d'une plasticité sécrétoire très large en fonction de la qualité, de l'intensité et de la durée du stimulus stressant utilisé.

Pour cerner l'éventuelle implication de la CCK dans la réponse (neuroendocrine ou non neuroendocrine) au stress, nous avons réalisé dans un premier temps une étude topographique des neurones à CCK au niveau de l'hypothalamus. Le pattern de distribution de ces neurones au sein du NPV parvicellulaire ressemble à celui décrit chez le rat. En revanche, contrairement au rat où l'on a localisé la CCK aussi bien au niveau magnocellulaire que parvicellulaire, la distribution des neurones CCK-immunoreactifs chez la gerboise est strictement limitée au secteur parvicellulaire en particulier périventriculaire et aucune présence n'a été montrée dans la partie magnocellulaire. Par conséquent, la CCK ne semble pas être impliquée directement dans la régulation osmotique chez cette espèce. Cela constitue un argument en faveur de différences neuroendocrines interspécifiques.

L'étude de l'impact du stress sur l'expression de la CCK a montré que le stress neurogénique d'immobilisation chez la gerboise retentit positivement sur la densité neuronale exprimant la CCK au sein de ce noyau. Par conséquent, la CCK, chez cette espèce, serait un des neuropeptides impliqués dans la réponse au stress en contrôlant l'activité de l'axe corticotrope en plus de la CRH.

Puisque la CCK est connue pour intervenir dans la plasticité phénotypique des neurones à CRH en fonction du type de stresser, nous avons étudié par double immunohistochimie la coexpression de ces deux neuropeptides aussi bien dans le NPV que dans l'éminence médiane (site de colibération de ces neurohormones) suite au stress d'immobilisation chez la gerboise. Les résultats montrent que, contrairement au rat, la CCK n'est jamais coexprimée ni dans les neurones à CRH parvicellulaires, ni dans les fibres à CRH de l'EM, aussi bien chez l'animal contrôle que stressé. Les neurones à CRH et à CCK montrent d'ailleurs un pattern de distribution différent au sein du NPV. En effet, nous avons montré que les cellules CRH-

immunoréactives occupent une position plus latérale que les cellules à CCK et les fibres à CRH forment un plexus très dense au niveau de la zone externe alors que les fibres à CCK se trouvent principalement dans la zone interne de l'éminence médiane. Ceci montre à l'évidence que dans des conditions physiologiques et expérimentales, la CCK et la CRH (contrairement au rat) ne sont pas colibérées dans le sang portal. L'augmentation de l'expression de la CCK suite à un stress d'immobilisation ne semble pas être complètement destinée à la projection péri-portale puisque, d'une part les neurones à CRH n'expriment pas la CCK et, d'autre part, les neurones à CCK du NPV sont fortement sollicités suite au stress d'immobilisation. Compte tenu de la divergence anatomique des deux systèmes neuronaux, il est peu probable qu'il y ait une interaction intracellulaire entre la CCK et la CRH dans le NPV parvicellulaire de la gerboise. En revanche, une éventuelle régulation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien par la CCK pourrait s'accomplir par une interaction intercellulaire entre la CCK et la CRH.

D'autre part, malgré la faible densité de fibres CCK-immunoréactives au niveau de la zone externe de l'éminence médiane, pouvant être expliquée par une libération massive dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire, on ne peut exclure un éventuel rôle hypophysiotrope de la CCK chez la gerboise. Dans ce contexte, il serait intéressant d'explorer dans le futur s'il y aurait une éventuelle augmentation de la densité des fibres à CCK de l'éminence médiane suite au stress d'immobilisation. Par ailleurs, la forte expression de la CCK, matérialisée par un plus grand nombre de neurones CCK-immunoréactifs chez l'animal stressé pourrait aussi être orientée vers d'autres régulations physiologiques liées au stress. La connaissance des sites de projection de ces neurones parvicellulaires à CCK et donc les cibles anatomiques des ces projections inconnues à nos jours chez la gerboise apporterait certainement des éléments de réponse dans ce sens. Il serait alors utile de procéder dans le futur, par des techniques de traçage neuronal pour connaître ces sites de projection et donc mieux cerner les éventuelles orientations fonctionnelles impliquant la CCK parvicellulaire.

En conclusion, ces données argumentent l'implication de la CCK dans la réponse au stress chez la gerboise d'une part et d'autre part elles montrent que les mécanismes sous-jacents seraient spécifiques de la gerboise.

Par ailleurs nos résultats morphofonctionnels montrent la présence de l'AVP au niveau de la partie parvicellulaire du NPV. La distribution des neurones à AVP s'est révélée comparable à celle décrite chez le rat. En effet, ils occupent une position connue pour jouer

un rôle pilote dans la réponse neuroendocrinienne au stress. Dans l'éminence médiane de la gerboise, les fibres à AVP se trouvent principalement dans la zone interne mais également dans la zone externe. Une telle distribution argumente un éventuel rôle hypophysiotrope de l'AVP chez la gerboise.

Contrairement à la CRH et à la CCK, le contexte expérimental de stress aigu d'immobilisation de 30 minutes ne provoque aucune variation significative dans le nombre de neurones exprimant l'AVP chez la gerboise. Cependant, une immobilisation aiguë plus longue de deux heures provoque une augmentation de l'expression génique de l'AVP parvicellulaire chez le rat. Par conséquent, la durée du stimulus, comme sa nature et son intensité, pourrait jouer un rôle critique dans le contrôle de la plasticité sécrétoire de l'AVP au sein NPV parvicellulaire. Pour mieux apprécier le rôle de la durée du stimulus dans un tel contrôle, on envisage comme perspective d'évaluer l'impact d'un stress aigu d'immobilisation d'une durée plus longue (2 heures par exemple).

Comme la CCK, l'AVP est connue pour participer à la plasticité phénotypique des neurones à CRH du NPV en fonction des circonstances physiologiques ou expérimentales. L'étude menée chez des gerboises contrôles ou stressées a montré la coexpression intraneuronale de la CRH et de l'AVP, aussi bien dans les neurones à CRH du NPV parvicellulaire que dans les fibres à CRH de l'éminence médiane (externe et interne). De plus, cette coexpression ne dépend pas des conditions expérimentales auxquelles ont été soumises les gerboises puisque le nombre de cellules doublement marquées CRH/AVP reste stable chez les animaux contrôles et stressés. L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle modulateur de type autocrine, paracrine ou endocrine de l'AVP parvicellulaire chez la gerboise, rôle qui serait indépendant d'un stimulus stressant.

Par ailleurs, le nombre de neurones parvicellulaires à AVP/CRH est significativement plus important dans le NPV antérieur. Par conséquent, la plasticité phénotypique des neurones parvicellulaires à CRH localisés dans la partie antérieure du NPV pourrait impliquer d'avantage l'AVP comme neuropeptide accessoire comparativement à la partie postérieure. Ce résultat argumente une régionalisation phénotypique des neurones parvicellulaires.

Notre travail a aussi validé l'existence de la coexpression AVP/CCK dans les mêmes neurones du NPV parvicellulaire et dans les mêmes fibres de l'EM. Cette coexpression paraît comparable chez l'animal contrôle et stressé. Le niveau de coexpression est cependant quantitativement plus important dans le NPV postérieur. Ceci suggère que cette partie anatomique du NPV impliquerait d'avantage des interactions intracellulaires entre ces deux neuropeptides.

Ces résultats de coexpression démontrent clairement la présence d'au moins deux populations neuronales à AVP distinctes dans le NPV parvicellulaire de la gerboise puisque la CCK et la CRH ne sont jamais colocalisées à ce niveau. Il existerait donc plusieurs groupes de neurones phénotypiquement distincts dans la partie parvicellulaire du NPV, chacun étant caractérisé par sa capacité à régler l'expression du neuropeptide de façon dépendante du stimulus et peut être aussi de l'espèce.

Comme de l'AVP et contrairement à la CCK et à la CRH, nos résultats montrent que l'expression de l'OXY au sein du NPV parvicellulaire de la gerboise ne dépend pas du stress aigu d'immobilisation. Compte tenu de ce résultat et de données de la littérature, la durée du stimulus, comme sa nature et son intensité, pourrait jouer un rôle critique dans le contrôle de la plasticité sécrétoire de l'OXY au sein NPV parvicellulaire.

Une investigation plus poussée des interactions entre neuropeptides du NPV parvicellulaire montre que les neurones à CCK coexpriment également l'OXY aussi bien chez les gerboises contrôles que stressées. Cette fois encore, le nombre de cellules OXY/CCK ne change pas suite au stress d'immobilisation. Ceci n'exclue cependant pas un rôle modulateur permanent de l'ocytocine sur l'action générale de la CCK dans ces conditions expérimentales.

Nous avons aussi relaté dans ce travail la présence de colocalisations OXY/CRH dans les neurones du NPV parvicellulaire et dans les fibres de l'éminence médiane externe. Comme pour l'AVP, ces résultats de coexpression montrent la présence chez la gerboise d'au moins deux populations neuronales distinctes à OXY dans la partie parvicellulaire du NPV. Le type d'interaction entre la CRH et l'OXY parvicellulaires (autocrine et/ou paracrine) reste à déterminer.

Outre la complexité fonctionnelle, mise en évidence, des systèmes neuronaux parvicellulaires du NPV, la présente étude démontre des différences dans les circuits neuropeptidergiques hypothalamiques entre la gerboise et le rat ainsi que dans les mécanismes neuroendocriniens de réponse au stress impliquant la CRH, la CCK, l'AVP ou l'OXY. Elle argumente d'avantage le fait que les mécanismes physiologiques adaptatifs aux conditions environnementales varient d'une espèce à l'autre.

Ces données très informatives d'immunohistochimie qui sont d'ordre qualitatif et quantitatif seront complétées dans le futur par des études de l'expression génique de ces neuropeptides en utilisant l'approche moléculaire d'hybridation in situ afin de mieux apprécier le comportement des neurones à CCK, à CRH, à AVP et à OXY dans différentes circonstances de stress telles l'immobilisation et le stress immun.



## **FIGURES**

## ***Figure 1***

Marquage immunohistochimique des neurones à CRH dans la partie parvicellulaire du NPV et dans l'EM chez la gerboise stressée.

**(A, B)** Coupes frontales au niveau du NPV. La gerboise a été colchicinisée immédiatement après un stress d'immobilisation (30min) et sacrifiée 24h après. La majorité des cellules CRH-immunoréactives occupe la partie parvicellulaire du NPV.

**(C, D)** Coupes frontales au niveau de l'EM chez la gerboise non colchicinisée. Les fibres CRH-immunopositives constituent un plexus dense localisé au niveau de la zone externe de l'EM.

CRH : corticotropin-releasing hormone

3V : troisième ventricule

EM : éminence médiane

NPV : noyau paraventriculaire

x 3(A); x 16(B,D); x 6(C).

## ***Figure 2***

Marquage immunohistochimique des neurones à CCK dans la partie parvicellulaire du NPV hypothalamique et dans l'EM chez la gerboise stressée.

**(A, B, C)** Coupes frontales au niveau du NPV, la gerboise a été colchicinisée immédiatement après un stress d'immobilisation (30 min) et sacrifiée 24 h après. La totalité des cellules CCK-IR occupe la partie parvicellulaire du NPV.

**(D, E, F)** Coupes frontales au niveau de l'EM chez la gerboise non colchicinisée. Les fibres CCK-IR sont localisées surtout au niveau de la zone interne (E). Des fibres sont aussi détectables dans la zone externe de l'EM (F)

CCK : cholécystokinine

3V : troisième ventricule

EM : éminence médiane

NPV : noyau paraventriculaire

x 2,5(A); x 12(B); x 25(C, D); x 50(E); x 40(F).

### *Figure 3*

- (A)** Coupes frontales schématiques du cerveau de la gerboise représentant la distribution topographique rostro-caudale des neurones CCK-immunoréactifs ( CCK-IR) dans les régions hypothalamique et limbique chez la gerboise contrôlée colchicinisée. Les principales régions où l'on observe la présence de neurones CCK-IR : l'aire préoptique médiane (MPO), le noyau supra optique (SON), le noyau paraventriculaire hypothalamique (PVN), l'amygdale (AM), l'aire rétrochiasmatique (RCH) et le noyau arqué (ARC).
- (B)** Coupes frontales schématiques représentant la distribution topographique rostro-caudale des neurones CCK-immunoréactifs ( CCK-IR) et CRH-immunoréactifs (CRH-IR) au niveau du NPV d'une gerboise contrôlée colchicinisée. La densité des symboles est proportionnelle à la densité neuronale; un symbole représentant quatre neurones. Ce schéma montre un pattern de distribution des neurones CCK-IR différent de celui des neurones CRH-IR .

Cpu : caudé-putamen

CC : corps calleux

OX : chiasma optique

### ***Figure 4***

Marquage immunohistotochimique des neurones à CCK dans la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise contrôle et stressée.

**(A, A')** Coupes frontales au niveau du NPV chez une gerboise contrôle colchicinisée (CC).  
La densité des neurones CCK-IR au niveau du NPV parvicellulaire de la gerboise contrôle apparaît faible.

**(B, B')** Coupes frontales au niveau du NPV chez une gerboise stressée colchicinisée (SC).  
La densité des corps cellulaires CCK-IR apparaît plus importante comparativement à celle chez la gerboise contrôle.

3V : troisième ventricule

CC : gerboise contrôle colchicinisée

SC : gerboise stressée colchicinisée

x 12(A, A'); x 25(B, B').

### ***Figure 5***

Marquage immunohistochimique des neurones à CRH dans la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise contrôle et stressée.

**(A, A')** Coupes frontales au niveau du NPV chez une gerboise contrôle colchicinisée (CC).

Les neurones CRH-immunoréactifs se concentrent dans les parties médianes du NPV parvicellulaire.

**(B, B')** Coupes frontales au niveau du NPV chez une gerboise stressée colchicinisée (SC).

Une plus forte densité neuronale CRH-IR apparaît chez la gerboise stressée comparativement à la gerboise contrôle.

3V : troisième ventricule

CC : gerboise contrôle colchicinisée

SC : gerboise stressée colchicinisée

x 12(A, A'); x 25(B, B').

## *Figure 6*

Analyse quantitative du nombre de neurones CCK-IR et CRH-IR au niveau du NPV hypothalamique chez deux groupes d'animaux :

- Le groupe de gerboises contrôles colchicinisées (n = 5).
- Le groupe de gerboises stressées colchicinisées (n = 5).

Les valeurs obtenues représentent la moyenne du nombre relatif des cellules immunoréactives par coupe et par groupe expérimental plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (moyenne  $\pm$  SEM). Le test utilisé pour l'analyse des moyennes est le test de student.

L'utilisation du test de student a permis de mettre en évidence :

1. Une différence significative dans le nombre moyen du des cellules CCK-IR chez les deux groupes contrôle et stressé ( \*P<0,05 ). Chez la gerboise stressée, le nombre de cellules CCK-IR augmente significativement comparativement à la gerboise contrôle.
2. Une différence significative dans le nombre moyen du des cellules CRH-IR chez les deux groupes contrôle et stressé (\*\*\*P<0,001). Chez la gerboise stressée, le nombre de cellules CRH-IR augmente significativement comparativement à la gerboise contrôle.

## **Figure 7**

Double marquage immunohistochimique CCK/CRH sur des coupes frontales au niveau du NPV de la gerboise stressée, utilisant la technique d'éluion qui consiste à effacer un premier marquage et faire, par la suite, une seconde réaction IHC et donc un second marquage afin de repérer les cellules doublement marquées.

**(A, B)** Photos montrant la validité de la technique d'éluion pour effacer le premier marquage (CCK, A), le deuxième anticorps utilisé est un anti-CRH (B) :

(A) Présence des cellules CCK-IR (flèches noires).

(B) Effacement des mêmes cellules CCK-IR (flèches blanches).

**(C, D)** Aucune cellule CCK-IR (flèche noire) (C) n'est CRH-IR (flèche blanche) (D). Il y a donc une absence totale de double marquage.

3V : troisième ventricule

x 16(A, B, C, D).



### ***Figure 8***

Double marquage immunohistochimique (CCK/CRH) sur des coupes frontales au niveau de l'EM d'une gerboise stressée non colchicinisée, utilisant la technique d'éluion qui consiste à effacer un premier marquage (CCK) et faire par la suite un deuxième marquage (CRH) afin de repérer les cellules doublement marquées.

**(A, B)** Photos montrant l'absence de double marquage CCK/CRH au niveau de la zone interne de l'EM :

(A) Présence de fibres CCK-IR au niveau de la zone interne de l'EM (flèche noire).

(B) Après effacement des fibres CCK-IR, ces mêmes fibres ne sont pas CRH-IR (flèche blanche). Il y a donc une absence du double marquage CCK/CRH.

**(C, D)** Photos montrant l'absence de double marquage CCK/CRH au niveau de la zone externe de l'EM :

(C) Présence de fibres CCK-IR au niveau de la zone externe de l'EM (flèche noire).

(D) Après effacement des fibres CCK-IR, ces mêmes fibres ne sont pas CRH-IR (flèche blanche). Il y a donc une absence du double marquage CCK/CRH.

3V : troisième ventricule

x 50( A, B, C, D).

## **Figure 9**

Marquage immunohistochimique des neurones à AVP sur une coupe frontale au niveau du NPV de la gerboise stressée colchicinisée.

**(A)** A faible grossissement, une forte densité de neurones AVP-IR apparaît dans le NPV parvicellulaire. La partie magnocellulaire exprime aussi des corps cellulaires AVP-IR.

**(B, C)** A fort grossissement (parties encadrées en A), on observe une forte immunoréaction dans les cellules à AVP mais aussi dans leurs prolongements. Les noyaux cellulaires apparaissent immunonégatifs.

AVP : vasopressine

3V : troisième ventricule

NPV : noyau paraventriculaire

x 4(A); x 25(B); x 16(C).

## ***Figure 10***

Marquage immunohistochimique des fibres à AVP sur une coupes frontales au niveau de l'EM de la gerboise contrôle non colchicinisée .

- (A)** A faible grossissement, une forte densité de fibres nerveuses AVP-IR apparaît dans la zone interne de l'EM. Des fibres AVP-IR apparaissent aussi dans la zone externe de l'EM. Cependant, l'immunomarquage est plus dense dans la partie interne.
- (B)** Détail de la zone interne de l'EM à plus fort grossissement.
- (C)** Détail de la zone externe de l'EM à plus fort grossissement. Les prolongements nerveux sont très concentrés autour des capillaires sanguins.

AVP : vasopressine

3V : troisième ventricule

EM : éminence médiane

x 10(A); x 40(B, C).

### ***Figure 11***

Analyse statistique par quantification du nombre de cellules AVP-IR au niveau du NPV parvicellulaire chez deux groupes d'animaux :

- Un premier groupe de gerboises contrôles colchicinisées (n = 5).
- Un deuxième groupe de gerboises stressées colchicinisées (n = 5).

Les valeurs obtenues représentent le nombre moyen relatif des cellules AVP-IR par coupe et par groupe expérimental plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (moyenne  $\pm$  SEM). On n'observe aucune différence significative.

## **Figure 12**

Double marquage immunohistochimique (CCK/AVP) sur des coupes frontales au niveau du NPV et de l'EM en utilisant la technique d'éluion qui consiste à effacer un premier marquage (CCK) et faire par la suite un deuxième marquage (AVP) afin de repérer les cellules doublement marquées.

**(A, B)** Photos montrant la présence de double marquage CCK/AVP :

**(A)** Présence des cellules CCK-IR (flèches noires).

**(B)** certaines cellules CCK-IR sont aussi AVP-IR (flèches noires) ; d'autres cellules deviennent immunonégatives (têtes de flèche blanches).

On note la présence de trois populations cellulaires :

1. des cellules qui coexpriment en même temps la CCK et l'AVP
2. des cellules qui n'expriment que la CCK
3. des cellules qui n'expriment que la VP

**(C, D)** Photos montrant la colocalisation de la CCK (flèche noire, C) et de l'AVP (flèche noire, D) dans les mêmes fibres au niveau de zone externe de l'EM.

Chaque barre d'échelle représente 50  $\mu$ m

3V : troisième ventricule

CCK : cholécystokinine

AVP : vasopressine

x 25(A, B); x 40(C, D).

### **Figure 13**

Double marquage immunohistochimique AVP/CRH sur des coupes frontales au niveau du NPV et de l'EM en utilisant la technique d'éluion qui consiste à effacer un premier marquage (AVP) et faire par la suite un deuxième marquage (CRH) afin de repérer les cellules doublement marquées.

**(A, B)** : Photos montrant la présence de cellules doublement marquées AVP/CRH :

**(A)** Présence de cellules AVP-IR (flèches noires).

**(B)** Les mêmes cellules AVP-IR sont aussi CRH-IR (flèches noires) et d'autres cellules AVP-IR deviennent CRH-immunonégatives (têtes de flèches blanches).

On note la présence de trois populations cellulaires :

1. des cellules qui coexpriment l'AVP et la CRH.
2. des cellules qui n'expriment que l'AVP.
3. des cellules qui n'expriment que la CRH.

**(C, D)** Photos montrant la colocalisation de l'AVP (flèche noire, C) et de la CRH (flèche noire, D) dans les même fibres au niveau de zone externe de l'EM.

Chaque barre d'échelle représente 50  $\mu\text{m}$

3V : troisième ventricule

CRH : corticotropin-releasing hormone

AVP : vasopressine

x 25(A, B); x 40(C, D).

### ***Figure 14***

- (A)** Coupes frontales schématiques représentant la distribution topographique rostro-caudale des cellules doublement marquées CCK/AVP au niveau du NPV de la gerboise contrôlée colchicinisée. La densité des symboles est proportionnelle à la densité neuronale; un symbole représentant deux cellules. Le schéma montre que la plupart des cellules doublement marquées se trouvent principalement au niveau du NPV postérieur.
- (B)** Coupes frontales schématiques représentant la distribution topographique rostro-caudale des cellules doublement marquées AVP/CRH au niveau du NPV de la gerboise contrôlée colchicinisée. La densité des symboles est proportionnelle à la densité neuronale; un symbole représentant trois cellules. Le schéma montre que la plupart des cellules doublement marquées se trouvent principalement au niveau du NPV antérieur.

### **Figure 15**

**(A)** Analyse statistique du nombre des cellules doublement marquées AVP/CCK et AVP/CRH au niveau du NPV parvicellulaire de deux groupes d'animaux :

- Un premier groupe de gerboises contrôles colchicinisées (n = 5).
- Un deuxième groupe de gerboises stressées colchicinisées (n = 5).

Les valeurs obtenues représentent le nombre moyen relatif des cellules doublement marquées par coupe et par groupe moins l'erreur standard à la moyenne (moyenne  $\pm$  SEM). On n'observe aucune différence significative dans les doubles marquages entre les gerboises contrôles et stressées

**(B)** Analyse statistique du nombre des cellules doublement marquées AVP/CCK et AVP/CRH au niveau du NPV antérieur et postérieur chez la gerboise contrôle colchicinisée :

- Le NPV antérieur (n = 5)
- Le NPV postérieur (n = 5)

Les valeurs obtenues représentent le nombre moyen relatif des cellules doublement marquées par coupe et par groupe moins l'erreur standard à la moyenne (moyenne  $\pm$  SEM). L'utilisation du test de student a permis de mettre en évidence :

1. Une différence significative dans le nombre moyen des cellules doublement marquées AVP/CCK entre les deux parties antérieure et postérieure du NPV (\*\*\*P<0,001 ). La plupart des cellules doublement marquées se trouvent au niveau de la partie postérieure du NPV.
2. Une différence significative dans le nombre moyen des cellules doublement marquées AVP/CRH entre les deux moitiés antérieure et postérieure du NPV (\*\*\*P<0,001).La plupart des cellules doublement marquées se trouvent au niveau de la partie antérieure du NPV.



## **Figure 16**

Marquage immunohistochimique des neurones à OXY sur coupes frontales au niveau du NPV de la gerboise stressée colchicinisée .

**(A)** A faible grossissement, les neurones OXY-IR sont localisés aussi bien dans les parties périventriculaires que latérales du NPV parvicellulaire.

**(B, C)** A plus fort grossissement, les neurones à OXY fortement immunopositifs apparaissent morphologiquement étoilés au niveau latéral et fusiformes au niveau périventriculaire.

OXY : ocytocine

3V : troisième ventricule

NPV : noyau paraventriculaire

x 5(A); x 16(B, C).

### ***Figure 17***

Marquage immunohistochimique des fibres à OXY sur coupes frontales au niveau de l'EM chez la gerboise contrôlée non colchicinisée .

- (A)** A faible grossissement, une forte densité de fibres nerveuses OXY-IR apparaît dans la zone interne de l'EM.
  
- (B)** Détail de la zone interne de l'EM à plus fort grossissement
  
- (C)** Détail de la zone externe de l'EM à plus fort grossissement. Les prolongements nerveux OXY-IR y sont très rares et sont surtout localisées autour de capillaires sanguins.

OXY : ocytocine

3V : troisième ventricule

EM : éminence médiane

x 10(A); x 40(B, C).

## **Figure 18**

Double marquage immunohistochimique OXY/CRH et OXY/CCK sur des coupes frontales au niveau du NPV et de l'EM en utilisant la technique d'éluion qui consiste à effacer un premier marquage (AVP) et faire par la suite un deuxième marquage (CRH) afin de repérer les cellules doublement marquées.

**(A, B)** Photos montrant la présence de cellules doublement marquées OXY/CRH :

**(A)** Présence de cellules OXY-IR (flèches noires).

**(B)** Les mêmes cellules OXY-IR sont aussi CRH-IR (flèches noires) et d'autres cellules et OXY-IR deviennent CRH-immunonégatives (têtes de flèches blanches).

On note la présence de trois populations cellulaires :

4. des cellules qui coexpriment l'OXY et la CRH.
5. des cellules qui n'expriment que l'OXY.
6. des cellules qui n'expriment que la CRH.

**(C, D)** Photos montrant la colocalisation de la CCK (flèche noire, C) et de l'OXY (flèche noire, D) dans les mêmes cellules au niveau du NPV parvicellulaire, et la non colocalisation CCK/OXY dans d'autres cellules (tête de flèche noire, C ; tête de flèche blanche, D).

On note la présence de trois populations cellulaires :

- des cellules qui coexpriment l'OXY et la CCK
- des cellules qui n'expriment que l'OXY
- des cellules qui n'expriment que la CCK

OXY : ocytocine

CRH : corticotropin-releasing hormone

CCK : cholécystokinine

3V : troisième ventricule

x 25(A, B, C, D).

### ***Figure 19***

Coupes frontales avec un double marquage immunohistochimique (OXY/CRH) au niveau de l'EM chez la gerboise contrôle non colchicinisée.

**(A,B)** montre la colocalisation de l'OXY (flèche noire, A) et de la CRH (flèche noire, B) dans les mêmes fibres au niveau de la zone interne de l'EM.

**(C,D)** montre la colocalisation de l'OXY (flèche noire, C) et de la CRH (flèche noire, D) dans les mêmes fibres au niveau de la zone externe de l'EM.

x 50(A, B, C, D).

## **Figure 20**

**(A)** Analyse statistique du nombre de neurones OXY-IR au niveau du NPV de deux groupes d'animaux :

- Un premier groupe de gerboises contrôles colchicinisées (n = 5).
- Un deuxième groupe de gerboises stressées colchicinisées (n = 5).

Les valeurs obtenues représentent le nombre moyen relatif des cellules immunoréactives par coupe et par groupe expérimental plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (moyenne  $\pm$  SEM). On n'observe aucune différence significative.

**(B)** Analyse quantitative du nombre de cellules doublement immunomarquées OXY/CCK et OXY/CRH au niveau du NPV de deux groupes d'animaux :

- Un premier groupe de gerboises contrôles colchicinisées (n = 5).
- Un deuxième groupe de gerboises stressées colchicinisées (n = 5).

Les valeurs obtenues représentent le nombre moyen relatif des cellules doublement marquées par coupe et par groupe expérimental plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (moyenne  $\pm$  SEM). On n'observe aucune différence significative entre les gerboises contrôles et stressées pour les deux cas de double marquage.

**(C)** Analyse statistique du nombre des cellules doublement marquées OXY/CRH chez des gerboises contrôles colchicinisées au niveau de deux parties différentes du NPV :

- Le NPV antérieur (n = 5)
- Le NPV postérieur (n = 5)

Les valeurs obtenues représentent le nombre moyen relatif des cellules doublement marquées par coupe et par zone plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (moyenne  $\pm$  SEM).

L'utilisation du test de student a permis de mettre en évidence une différence significative dans le nombre moyen des cellules doublement marquées OXY/CRH au niveau des deux parties antérieure et postérieure du NPV (\*\*\*) $P < 0,001$  ). La plupart des cellules doublement marquées se trouvent au niveau de la partie antérieure du NPV.

## ***Figure 21***

**(A)** Coupes frontales schématiques représentant la distribution topographique rostro-caudale des neurones doublement marqués OXY/CCK au niveau du NPV de la gerboise colchicinisée. La densité des symboles est proportionnelle à la densité neuronale; un symbole représentant une cellule.

**(B)** Coupes frontales schématiques représentant la distribution topographique rostro-caudale des neurones doublement marqués OXY/CRH au niveau du NPV de la gerboise colchicinisée. La densité des symboles est proportionnelle à la densité neuronale; un symbole représentant une cellule.

Le schéma montre que la plupart des cellules doublement marquées se trouvent principalement au niveau du NPV antérieur.

## **BIBLIOGRAPHIE**

**Alonso G.** Effects of colchicines on intraneuronal transports of secretory material in hypothalamic neurosecretory neurons. *Neurosci. Lett.* **26** (1986).

**Abe K, Hiroshige T.** Changes in plasma corticosterone and hypothalamic CRF levels following intraventricular injection or drug-induced changes of brain biogenic amines in the rat. *Neuroendocrinology.* **14**: 195-201 (1974).

**Agnati L, Fuxe K, Yu Z, Harfstrand A, Oleret S, Wikstrom A, Goldstein M, Zoli M, Yale W, Gustafsson J.** Morphometrical analysis of the distribution of corticotropin-releasing factor, glucocorticoid receptor and phenylethanolamine-N-methyltransferase immunoreactive structures in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* **54**: 147-152 (1985).

**Akana SF, Cascio CS, Du JZ, Levin N, Dallman MF.** Reset of feedback in the adrenocortical system: An apparent shift in sensitivity of adrenocorticotropin to inhibition by corticosterone between morning and evening. *Endocrinology.* **119**:2325-2332 (1986).

**Al-Damluji S, Thomas R, White A, Besser M.** Vasopressin mediates alpha 1-adrenergic stimulation of adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology.* **126**: 1989-1995 (1990).

**Allen JP, Allen CF.** Amygdalar participation in tonic ACTH secretion in the rat. *Neuroendocrinology.* **15**: 115-125 (1975).

**Allen JP, Allen CF, Greer MA, Jacobs JJ.** Stress-induced secretion of ACTH. In S. Brodish and E. S. Redgate (eds). Brain-pituitary-adrenal interrelationships, *Karger, Basel.* pp. 99-127 (1973).

**Andjus RK, El Hilali M, Veillat JP, Baddouri K.** Tolerance of one species of jerboa (*Jaculus orientalis*) to prolonged exposure to deep hypothermia. *J Physiol (Paris)* **68**: 531-542 (1974).

**Andreis PG, Neri G, Belloni AS, Mazzochi G, Kasprzak A, Nussdorfer G.** Interleukin-1 $\beta$  enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. *Endocrinology.* **129**: 53-57 (1991).



**Antakly T, Eisen H.** Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptors in target cells. *Endocrinology*. **115**: 1984-1989 (1984).

**Antoni FA.** Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr.Rev.* **7**: 351-378 (1986).

**Antoni FA, Kovacs KJ, Dohantis J, Makara GB, Holmes MC, Mazurek MF.** Hypophysiotrophic function of vasopressin and oxytocin. *Brain Res Bull.* **6**: 729-36 (1988).

**Antoni FA, Palkovits M, Makara GB, Linton EA, Lowry PJ, Kiss JZ.** Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in the hypothalamoinfundibular tract. *Neuroendocrinology*. **36**:415-423 (1983).

**Armstrong WE, Hatton GI.** The localization of projection neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus following vascular and neurohypophysial injections of HRP. *Brain Res. Bull.* **5**: 473-477 (1980).

**Armstrong WE, Warach S, Hatton GI, McNeill TH.** Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience*. **5**: 1931-1958 (1980).

**Baddouri K, Butien D, Imbert-Teboul M, Le bouffant F, Marchetti J, Cabardes D, Morel F.** Plasma antidiuretic hormone levels and kidney responsiveness to vasopressin in the jerboa, *Jaculus orientalis*. *Gen Comp Endocrinol.* **54**: 203-215 (1984).

**Baddouri K, El Hilali M, Marchetti J, Menard J.** Renal excretion capacity in hydrated desert rodents (*Jaculus orientalis* and *Jaculus deserti*). *J Comp Physiol [B]* **157** : 237-240 (1987).

**Banks D, Harris MC.** Lesions of the locus coeruleus abolish baroreceptor-induced depression of supraoptic neurons in the rat. *J. Physiol.* **355**: 383-398 (1984).

**Barakat Y, Pape JR, Boutahricht M, El Ouezzani S, Alaoui A, Chaigniau M, Tramu G, and Magoul R.** Immunocytochemical detection of CCK and CRH neuropeptides in the hypothalamic paraventricular nucleus of the Jerboa (*Jaculus Orientalis*) : Modulation by immobilization stress. *J. Neuroendocrinology*. **18** : 767-775 (2006).

**Barbanel G, Ixart G, Assenmacher I.** In vivo infusion of adrenaline stimulates corticotropin-releasing hormone-41 producing neurons when given centrally but not distally. *J. Neuroendocrinol.* **3**: 145-148 (1991).

**Bartanusz V, Aubry JM, Jezova D, Baffi J, Kiss JZ.** Up-regulation of vasopressin mRNA in paraventricular hypophysiotropic neurones after acute immobilization stress. *Neuroendocrinology.* **58**: 625-629 (1993).

**Bello AR, Dubourg P, Kah O, Tramu G.** Identification of neurotensin-immunoreactive cells in the anterior pituitary of normal and castrated rats. A double immunocytochemical investigation at the light and electron microscopic levels. *Neuroendocrinology.* **55**: 714-723 (1992).

**Bereiter D, Plotsky P, Gann D.** Tooth pulp stimulation potentiates the adrenocorticotropin response to hemorrhage in cats. *Endocrinology.* **11**: 1127-1132 (1982).

**Berkenbosch F, Oers JV, Rey AD, Tilders F, Besedovsky H.** Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science.* **238**: 524-526 (1987).

**Besedovsky H, Rey AD, Sorkin E, Dinarello CA.** Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Nature.* **233**: 652-654 (1986).

**Birnberg N, Civelli O, Lissitzski J, Hinman M, Herbert E.** Regulation of pro-opiomelanocortin gene expression in the pituitary and central nervous system. *Endocrinology.* **110**: 134A (1982).

**Blessing W, Willoughby J.** Excitation of neuronal functions in the caudal ventro-lateral medulla elevates plasma vasopressin. *Neurosci. Lett.* **58**: 189-194 (1985).

**Bonaz B, Rivest S.** Effect of a chronic stress on CRF neuronal activity and expression of its type 1 receptor in the rat brain. *Am J Physiol.* **275**: R1438-R1449 (1998).

**Boutahricht M, Guillemot J, Montero-Hadjadje M, Bellafqih S, El Ouezzani S, Alaoui A, Yon L, Vaudry H, Anouar Y, Magoul R.** Biochemical characterization and immunocytochemical localization of the secretogranin II-derived peptide EM66 in the hypothalamus of the jerboa (*Jaculus Orientalis*): modulation by food deprivation. *J Neuroendocrinol.* **6**: 372-378 (2005).

**Bradbury MJ, Dallman MF.** Effects of hippocampal type I and type II receptor antagonists on ACTH levels in the PM. *Society for Neuroscience Abstr.* **15**: 2904 (1989).

**Bradbury MJ, Strack AM, Dallman MF.** Lesions of the hippocampal efferent pathway (fimbria-fornix) do not alter sensitivity of adrenocorticotropin to feedback inhibition by corticosterone in rats. *Neuroendocrinology.* **58**: 396-407 (1993).

**Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M.** Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food deprived rats. *Neuroendocrinology.* **52**: 441-447 (1990).

**Brownstein M, Eskay RL, Palkovits M.** Thyrotropin releasing hormone in the median eminence is in processes of paraventricular nucleus neurons *Neuropeptides.* **2**:197-201(1982).

**Buijs RM.** Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Am. J. Physiol.* **264**: R1186-1192 (1993).

**Carlson ED, Gann DS.** Responses of adrenocorticotropin and vasopressin to hemorrhage after lesions of the caudal ventrolateral medulla in rats. **406**: 385-390 (1987).

**Cascio CS, Shinsako J, Dallman MF.** (1987) The suprachiasmatic nuclei stimulate evening ACTH secretion in the rat. *Brain Res.* **423**: 173-178 (1987).

**Ceccatelli S, Cortes R, Hökfelt T.** Effect of reserpine and colchicine on neuropeptide mRNA levels in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Mol. Brain Res.* **9**: 57-69 (1991).

**Ceccatelli S, Eriksson M, Hokfelt T.** Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal

polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. **49**: 309-323 (1989).

**Chan RKW, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE.** A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J Neurosci*. **13**: 5126-5138 (1993).

**Childs G, Morell J, Niendorf A, Aguilera G.** Cytochemical studies of corticotropin releasing factor target cells and effects of dexamethasone on binding in anterior pituitary using a fluorescent analog of CRF. *Endocrinology*. **119**: 2129-2134 (1986).

**Ciofi P.** Phenotypical segregation among female rat hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons as revealed by the sexually dimorphic coexpression of cholecystokinin and neurotensin. *Neuroscience*. **99**: 133-147 (2000).

**Ciriello J, Caverson MM, Polosa C.** Function of the ventrolateral medulla in the control of the circulation. *Brain Res. Rev.* **11**: 359-391 (1986).

**Conde GL, Renshaw D, Lightman SL, Harbuz MS.** Serotonin depletion does not alter lipopolysaccharide-induced activation of the rat paraventricular nucleus. *J. Endocrinol.* **156**: 245-251 (1998).

**Condes-Lara M, Gonzalez NM, Martinez-Lorenzana G, Delgado OL, Freund-Mercier MJ.** Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Res.* **976**: 75-81 (2003).

**Cullinan WE.** Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neurosci.* **64**: 477-505 (1995).

**Cummings S, Seybold V.** Relationship of alpha-1- and alpha-2-adrenergic-binding sites to regions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus containing corticotropin-releasing factor and vasopressin neurons. *Neuroendocrinology*. **47**: 523-527 (1986).

**Dallman MF, Akana SF, Darlington ECD, Jacobson L, Levin N.** Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. Recent Prog. *Hormone Res.* **43**: 113-173 (1987).

**Dallman MF, Levin N, Cascio CS, Akana, SF, Jacobson L, Kuhn RW.** Pharmacological evidence that the inhibition of diurnal adrenocorticotropin secretion via type I corticosterone-preferring receptors. *Endocrinology.* **124**: 2944-2950 (1989)

**Dallman MF, Yates F.** Dynamic asymmetries in the corticosteroid feedback path and distribution-metabolism-binding elements of adrenocortical system. Ann. NY. *Acad. Sci.* **156**: 696-699 (1969).

**Darlington D, Shinsako J, Dallman MF.** Medullary lesions eliminate ACTH responses to hypotensive hemorrhage. *Am. J. Physiol.* **251**: R106-R110 (1986).

**Day TA, Ferguson AV, Renaud LP.** Facilitatory influence of noradrenergic afferents on the excitability of rat paraventricular nucleus neurosecretory cells. *J. Physiol.* **355**: 237-249 (1984).

**Day TA, Fergusson AV, Renaud LP.** Noradrenergic afferents facilitate the activity of tuberoinfundibular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* **41**: 17-20 (1985).

**Dayanithi G, Antoni F.** Rapid as well as delayed inhibition effects of glucocorticoid hormones on pituitary adrenocorticotropin hormone release are mediated by Type II glucocorticoid receptors and require newly synthesized messenger ribonucleic acid as well as protein. *Endocrinology.* **125**: 308-313 (1989).

**Decavel C, Van den Pol A.** Converging GABA- and glutamate immunoreactive axons make synaptic contact with identified hypothalamic neurosecretory neurons. *J. Comp. Neurol.* **316**: 104-116 (1992).

**Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, and Mechoulam R.** Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* **258**: 1946-1949 (1992).

**Dunn J.** Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.* **407**: 327-331 (1987).

**Dunn J, Orr SE.** Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Exp. Brain Res.* **54**: 1-6 (1984).

**Dunn J, Whitener J.** Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology.* **42**: 211-217 (1986).

**El Hilali M, Veillat JP.** jaculus orientalis : a true hibernator. *Mammalia* **39** : 402-404 (1975).

**El Ouezzani S, Tramu G, Lafon P, Magoul R.** Seasonal variations of the b-endorphin neuronal system in the mediobasal hypothalamus of the jerboa (Jaculus Orientalis). *Neurosci Lett.* **376** : 107-110 (2005).

**El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R.** GnRH neurosecretory system and its seasonal variations in jerboa brain. *J Neuroendocrinol.* **12**: 1205-1212 (2000).

**El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R.** Neuronal activity in the mediobasal Hypothalamus of jerboa in hibernation. *Neurosci Lett.* **260**, 13-16 (1999).

**El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R.** The neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus of the jerboa: modulation by food deprivation and relation with hibernation. *Neurosci Lett* **305**: 21-24 (2001).

**Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE.** A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J. Neurosci.* **14**: 897-913 (1994).

**Feldman S.** Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. *Brain Res.* **658**: 216-226 (1994).

**Feldman S, Conforti N.** Amygdalectomy inhibits adrenocortical responses to somatosensory and olfactory stimulation. *Neuroendocrinology*. **32**: 330-334(1981).

**Feldman S, Conforti N, Melamed E.** Paraventricular nucleus serotonin mediates neurally stimulated adrenocortical secretion. *Brain Res. Bull.* **18**: 165-168 (1987).

**Fendler K, Karmos G, Telegdy G.** The effect of hippocampal lesion on pituitary-adrenal function. *Acta Physiol.* **20**: 283-297 (1961).

**Foote SL, Aston-Jones G, Bloom FE.** The nucleus locus coeruleus : new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol. Rev.* **63**: 844-914 (1983).

**Frim D, Robinson B, Pasiega K, Majzoub J.** Differential regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in rat brain. *Am J. Physiol.* **258**: E686-E692 (1990).

**Funder J.** Glucocorticoid receptors and the physiological roles of glucocorticoid hormones. *Endocrinology: Proceedings of the International Congress of Endocrinology*. Eds F. Labrie and L. Proulx, Amsterdam: *Elsevier*. pp. 545-548 (1984).

**Gaillet S, Alonso G, Borgne RL, Barbanel G, Malaval F, Assenmacher I, Szafarczyk A.** Effects of discrete lesions in the ventral noradrenergic ascending bundle on the corticotropic stress response depend on the site of the lesion and on the plasma levels of adrenal steroids. *Neuroendocrinology*. **58**: 408-419 (1993).

**Gaillet S, Lachuer J, Malaval F, Assenmacher I, Szafarczyk A.** The involvement of noradrenergic ascending pathways in the stress-induced activation of ACTH and corticosterone secretions is dependent on the nature of stressors. *Exp. Brain Res.* **87**: 173-180 (1991).

**Gann DS.** Neural control of ACTH release in response to hemorrhage. *Ann. Y Acad. Sci.* **297**: 477-496 (1977).

**Ganong W, Klammer N, Salmon J, Reid L, Lovinger R, Scapagnini D, Boryczka A, Shackelford R.** Pharmacological evidence for inhibition of ACTH secretion by a central noradrenergic system in the dog. *Neurosci.* **1**: 167-174 (1976).

**Gillies G, Unton E, Lowry P.** Corticotropin-releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature.* **299**: 355-357 (1982).

**Giovannelli L, Shiromani PJ, Jirikowski GF, Bloom FE.** Expression of c-fos protein by immunohistochemically identified oxytocin neurons in the rat hypothalamus upon osmotic stimulation. *Brain Res.* **1**: 41-8 (1992).

**Girod C.** Introduction à l'étude des glandes endocrines, *Simep, Villeurbanne*, **408** p. *2eme édition*, (1980) .

**Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE.** Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology.* **62**: 147-154 (1995).

**Gray TS.** Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. *Neuroendocrinology.* **57**: 517-524 (1993).

**Gurdjian ES.** The diencephalon of the albino rat. Studies on the brain of the rat. *J. Comp. Neurol.* **43**: 1-114 (1927).

**Harbuz MS, Chalmers J, Souza LD, Lightman SL.** Stress-induced activation of CRF and c-fos mRNAs in the paraventricular nucleus are not affected by serotonin depletion. *Brain Res.* **609**: 167-173 (1993).

**Harbuz MS, Nicholson SA, Gillham B, Lightman SL.** Stress responsiveness of hypothalamic corticotropin-releasing factor and pituitary pro-opiomelanocortin mRNAs following high-dose glucocorticoid treatment and withdrawal in the rat. *J Endocr.* **127**: 407–415 (1990).



**Harfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini L, Wikstrom A, Okret S, Yu Z, Goldstein M, Steinbusch H, Verhofstad A, Gustafsson J.** Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 9779-9783 (1986).

**Heath W, Allison J, Hoffman M, Schoenrich G, Haemmerling G, Arnold B, Miller J.** Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature.* **359**: 547-549 (1992).

**Herkenham M.** In *Canabinoid Receptors (Pertwee R.G., Ed.). Academic Press, London/San Diego.* pp.145-166 (1995).

**Herman JP, Adams D, Prewitt C.** Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology.* **61**: 180–190 (1995).

**Herman JP, Schäfer MKH, Young EA., Thompson R, Douglass J, Akil H, Watson SJ.** Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J. Neurosci.* **9**: 3072-3082 (1989).

**Herman JP, Wiegand SJ, Watson SJ.** Regulation of basal corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus: effects of selective hypothalamic deafferentations. *Endocrinology.* **127**: 2408-2417 (1990).

**Hisano F, Fukui Y, Chikamori-Aoyama M, Aizawa T, Shibasaki T.** Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive and TRH-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.* **620**: 343-346 (1993).

**Hisano S, Chikamori-Aoyama M, Aizawa T, Fukui Y.** Somatostatinlike immunoreactive axon terminals on oxytocin-like immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* **156**: 21-23 (1995).

**Hisano S, Li S, Kagotani Y, Daikoku S.** Synaptic associations between oxytocin-containing magnocellular neurons and neurons containing corticotropin-releasing factor in the rat magnocellular paraventricular nucleus. *Brain Res.* **576**: 311-318 (1992).

**Hofman GE, Smith MS, and Verdalis JG.** In *Frontiers in Neuroendocrinology*, Vol. 14 (Ganong W.F., and Martin L., Eds.), *Raven Press, New York.* pp: 173-213, (1993).

**Hökfelt T, Everitt BJ, Theodorsson-Norheim E, Goldstein M.** Occurrence of neurotensin-like immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J. Comp. Neurol.* **222**: 543-559 (1984).

**Hökfelt T, Fahrenkrug J, Ju G, Ceccatelli S, Tsuruo Y, Meister B, Mutt V, Rundgren M, Brodin E, Terenius L, Hulting AL, Werner S, Björklund H, Yale W.** Analysis of peptide histidine-isoleucine/vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the central nervous system with special reference to their relation to corticotropin releasing factor- and enkephalin-like immunoreactivities in the paraventricular hypothalamic nucleus. *Neurosci.* **23**: 827-857 (1987).

**Imaki T, Nahan JL, Rivier C., Sawchenko PE, Yale W.** Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *J. Neurosci.* **11**: 585-599 (1991).

**Jacobson L, Akana SF, Cascio CS, Shinsako J, Dallman MF.** Circadian variations in plasma corticosterone permit normal termination of adrenocorticotropin responses to stress. *Endocrinology.* **122**: 1343-1348 (1988).

**Jacobson L, Akana SF, Scribner K, Dallman MF.** The adrenocortical system responds slowly to removal of corticosterone in the absence of concurrent stress. *Endocrinology.* **124**: 2144-2152 (1989).

**Jacobson L, Sapolsky RM.** The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.* **12**: 118-134 (1991).

**Jingami H, Matsukura S, Numa S, Imura H.** Effects of adrenalectomy and dexamethasone administration on the level of prepro-corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid

(mRNA) in the hypothalamus and adrenocorticotropin-beta-lipotropin precursor mRNA in the pituitary rats. *Endocrinology*. **117**: 1314-1320 (1985).

**Jones M, Brush F, Neame R.** Characteristics of fast feedback control of corticotropin release by corticosteroids. *J. Endocrinol.* **55**: 489-494 (1972).

**Jorgensen H, Knigge D, Kjaer A, Vadsholt T, Warberg J.** Serotonergic involvement in stress-induced ACTH release. *Brain Res.* **811**: 10-20 (1998).

**Juaneda C, Dubourg P, Ciofi P, Corio M, Tramu G.** Ultrastructural colocalisation of vesicular cholecystokinin and corticoliberin in the periportal nerve terminals of the rat median Eminence. *J Neuroendocrinol.* **11**: 203-209 (1999a).

**Juaneda C, Lafon-Dubourg P, Ciofi P, Cournil I, Corio M, Tramu G.** Immune challenge-stimulated hypophysiotropic CRH mRNA expression is associated with an induction of neurotensin (NT) mRNAs without alteration of vasopressin (VP) mRNAs. *Neuroscience.* **93**: 393-400 (1999b).

**Juaneda C, Lafon-Dubourg P, Ciofi P, Sarrieau A, Wenger T, Tramu G, Corio M.** CCK mRNA expression in neuroendocrine CRH neurons is increased in rats subjected to an immune challenge. *Brain Res.* **901**: 277-280 (2001).

**Kageyama K, Tozawa F, Horiba N, Watanobe H, Suda T.** Serotonin stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of conscious rats. *Neurosci. lett.* **243**: 17-20 (1998).

**Karalis K, Muglia LJ, Bae D, Hilderbrand H, Majzoub JA.** CRH and the immune system. *J Immun.* **72** : 131-136 (1997).

**Kawano H., Shigeo D.** Somatostatin-containing neuron systems in the rat hypothalamus : retro grade tracing and immunohistochemical studies. *J. Comp. Neurol.* **271**: 293-299 (1988).

**Kawano H., Daikoku S.** Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* **265**: 242-253 (1987).

**Kawano H, Tsuruo Y, Bando H, Daikoku S.** Hypophysiotrophic TRH producing neurons identified by combining immunohistochemistry for Pro- TRH and retro grade tracing. *J. Comp. Neurol.* **307**: 531-538 (1991).

**Keller-Wood ME, Dallman MF.** Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.* **5**: 1-24 (1984).

**Kikusui T, TaKeuchi Y, Mori Y.** Immunohistochemical localization of corticotropin-releasing factor, [arginine<sup>8</sup>]-vasopressin and oxytocin neurons in the goat hypothalamus. *J Vet Med Sci.* **8**: 621-8 (1997).

**Kirmiz JP.** Jerboa as a desert species, Adaptation to desert environment. A study of jeroa, rat and man. *London: Butterworths.* 14-31 (1962).

**Kiss A, Aguilera G.** Participation of a  $\alpha$ 1-adrenergic receptors in the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing hormone during stress. *Neuroendocrinology.* **56**, 153-160 (1992).

**Kiss JZ, Mezey E, Skirboll L.** Corticotropin-releasing factor immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus become vasopressin-positive after adrenalectomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 1854-1858 (1984).

**Kiss JZ, Palkovits WI.** Distribution and projection of cholecystokinin-immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *J Comp Neurol.* **227**: 173-181 (1984).

**Kiss IZ, Martos J, Palkovits M.** Hypothalamic paraventricular nucleus: a quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivisions in the rat. *J. Comp. Neurol.* **313**: 563-573 (1991).

**Knigge KM.** Adrenocortical response to stress in rats with lesions in hippocampus and amygdala. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **108**: 67-69 (1961).

**Koenig JI, Snow K, Clark BD, Toni R, Canon JC, Shaw AR, Dinarello CA, Reichlin S, Lee S, Lechan RM.** Intrinsic pituitary interleukin-1b is induced by bacterial lipopolysaccharide. *Endocrinology.* **126**: 3053-3058 (1990).

**Kovacs KJ, Mezey E.** Dexamethasone inhibits corticotropin-releasing factor gene expression in the rat paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* **46**: 365-368 (1987).

**Krieg WJS.** The hypothalamus of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* **55**: 1989 (1932).

**Krieger DT.** Circadian pituitary adrenal rhythms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **54**: 169-189 (1975).

**Krieger DT.** Regulation of circadian periodicity of plasma ACTH levels. *Ann NY Acad. Sci.* **297**: 561-567 (1977).

**Krieger DT, Hauser H.** Comparison of synchronization of circadian corticosteroid rhythms by photoperiod and food. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 1577-1588 (1978).

**Kubo T, Amano H, Maso Y.** Caudal ventrolateral medulla: A region responsible for the mediation of vasopressin-induced pressor responses. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **328**: 368-372 (1985).

**Kubo T, Maso Y.** Vasopressin-induced pressor responses following microinjection of kainic acid into tractus solitarius of the rat. *Jpn. J. Pharmacol.* **36**: 118-120 (1984).

**Kulkarni S.K., Ninan I., and George B.** *Drugs Today.* **32**: 275-285 (1996).

**Kwak SP, Morano MI, Young EA, Watson SJ, Akil H.** Diurnal CRH mRNA rhythm in the hypothalamus: decreased expression in the evening is not dependent on endogenous glucocorticoids. *Neuroendocrinology.* **57**:96-105 (1993).

**Kwak SP, Young EA, Morano L, Watson SJ, Akil H.** Diurnal corticotropin-releasing hormone mRNA variation in the hypothalamus exhibits a rhythm distinct from that of plasma corticosterone. *Neuroendocrinology*. **55**: 74-83 (1992).

**Laflamme N, Bovetto S, Richard D, Rivest S.** Effect of dexfenfluramine on the transcriptional activation of CRF and its type 1 receptor within the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Br. J. Pharmacol.* **117**: 1021-1034 (1996).

**Lakhdar-Ghazal N, Dubois-Dauphin M, Hermes ML, Buijs RM, Benjelloun WA, Pevet P.** Vasopressin in the brain of a desert hibernator, the jerboa (*Jaculus orientalis*): presence of sexual dimorphism and seasonal variation. *J Comp Neurol* **358**: 499-517(1995).

**Larsen PJ.** Neonatal monosodium glutamate treatment alters both the activity and the sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J. Endocrinol.* **141**: 497-503 (1994).

**Lechan RM, Nestier JL, Jacobson S.** The tuberoinfundibular system of the rat as demonstrated by immunohistochemical localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin (WGA) from the median eminence. *Brain Res.* **245**: 1-15 (1982).

**Léranth C, Antoni, FA, Palkovits M.** Ultrastructural demonstration of ovine CRF-like immunoreactivity (o-CRF-LI) in the rat hypothalamus: processes of magnocellular neurons establish membran specializations with parvocellular neurons containing CRF-LI *Regulat. Peptides.* **6**:179-188 (1983).

**Li HY, Ericsson A, Sawchenko PE.** Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 2359-2364 (1996).

**Lightman SL, Young WS.** Changes in hypothalamic preproenkephalin A mRNA following stress and opiate withdrawal. *Nature.* **328**: 643-645 (1987).

**Liposits Z, Gôrcs T, Sétalo G, Lengvari I, Flerko B, Vigh S, Schally AV.** Ultrastructural characteristics of immunolabelled corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the rat brain. *Cell Tissue Res.* **229**: 191-196 (1983).

**Liposits Z, Paull WK, Sétalo G, Vigh S.** Evidence for local corticotropin releasing factor (CRF)-immunoreactive neuronal circuits in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Histochemistry.* **83**: 5-16 (1985).

**Mac Ewen BS, De Kloet ER, Rostène W.** Adrenal steroid receptors and action in the nervous system. *Physiol. Rev.* **66**: 1121-1188 (1986).

**Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW.** Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology.* **136**:4517-4526 (1995).

**Menetrey D, Basbaum AI.** Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: A possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation. *J Comp. Neurol.* **255**: 439-450 (1987).

**Mezey E, Kiss J, Skirboll L, Goldstein M, Axelrod J.** Increase of corticotropin-releasing factor staining in rat paraventricular nucleus neurons by depletion of hypothalamic adrenaline. *Nature.* **310**: 140-142 (1984).

**Mezey E, Reisine TO, Skirboll L, Beinfeld M, Kiss JZ.** Cholecystokinin in the medial parvocellular subdivision of the paraventricular nucleus. Coexistence with corticotropin-releasing hormone. *Ann NY Acad Sci.* **448** : 152-156 (1985).

**Moga MM, Saper CB, Gray TS.** Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp. Neurol.* **283**: 315-332 (1989).

**Nakagawa R, Masatoshi T, Kohno Y, Ida Y, Imori K., Nagasaki N.** Glucocorticoids attenuate increases in rat brain noradrenaline turnover induced by intense stress. *Kurume Med. J.* **30**: 45-50 (1983).

**Norström A, Hansson HA, Sjöstrand J.** Effects of colchicine on axonal transport and ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Z.Zelforsch.* **113** : 271-293 (1971).

**Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS.** Stress-induced norepinephrine release in the paraventricular nucleus of rats with brainstem hemisections: a microdialysis study. *Neuroendocrinology.* **58**: 196-201 (1993).

**Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Matem P, Hart C, Kopin IJ, Goldstein DS.** Catecholaminergic inhibition by hypercortisolemia in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Endocrinology.* **136**: 4814-4819 (1995).

**Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Yadid G, Kopin IJ, Goldstein DS.** Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamus paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann. Nf. Acad. Sci.* pp115-129 (1992).

**Palkovits M, Zaborszky L.** Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarius: Afferent and efferent connections in relation to the baroreceptor reflex arc. In W. De Jong, A.P. Provoost, and A. P. Shapiro (eds): hypertension and brain mechanisms. Amsterdam: *Elsevier.* , pp. 9-34 (1977).

**Paulmyer-Lacroix O, Guillaume V, Anglade G, Grino M, Oliver C.** Régulation de la fonction corticotrope dans les situations de stress. *Ann Endocrinol.* **56**: 245-251 (1995).

**Paxinos G, Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. *San Diego CA* (Academic Press). (1986).

**Perwee RG.** In *Canabinoid Receptors* (Pertwee R.G., Ed.), Academic Press, *London/San Diego.* pp: 1-34 (1995).



Pharmacological evidence that the inhibition of diurnal adrenocorticotropin secretion via type 1 corticosterone-preferring receptors. *Endocrinology*. **124**: 2944-2950 (1989).

**Pirnik Z et KiSS A.** Fos expression variances in mouse hypothalamus upon physical and osmotic stimuli: co-staining with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Brain Res Bull*. **5**: 423-31 (2005).

**Pirnik Z, Mravec B, Kiss A.** Fos protein expression in mouse hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei upon osmotic stimulus: colocalization with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Neurochemi Int*. **5**: 597-607 (2004).

**Plotsky P.** Regulation of hypophysiotropic factors mediating ACTH secretion. In: Ganong W, Dallman M, Roberts J (eds) The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Revisited. *New York*. **512**: 205-215 (1987).

**Plotsky PM, Cunningham ET, Widamair EP.** Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endo.Rev*. **10**: 437-457 (1989).

**Plotsky PM, Sawchenko PE.** Hypophysial-portal plasma levels, median eminence content, and immunohistochemical staining of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and oxytocin after pharmacological adrenalectomy. *Endocrinology*. **120**: 1361-1369 (1987).

**Porter JR, Sander LD.** The effect of cholecystokinin octapeptide on pituitary-adrenal hormone secretion. *Regul. Pept*. **2**: 245-252 (1981).

**Pretel S, Piekut D.** Coexistence of corticotropin-releasing factor and enkephalin in the paraventricular nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol*. **294**: 192-201 (1990).

**Puder M, Weidenfeld J, Chowers I, Nir J, Conforti N, and Siegel RA.** Corticotrophin and corticosterone secretion following delta 1-Tetrahydrocannabinol, in intact and in hypothalamic deafferentated male rats. *Exp. Brain Res*. **46**: 85-8 (1982).

**Raji A, Nordmann JJ.** Synthesis, turnover, and release of peptides from the neurohypophysis of the Jerboa (*Jaculus orientalis*). *Gen Comp Endocrinol.* **93**: 345-56 (1994).

**Raji A, Nordmann JJ.** Stimulus-secretion coupling in the neurohypophysis of the jerboa (*jaculus orientalis*). *J. Exp. Biol.* **195**: 19-34 (1994).

**Ratka A, Sutano W, Bloemers M, De Kloet ER.** On the role of brain mineralocorticoid (typeI) and glucocorticoid (typeII) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology.* **50**: 117-123 (1989).

**Reis DJ.** The C1 area of rostral ventrolateral medulla: Role in tonic and reflex regulation of arterial pressure. In A. Magro, W, Osswald, D. Reis, and P.Vanhoutte. (eds): Central and peripheral mechanisms of cardiovascular regulation. *New York: Plenum.* pp. 487-502 (1986).

**Reisine T, Jensen R.** Cholecystokinin-8 stimulates adrenocorticotropin release from anterior pituitary cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **236**: 621-627 (1985).

**Rho JH, Swanson LW.** A morphometric analysis of functionally defined subpopulations of neurons in the paraventricular nucleus of the rat with observations of the effects of colchicine. *J. Neurosci.* **9**: 1375-1388 (1989).

**Rodriguez AB, Marchena JM, Harvery S, Barriga C, Pariente JA, Lea RW.** Effect of immobilization stress on the circadian rhythm of melatonin and corticosterone in ring dove. *J Physiol.* **528** : pp.71 (2000).

**Rossol S, Voth R, Laubenstein H, Müller W, Scroder H.** Interferon production in patients infected with HIV -1. *J. Infect. Dis.* **150**: 815-821 (1989).

**Ruggiero DA.** Anatomical susstrates of cholinergic-autonomic regulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* **292**: 1-53 (1990).

**Ruhmann-Wennhold A, Nelson DH.** Plasma ACTH levels in stressed and nonstressed adrenalectomized rats. *Ann. NY. Aead. Sci.* **297**: 498-508 (1977).

**Russel S, Dhariwal A, McCann S, Yates F.** Inhibition by dexamethasone of the in vitro pituitary response to corticotropin-releasing factor. *Endocrinology*. **85**:512-516 (1969).

**Saboureau M, Bobet J.P, Boissin J.** Cyclic activity of adrenal function and seasonal variations of cortisol peripheral metabolism in a hibernating mammal, the hedgehog (*Erinaceus europaeus* L.). *J Physiol*. **76** : 617-29 (1980).

**Sapolsky RM, Ammanini M, Packan D, Sutton S, Plotsky P.** Glucocorticoid feedback inhibition of adrenocorticotropin hormone secretagogue release : relationship to corticosteroid receptor occupancy at various limbic sites. *Neuroendocrinology*. **51**, 328-336 (1990).

**Sapolsky RM, Armanini MP, Sutton SW, Plotsky PM.** Elevation of hypophysial portal concentrations of adrenocorticotropin secretagogues after fornix transection. *Endocrinology*. **125**: 2881-2887 (1989).

**Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS.** Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**:6174-6177 (1984).

**Sawchenko PE.** Evidence for a local site of action for glucocorticoids in inhibiting CRF and vasopressin expression in the paraventricular nucleus. *Brain Res*. **403**: 213-224 (1987a).

**Sawchenko PE.** Adrenalectomy-induced enhancement of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons: anatomic, peptide, and steroid specificity. *J Neurosci* 1987. **7**: 1093–1106 (1987b).

**Sawchenko PE.** Effects of catecholamine-depleting medullary knife cuts on corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in the hypothalamus of normal and steroid-manipulated rats. *Neuroendocrinology*. **48**: 459-470 (1988).

**Sawchenko PE.** Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus. *Brain Res*. **437**: 253-263 (1987c).

**Sawchenko PE, Swanson LW.** Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* **205**: 260-272 (1982).

**Sawchenko PE, Swanson LW, Vale WW.** Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J Neurosci.* **4**: 118–1129(1984a).

**Sawchenko PE, Swanson LW, Yale WW.** Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 1883-1887 (1984b).

**Scapagnini U, Loon GV, Moberg G, Preziosi P, Ganong W.** Evidence for central norepinephrine-mediated inhibition of ACTH secretion by a central noradrenergic system in the dog. *Neuroendocrinology.* **10**: 155-158 (1972).

**Schacter B, Johnson L, Baxter J, Roberts I.** Differential regulation by glucocorticoids of proopiomelanocortin mRNA levels in the anterior and intermediate lobes of the rat pituitary. *Endocrinology.* **110**: 1142-1148 (1982).

**Schëbitz B, Hoisboer F, Carey MP, Sutanto W, De Kloet ER.** Decreased affinity of hippocampal mineralocorticoid (type 1) receptor parallels elevated corticosterone during immune stress. *Neuroendocrinology.* **44**: 397-432 (1994).

**Schwartz J, Billestrup N, Perrin M, Rivier J, Yale W.** Identification of corticotropin releasing factor target cells and effects of dexamethasone on binding in anterior pituitary using a fluorescent analog of CRF. *Endocrinology.* **119**: 2376-2381 (1986).

**Shivatcheva TM, Ankov VK, Hadjioloff AI.** Circannual fluctuations of the serum cortisol in the European ground squirrel, *Citellus citellus* L. *Comp Biochem Physiol A* **90** : 515-518 (1988).

**Somogyi T, Takagi I.** A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience*. **7**: 1779-1784 (1982).

**Spinedi E, NegroVillar A.** Serotonin and adrenocorticotropin release : direct effects at the anterior pituitary level and potentiation of arginine vasopressin-induced ACTH release. *Endocrinology*. **112**: 1217-1223 (1983).

**Suemaru S.** Ventromedial hypothalamic lesions inhibit corticosteroid feedback regulation of basal ACTH during the trough of the circadian rhythm. *Neuroendocrinology*. **61**: 453-463 (1995).

**Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Yale W.** Organisation of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. **36**: 165-186 (1983).

**Swanson LW, Kuypers HG.** The paraventricular nucleus of hypothalamus: cytoarchitecture subdivisions and the organization of projections the pituitary, dorsal vagal complex and spinal cord as demonstrated by fluorescence double-labeling method 1. *Comp. Neurol*. **194**: 555-570 (1980).

**Swanson LW, Sawchenko PE, Bérød A, Hartman BK, Helle KB, Orden DEV.** An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol*. **196**: 271-285 (1981).

**Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW.** Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons. Implications for the stress response. *Prog Brain Res*. **68** : 169-190 (1986).

**Swanson LW, Simmons DM.** Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J comp Neurol*. **285**: 413–435 (1989).

**Szafarczyk A, Alonso G, Ixart G, Malaval F, Assenmacher I.** Diurnalstimulated and stress-induced ACTH release in rat is mediated by ventral noradrenergic bundle. *Am. J. Physiol.* **249**: 219-226 (1985).

**Szafarczyk A, Malaval F, Laurent A, Gibaud R, Assenmacher I.** Further evidence for a central stimulatory action of catecholamines on adrenocorticotropin release in the rat. *Endocrinology.* **121**: 883-887 (1987).

**Takao T, Hashimoto K, Ota Z.** Central catecholaminergic control of ACTH secretion. *Regul. Peptides.* **21**: 301-308 (1988).

**Tilders FJ, Schmidt ED, Goeij DCED.** Phenotypic plasticity of CRF neurons during stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **697**: 39-52 (1993).

**Tramu G, Beauvillain JC, Croix D, Pillez A, Garaud JC.** Immunohistochemical arguments in favor of co-localization of neuropeptides in hypothalamo-infundibular neuron systems. *Ann Endocrinol (Paris) Review. French.* **45**: 175-87. (1984).

**Tramu G, Croix D, Pillez A.** Ability of the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus to produce a vasopressin-like material. Immunohistochemical demonstration in adrenalectomized guinea pigs and rats. *Neuroendocrinology.* **37**: 467-469 (1983).

**Tramu G, Pillez A, Leonardelli J.** An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous location of two antigens by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem.***26**: 322-324 (1978).

**Turkelson C, Thomas C, Arimura D, Chang J, Chang D, Shimizu M.** In vitro potentiation of the activity of synthetic ovine corticotropin-releasing factor by arginine vasopressin. *Peptides.* **3**: 111-113 (1982).

**Uht RM.** Demonstration of glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in glucocorticoid-sensitive vasopressin and corticotropin-releasing factor neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neurosci. Res.* **19**: 405-411 (1988).

**Vale W, Vaughan J, Yamamoto G, Bruhn T, Douglas C, Rivier J, Rivier C.** Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. *Endocrinology*. **113**: 1121-1131 (1983).

**Van den Pol AN.** The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat : intrinsic organization. *J. Comp. Neurol.* **206**: 317-345 (1982).

**Van den Pol AN.** Ionotropic glutamate-receptor gene expression in hypothalamus: localization of AMP A, kainate, and NMDA receptor RNA with in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.* **343**: 428-444 (1994).

**Vanderhaeghen JJ, Lostra F, Vandesande F, Mey J, Gilles C.** Oxytocine et gastrine dans les mêmes cellules magnocellulaires hypothalamohypophysaires. *Acta Neurol Belg.* **80**: 25 (1980).

**Vanderhaeghen JJ, Lotstra F, Vandesande F, Dierickx K.** Coexistence of cholecystokinin and oxytocin-neurophysin in some magnocellular hypothalamohypophysial neurons. *Cell Tissue Res.* **221**: 227-231 (1981).

**Vetruigno GC, Lachuer J, Perego C, Miranda E, Simoni G, Tappaz M.** Lack of glucocorticoids sustains the stress-induced release of noradrenaline in the anterior hypothalamus. *Neuroendocrinology.* **57**: 835-842 (1993).

**Viau V, Meaney MJ.** (1991) Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology.* **129**: 2503-2511 (1991).

**Villar MJ, Meister B, Cortés R, Schalling M, Morris M, Hokfelt T.** Neuropeptide gene expression in hypothalamic magnocellular neurons of normal and hypophysectomical rats: a combined immunohistochemical study. *Neurosci.* **36**: 181-199 (1990).

**Villar MJ, Meister B, Hokfelt T.** Reorganization of neural peptidergic systems in the median eminence after hypophysectomy. *J Neurosci.* **10**: 5996-6012 (1994).

**Ward DG, Lefcourt AM, Gann DS.** Neurons in the dorsal rostral pons process information about changes in venous return and in arterial pressure. *Brain Res.* **181**: 75-88 (1980).

**Watts AG.** Osmotic stimulation differentially affects cellular levels of corticotropin-releasing hormone and neurotensin/neuromedin N mRNAs in the lateral hypothalamic area and central nucleus of the amygdala. *Brain Res.* **581**: 208-216 (1992a).

**Watts AG.** Disturbance of fluid homeostasis leads to temporally and anatomically distinct responses in neuropeptide and tyrosine hydroxylase mRNA levels in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neurosci.* **46**: 859-879 (1992b).

**Watts AG.** Ether anesthesia differentially affects the -content of preprocorticotropin-releasing hormone, prepro-neurotensin/neuromedin N and preproenkephalin mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res.* **544**: 353-357 (1991).

**Watts AG, Sanchez-Watts G.** Physiological regulation of peptide messenger RNA colocalization in rat hypothalamic paraventricular medial parvicellular neurons. *J. Comp. Neurol.* **352** :501-514 (1995b).

**Watts AG, Sanchez-Watts G.** A cell-specific role for the adrenal gland in regulating CRH mRNA levels in the rat hypothalamic neurosecretory neurons after cellular dehydration. *Brain Res.* **687**: 63-70 (1995a).

**Weidenfeld J, Feldman S, Mechoulam R.** Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology.* **59**: 110-2 (1994).

**Weiner R, Ganong W.** Role of brain mono amines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol Rev.* **58**: 905-910 (1978).

**Wenger T, Jamali KA, Juaneda C, Leonardelli J, Tramu G.** Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* **237**: 724-8 (1997).



**Whitnall MH.** Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol.* **40**: 573-629 (1993).

**Whitnall MH, Smyth D, Gainer H.** Vasopressin coexists in half of the corticotropin-releasing factor axons present in the external zone of the median eminence in normal rats. *Neuroendocrinology.* **45**: 420-424 (1987).

**Widamair EP, Dallman MF.** The effects of corticotropin-releasing factor on adrenocorticotropin secretion from perfused pituitaries in vitro: Rapid inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology.* **115**: 2368-2374 (1984).

**Wiegand SJ, Priebe JL.** The cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. *J.Comp. Neurol.* **192**: 1-19 (1980).

**Wilson MM, Greer SE, Greer MA, Roberts L.** Hippocampal inhibition of pituitary-adrenocortical function in female rats. *Brain Res.* **197**: 433-441 (1980).

**Wong YN, Cassano WJ, D'mello AP.** Acute-stress-induced facilitation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neuroendocrinology.* **6**: 345-365 (2000).

**Xin-Ming Ma, Andrew Levy, Stafford L, Lightman.** Emergence of an isolated arginine vasopressin (AVP) response to stress after repeated restraint : A study of both AVP and corticotropin-releasing hormone Messenger ribonucleic acid (RNA) and heteronuclear RNA. *Endocrinology.* P. 4351-4357 (1997).

**Young W, Mezey E, Siegal R.** Quantitative in situ hybridization reveals increased levels of corticotropin-releasing hormone mRNA after adrenalectomy. *Neurosci. Lett.* **70**:198-203 (1986).

**Zaborszky L.** Afferent Connections of the Medial Basal Hypothalamus. *New York: Springer-Verlag.* (1982).

**Zimmerman EA, Stillman MA, Recht LD, Antunes JL, Carmel PW, Goldsmith PC.** Vasopressin and corticotropin-releasing factor; an axonal pathway to portal capillaries in the zona externa of the median eminence containing vasopressin and its interaction with adrenal corticoids. *An NY Acad. Sci.* **297**: 405-419 (1977).

**Zubiega A, Munoz E, Huber B.** IL-4 and IL-2 selectively rescue T<sub>H</sub> cell subsets from glucocorticoid induced apoptosis. *J Immunol.* **149**: 107-112 (1992).

# **RESUME**

**Plasticité phénotypique des neurones du noyau paraventriculaire parvicellulaire hypothalamique liée au stress d'immobilisation : Approche morphofonctionnelle chez la gerboise**

**RESUME**

La réponse hypothalamique à une situation environnementale stressante implique non seulement le système neuroendocrine à CRH (corticotropin releasing hormone) du noyau paraventriculaire parvicellulaire (NPV) mais aussi d'autres neuropeptides dits accessoires comme la vasopressine (AVP), la cholécystokinine (CCK) et la neurotensine, coexprimés dans les neurones à CRH du même système et contrôlant l'activité de l'axe corticotrope. C'est ce concept de plasticité des systèmes neuroendocrines hypothalamiques liée au stress qu'on évalue sur un modèle animal très intéressant pour ce genre d'études, la gerboise en captivité. Le présent travail concerne l'étude de l'impact d'une forme de stress neurogénique, l'immobilisation, sur l'expression des neuropeptides : la CRH, l'AVP, la CCK et l'ocytocine (OXY). L'expression de ces neuropeptides dans le NPV hypothalamique a été étudiée par immunohistochimie chez la gerboise soumise à un stress aigu d'immobilisation de 30 minutes. Les résultats morphofonctionnels obtenus montrent que le stress d'immobilisation, chez la gerboise comme chez le rat, retentit positivement sur le nombre de neurones à CRH et à CCK au sein de ce noyau. Ils montrent aussi que contrairement au rat, la CCK n'est pas coexprimée dans les neurones à CRH aussi bien chez l'animal contrôle que stressé. Les systèmes neuronaux à AVP et à OXY ont par ailleurs été étudiés dans le même contexte expérimental. Les données montrent que, contrairement à la CRH et la CCK, les densités neuronales à AVP et à OXY ne fluctuent pas suite au stress aigu d'immobilisation, tel est le cas d'un stress immun chez le rat. Cependant, d'autres travaux indiquent qu'un stress aigu d'immobilisation d'une durée de 2 heures provoque une augmentation significative de l'expression génique de l'AVP parvicellulaire chez le rat. Ces données suggèrent que la durée du stimulus pourrait jouer un rôle critique dans le contrôle de la plasticité neuronale phénotypique au sein du NPV. Elles suggèrent aussi que les mécanismes de régulation de la réponse au stress impliquant l'OXY, l'AVP, la CCK et la CRH seraient différents chez la gerboise comparativement au rat.

Dans le cadre d'étude de la plasticité phénotypique des neurones parvicellulaires du NPV, les coexpressions intraneuronales AVP/CRH et AVP/CCK démontrées par double immunohistochimie se montrent également insensibles au stress aigu d'immobilisation. Les neurones parvicellulaires à OXY coexpriment aussi la CRH ou la CCK aussi bien chez les gerboises contrôles et que chez les stressées. Cette coexpression est aussi indépendante du stress. La présence de colocalisations AVP/CRH, AVP/CCK et OXY/CRH, OXY/CCK et l'absence d'une colocalisation CCK/CRH chez les gerboises contrôles et stressées démontrent la présence d'au moins deux populations neuronales à AVP et deux populations neuronales à OXY dans la partie parvicellulaire du NPV chez la gerboise.

Ces données argumentent l'existence de plusieurs groupes de neurones phénotypiquement distincts dans la partie parvicellulaire du NPV, chacun étant caractérisé par sa capacité à régler l'expression du neuropeptide qui serait fonction du type de stresser et aussi de l'espèce. Elles renforceraient par ailleurs l'idée d'une variation interspécifique dans les mécanismes physiologiques adaptatifs aux conditions environnementales.

**MOTS CLES :** corticotropin-releasing-hormone, cholécystokinine, vasopressine, ocytocine, hypothalamus, stress d'immobilisation, gerboise, immunohistochimie.

# **ABSTRACT**

## **Phenotypic plasticity of the parvicellular neurones of the hypothalamic paraventricular nucleus related to immobilization stress : morphofunctional study in jerboa**

### **ABSTRACT**

The hypothalamic response to an environmental stress implies the corticotropin releasing hormone (CRH) neuroendocrine system of the hypothalamic parvicellular paraventricular nucleus (PVN) as well as other accessory neuropeptides such as vasopressin (AVP), cholecystokinin (CCK) and neurotensin coexpressed within CRH neurons and controlling the corticotrope axis activity as well. This concept of plasticity of hypothalamic neuroendocrine systems related to stress was evaluated in the jerboa in captivity, an interesting model to study neuroendocrine regulations related to the environment factors.

The present work was aimed to study the impact of neurogenic stress, immobilization, on the expression of the neuropeptides CRH, AVP, CCK and oxytocin (OXY). Those expressions were explored within the hypothalamic PVN by immunocytochemistry either in control or in 30 min immobilization stress submitted jerboas.

The morphofunctional results show that the immobilization stress, in jerboa as well as rat, up-regulates CRH and CCK neuronal densities in this nucleus. They also show that, unlike rat, CCK is not coexpressed within CRH neurons in control as well as stressed jerboa.

Furthermore, the AVP and OXY neuronal systems were studied in the same experimental context. The data show that, contrary to CRH and CCK, no significant change concerns the number of VP-and OXY-immunoreactive neurons following a 30 min immobilization, as it is the case for an immune stress in rat. However, others studies indicate that 2 hours immobilization stress provokes an AVP gene expression increase within PVN in rat. These data suggest that the stimulus duration may ply a critical role in the control of the PVN phenotypic neuronal plasticity. They also underline that the neuroendocrine mechanisms of the stress response involving OXY, AVP, CCK and CRH might vary from one mammal species to another.

To more study the phenotypic plasticity of the PVN parvicellular neurones, the AVP/CRH and AVP/CCK intraneuronal coexpressions demonstrated by double immunohistochemistry did not depend upon acute immobilization stress. The OXY parvicellular neurons also coexpress CRH or CCK. Such coexpression also did not depend upon acute immobilization stress. The occurrence of AVP/CRH, AVP/CCK and OXY/CRH, OXY/CCK colocalisations and the absence of CCK/CRH colocalisation in control and stressed jerboas showed the occurrence of at least two VP and two OXY neuronal populations within the jerboa PVN.

These data argue the occurrence of several phenotypically different neurones groups within PVN, each one characterized by its capacity to regulate the neuropeptide expression which would be function of the stressor and also of the species. They also underline that adaptative physiological mechanisms to environmental conditions might vary from one mammal species to another.

**KEY WORDS :** corticotropin releasing hormone, cholecystokinin, vasopressin, oxytocin hypothalamus, immobilization stress, jerboa, immunohistochemistry.