



HAL
open science

Contrôle noradrénergique de la plasticité neurochimique et structurale dans le noyau supra-optique de l'hypothalamus chez la souris

Nasren Maalood

► **To cite this version:**

Nasren Maalood. Contrôle noradrénergique de la plasticité neurochimique et structurale dans le noyau supra-optique de l'hypothalamus chez la souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT: . tel-00167335v1

HAL Id: tel-00167335

<https://theses.hal.science/tel-00167335v1>

Submitted on 19 Aug 2007 (v1), last revised 30 Apr 2008 (v3)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie Paris
VI**

Spécialité Neurosciences

**Présentée par
Nasren Maolood**

Pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI

**Contrôle noradrénergique de la plasticité
neurochimique et structurale dans le noyau supra-
optique de l'hypothalamus chez la souris**

Soutenue le 15 mai 2007

Devant le jury composé de

Yves Tillet	Directeur de Recherche, INRA-UMR 6175	Rapporteur
Olivier Bosler	Directeur de Recherche, CNRS-UMR 6544	Rapporteur
Alvaro Rendon	Directeur de Recherche, INSERM U-592	Examineur
Didier Orsal	Professeur, Université Paris VI	Examineur
Marie-Christine Miquel	Maître de conférences, Université Paris VI	Examineur
Helene Hardin-Pouzet	Professeur, Université Paris VI	Directeur de thèse

Je remercie chaleureusement M. le Professeur André Calas, directeur du laboratoire de Neurobiologie des Signaux Intercellulaire (UMR 7101) d'avoir bien voulu m'accueillir au sein de son laboratoire. Je tiens également à remercier M. le Professeur Didier Orsal qui a succédé à M. Calas et je le remercie vivement de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. J'adresse mes remerciements les plus respectueux :

A Monsieur le Docteur Yves Tillet et Monsieur le Docteur Olivier Bosler pour avoir accepté sans hésiter d'être rapporteurs de cette thèse et d'y consacrer de leur temps. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon profond respect et de ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Alvaro Randon et à Madame le Docteur Marie-christine Miquel qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse et pour leur encouragement et leur gentillesse qui ont été sans limite.

Je tiens à remercier très vivement le Professeur Hélène Hardin-Pouzet pour avoir encadré mon travail. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance pour ses conseils, son soutien, sa gentillesse, ses encouragements, et son amitié, ainsi qu'au Docteur Valérie Messent. Je les remercie de la liberté qu'elles m'ont laissée et qui m'a permis d'acquérir une autonomie de travail qui me sera utile pour le futur.

Je remercie très chaleureusement tous les membres de mon équipe : Caroline, Danielle, Fransceska, Roza et Johann, pour leur soutien quotidien, leurs discussions réconfortantes et leur amitié.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'UMR 7101 pour leur sympathie et leurs encouragements.

Enfin, j'adresse mes plus vifs remerciements à ma famille en particulier mon frère et ami Luai. Je dédie ce travail à mes parents, mes sœurs et frères pour leur soutien, leur écoute et leurs encouragements.

Sommaire

Avant-propos

Introduction

1

Le système hypothalamo-neurohypophysaire

2

II. Les noyaux supra optiques

2

II. Les noyaux paraventriculaires

3

III. Les afférences et efférences des NSO et NPV

3

1. Afférences catécholaminergiques

3

2. Afférences sérotoninergiques

4

3. Afférences aminoacidergiques

4

4. Autres voies afférentes

4

5. Efférences

5

IV. Biologie cellulaire des neurones endocrine

5

Les neuropeptides du système hypothalamo-neurohypophysaire

8

I. L'arginine vasopressine (AVP)

8

1. Structure et biosynthèse de l'AVP

8

2. Les différents statuts de médiateurs de l'AVP

9

3. Récepteurs et rôles biologiques de l'AVP

9

3.1. Récepteurs

9

a) le récepteur

9

b) le récepteur V1b

10

c) le récepteur V2

10

3.2. Implications physiologiques

10

a) l'équilibre hydrominéral

10

b) la vasoconstriction

11

c) la régulation corticotrope

11

d) autres implications

11

4. Facteurs de régulation de la synthèse et de la sécrétion d'AVP

12

4.1. La stimulation osmotique

12

4.2. Les monoamines

12

4.3. Autres facteurs de régulation

14

II. L'ocytocine (OT)

15

1. Nature et structure

15

2. Biosynthèse et sécrétion

15

3. Récepteur et rôles biologiques

16

3.1. Récepteurs

16

3.2. Rôles physiologiques

16

a) la reproduction

16

b) l'équilibre hydrominéral

17

c) autres implications

17

4. Régulation physiologique de la synthèse et de la sécrétion de l'OT

18

Sommaire

4.1. La reproduction	18
4.2. La stimulation osmotique	19
4.3. Les monoamines	19
<i>a) la noradrénaline</i>	19
<i>b) la sérotonine</i>	20
4.4. Autres facteurs	20
III. Neuropeptides et protéines co-localisées	21
La plasticité neurochimique et structurale du système hypothalamo-neurohypophysaire	22
I. La plasticité neurochimique	22
II. La plasticité structurale	23
1. Plasticité neuronale	23
2. Plasticité gliale	24
III. Contrôle noradrénergique de la plasticité neuroendocrine	25
1. Voie glutamatergique de l'innervation noradrénergique	26
2. Voie GABAergique de l'innervation noradrénergique	27
3. Implication du monoxyde d'azote (NO)	27
Le monoxyde d'azote	28
I. Le monoxyde d'azote (NO) : synthèse et mécanisme d'action	28
II. Rôle biologiques de NO	29
III. Implication du NO dans la biologie cellulaire des noyaux magnocellulaires	30
La matrice extracellulaire et les métalloprotéinases	31
I. Structure et régulation de l'activité des MMPs	32
II. Fonction des MMPs	33
III. Les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMP)	34
IV. Les MMPs dans le système SNC intact et lésé	34
But du travail et modèle	36
I. But de travail	37
II. Modèles et techniques utilisés	38
1. Modèle expérimental	38
2. Techniques	39
2.1. Immunohistochimie	39
2.2. Dosage immunoenzymatique (EIA)	39
2.3. Histochimie de la NADPH-diaphorase	40
2.4. Zymographie in situ	40

Sommaire

<u>Résultats</u>	41
Article 1	42
Article 2	44
<u>Discussion</u>	46
I. Régulation de l'expression de l'AVP et de l'OT par la NA dans le NSO	47
II. Implication du NO dans la chaîne de transduction du signal de la NA dans le NSO	49
1. Effet de la NA sur l'expression de nNOS et iNOS dans le NSO	49
2. Identification des cellules exprimant la nNOS et la iNOS dans le NSO	50
3. Le NO participe à la chaîne de transduction du signal dans la régulation de l'expression d'AVP mais pas dans celle d'OT par la NA	51
4. L'effet du NO est indépendant du GMPc dans le voie de régulation de l'AVP par la NA	52
5. Le NO impliqué dans la voie de signalisation de la NA dans la régulation d'AVP provient de l'activité de la nNOS et de la iNOS	54
III. Modification de la matrice extracellulaire au cours de la plasticité neurochimique du NSO	54
1. Expression de la MMP2 et la MMP9 et leur régulation par la NA dans le NSO	56
2. Co-expression de la MMP2 et la MMP9 avec l'AVP, l'OT et la GFAP dans le NSO	57
3. La NA augmente l'activité enzymatique de la MMP2 et la MMP9 dans le NSO	58
4. L'inhibition pharmacologique de l'activité MMP2 et MMP9 modifie l'expression de l'AVP et de l'OT dans le NSO	58
IV. La présence de la MMP2 et la MMP9 dans le NSO a-elle un effet spécifique ?	59
<u>Conclusion</u>	61
<u>Références bibliographiques</u>	64

Avant-propos

La plasticité neuronale est la capacité du système nerveux central à modifier les relations anatomiques et fonctionnelles entre les neurones afin de permettre l'adaptation de l'organisme aux modifications de l'environnement ou du milieu intérieur. Cette plasticité a été très étudiée et s'exprime par plusieurs aspects interdépendants comme : la plasticité synaptique, telle qu'elle est mise en évidence par des phénomènes de type LTP et LTD, la plasticité induite par des changements hormonaux tels que l'expression des neurotransmetteurs et de leurs récepteurs, et enfin une plasticité de type morphologique et structurale. Malgré l'avancement des connaissances, les interrelations entre ces diverses modes de plasticité restent encore mal connues.

Le système hypothalamo-neurohypophysaire (le modèle de plasticité utilisé dans ce travail de thèse) est l'exemple d'une région extrêmement sensible aux changements physiologiques et hormonaux. Ce système subit des remaniements neurochimiques et morphologiques remarquables associés à des stimuli physiologiques bien identifiés, tels que la déshydratation et l'allaitement. Ce système est constitué des noyaux hypothalamiques magnocellulaires supraoptique (NSO) et paraventriculaires (NPV), dont les neurones projettent dans la neurohypophyse où ils sécrètent deux neurohormones, l'ocytocine (OT) impliquée dans la parturition et la lactation (Richard et al. 1991), et la vasopressine (AVP) qui participe à la régulation de l'équilibre hydrominéral et à la vasoconstriction (Ludwig, 1998).

Le système hypothalamo-neurohypophysaire est principalement innervé par des afférences monoaminergiques, en particulier de type catécholaminergique. Bien que l'innervation noradrénergique soit la plus importante des innervations catécholaminergiques, son rôle sur la sécrétion et l'expression des neuropeptides AVP et OT dans les neurones magnocellulaires, ainsi que les mécanismes sous-jacents restent encore mal connus. Une voie directe ou indirecte pour son effet est encore discutée.

Dans la première partie de l'introduction nous décrirons en détail le système hypothalamo-neurohypophysaire, et dans la deuxième partie nous exposerons la biologie des neuropeptides sécrétés par ce système, l'AVP et l'OT. Enfin dans la troisième partie nous nous focaliserons sur les variations d'expression des neuropeptides (AVP, OT) au sein de ce système dans des modèles de plasticité neurochimique et structurale induite par afférences noradrénergiques. Puis nous exposerons notre hypothèse concernant les facteurs impliqués dans cette régulation en particulier le monoxyde d'azote (NO), et les métalloprotéinases MMP2 et MMP9.

Introduction

Le système hypothalamo-neurohypophysaire

Le système hypothalamo-neurohypophysaire est constitué principalement de deux noyaux hypothalamiques pairs : les noyaux supraoptiques (NSO) et les noyaux paraventriculaires (NPV) ainsi que de leurs projections post-hypophysaires (figure 1).

En effet les NSO et NPV ainsi que les noyaux accessoires (partie rétrochiasmatique des NSO, noyau de la commissure antérieure, région périventriculaire) contiennent les péricaryons des neurones magnocellulaires dont les axones traversent la zone interne de l'éminence médiane et projettent vers le lobe nerveux de l'hypophyse au contact de capillaires fenêtrés qui rejoignent la circulation générale (Scharrer et Scharrer 1944). A ce niveau comme dans l'éminence médiane, les axones présentent des dilatations axonales volumineuses ou corps de Herring. Dans le lobe neurohypophysaire, l'ensemble de ces dilatations axonales cohabitent avec les pituicytes et constituent les sites de libération des granules neurosécrétoires par exocytose (Lederis, 1974).

I. Les noyaux supraoptiques :

Les noyaux supraoptiques sont situés de part et d'autre du chiasma optique. Ils sont constitués des péricaryons des neurones magnocellulaires, des fibres, terminaisons axonales (dont nous définirons la nature plus loin), et de cellules gliales. Les neurones magnocellulaires sont caractérisés par des neurones de grand diamètre (20-40 μ m), et possèdent un à trois prolongements dendritiques dont la majorité s'étale ventralement dans une couche gliale formant alors un plexus susceptible de recevoir des afférences axoniques (Armstrong et al., 1982). Deux populations neuronales distinctes composent ces noyaux : l'une exprime l'ocytocine (OT) et l'autre la vasopressine (AVP). Les neurones ocytocinergiques sont répartis de façon antérodorsale tandis que les neurones vasopressinergiques sont préférentiellement répartis de façon postérieure et ventrale (figure 2A).

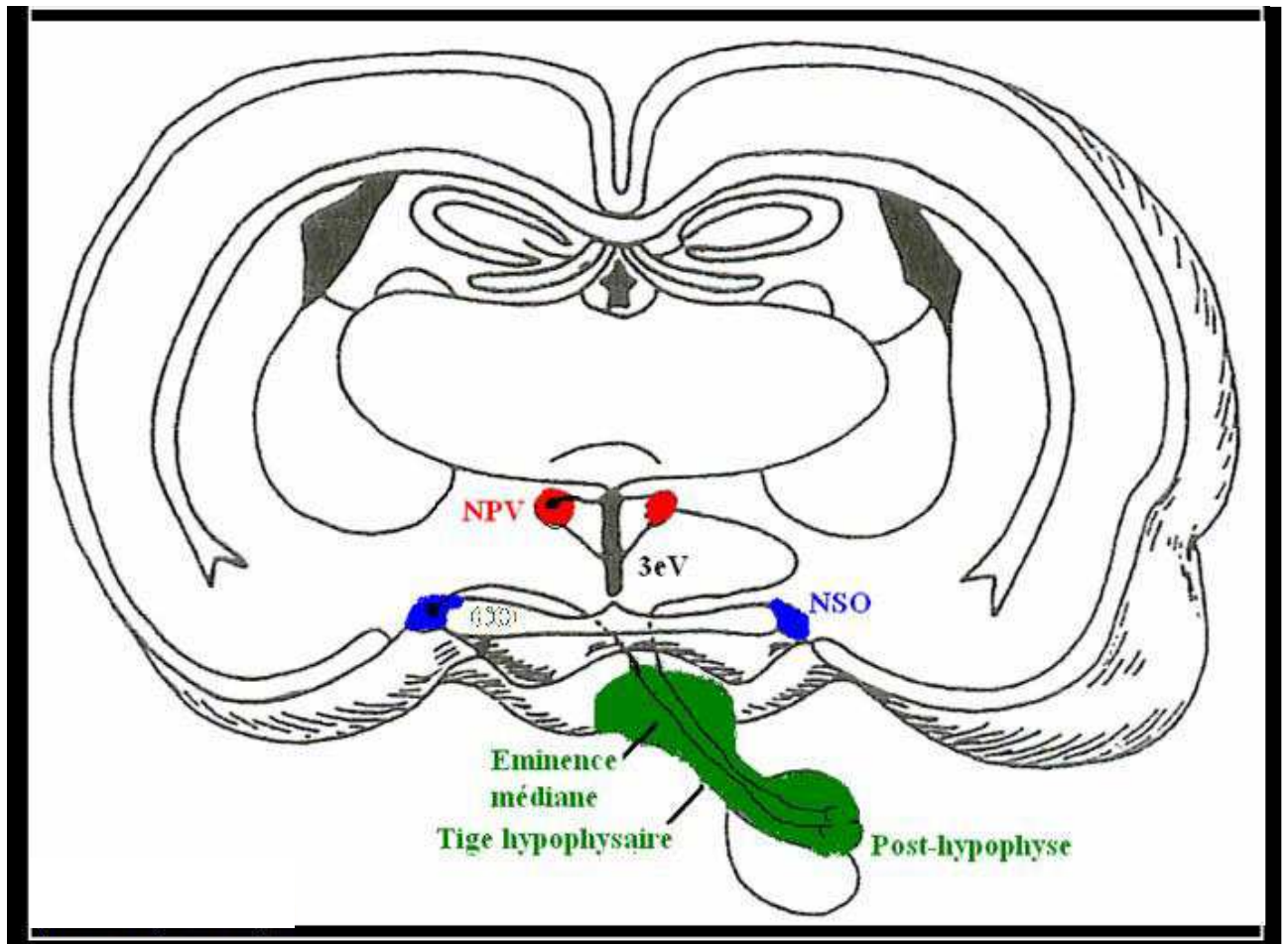


Figure 1: organisation de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire (d'après Hatton, 2002)

II. Les noyaux paraventriculaires

Les noyaux paraventriculaires sont situés de chaque côté du 3^{ème} ventricule. La composition neuronale des NPV n'est pas aussi homogène que celle de NSO puisque dans les NPV cohabitent des neurones magnocellulaires et des neurones de plus petite taille, les neurones parvocellulaires (10-15µm). Les neurones magnocellulaires sont situés dans les parties médiane et latérale de ces noyaux. La partie médiane magnocellulaire contient principalement des neurones à AVP et la partie latérale des neurones à OT (figure 2B). Comme dans les NSO, les neurones magnocellulaires des NPV possèdent eux aussi un à trois prolongements dendritiques qui sont projetés ventralement vers le troisième ventricule. Tandis que les neurones magnocellulaires innervent surtout la posthypophyse (Alonso et Assenmacher, 1981), les neurones parvocellulaires innervent différentes régions extrahypothalamiques telles que les noyaux du raphé dorsal, du tractus solitaire, le noyau dorsal du vague ou la moelle épinière (Swanson et al., 1980 ; Swanson et Sawchenko 1983).

D'autres neurones parvocellulaires de type endocrine innervent la zone externe de l'éminence médiane (Wiegand et Price, 1980) où ils déversent leur sécrétion dans le système- porte et modulent les sécrétions de l'antéhypophyse (Dierickx et al., 1976 ; Vandesande et al., 1977). Ces populations de neurones sont identifiées par la présence de deux neuropeptides, le CRH et le TRH (Brownstein et Mezey 1986). Ces neurones peuvent en plus exprimer d'autres neuropeptides comme la cholécystokinine, l'AVP, la neurotensine, l'énképhaline ou l'angiotensine (Sawchenko et Swanson 1985).

III. Les afférences et efférences des NSO et NPV

1. Afférences catécholaminergiques

Les NSO et NPV reçoivent des nombreuses afférences qui permettent de moduler leur activité, et les afférences noradrénergiques constituent les afférences modulatrices majeures de ces noyaux. Elles sont issues de la partie A1 de la région ventrolatérale du bulbe, A2 du noyau du tractus solitaire, et A6 du locus coeruleus ainsi que du complexe vagal dorsal (Cunningham et Sawchenko 1988 ; Ginsbeg et al., 1994 ; Sawchenko et Swanson 1982). Cette innervation concerne majoritairement les neurones vasopressinergiques (Mc Neill et Skadek 1980)

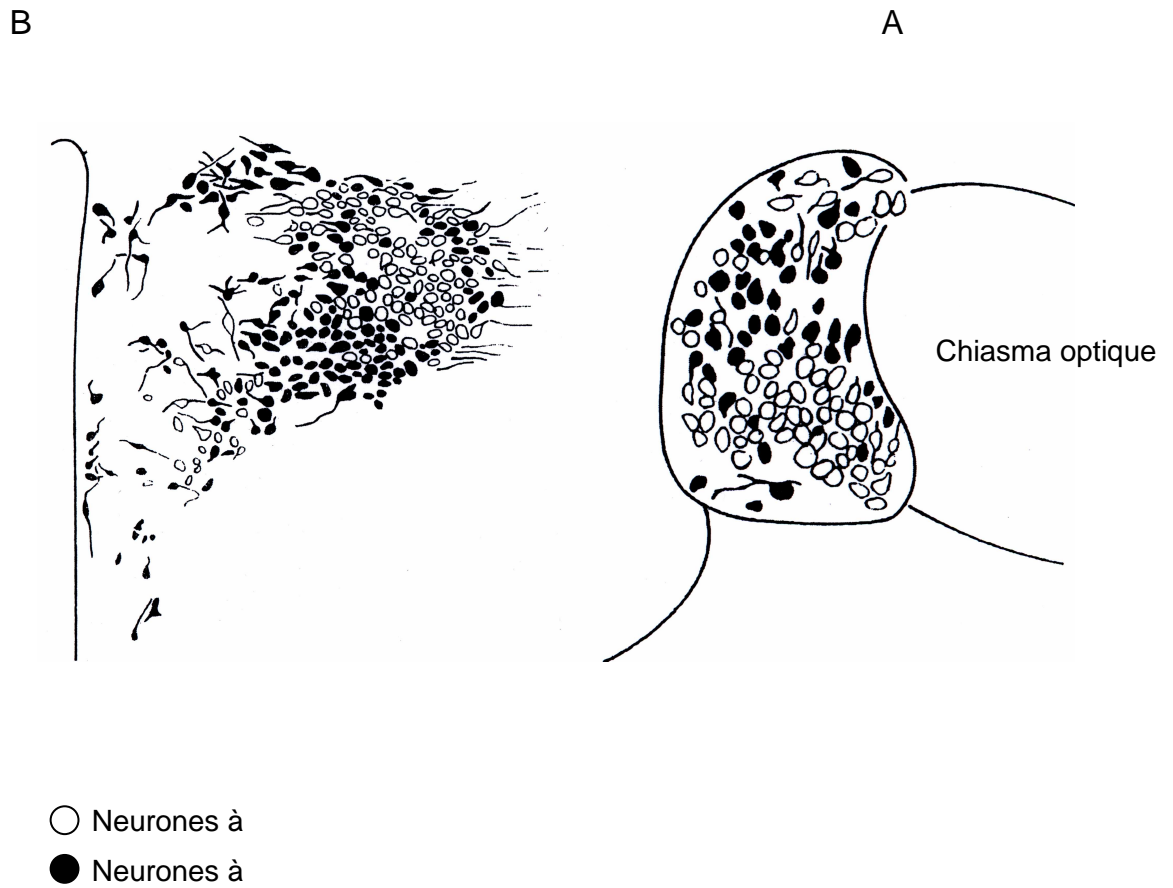


Figure 2: Localisation des neurones à vasopressine et à ocytocines dans les NSO et NPV d'après de (Hou-YU et al., 1986)

Introduction

Il semble que le groupe A1 innerve principalement les neurones magnocellulaires du NPV ainsi que le NSO, alors que le groupe A2 innerve préférentiellement les neurones parvocellulaire du NPV (Cunningham et Sawchenko 1988). Les rôles de ces afférences seront évoqués ultérieurement.

Par ailleurs, des fibres dopaminergiques issues de l'aire tegmentaire ventrale et des neurones des groupes A13 du système incerto-hypothalamique et A14 du système périventriculaire-préoptique contactent également le NPV et le NSO (Ijima et Ogawa 1981 ; Lindvall et al., 1984).

2. Afférences sérotoninergiques

Une innervation sérotoninergique modeste provenant des groupes B7, B8, B9 des noyaux de raphé concerne principalement les neurones magnocellulaires à OT (Sawchenko et al., 1983 ; Larsen et al., 1996).

3. Afférences aminoacidergiques

De nombreuses synapses contenant des acides aminés excitateurs comme le glutamate et l'aspartate entrent en contact avec les neurones magnocellulaires principalement au niveau de la lamina dendritique (Meeker et al., 1989 ; Van den Pol, 1991). Les fibres glutamatergiques proviennent probablement de l'hypothalamus dorso-latéral et représentent 25% des synapses des neurones magnocellulaires. D'autre part, 50% des synapses des NSO sont constituées par des fibres GABAergiques provenant du noyau préoptique médian et de la zone périnucléaire des NPV (Tappaz et al., 1982 ; Renaud et al., 1993).

4. Autres voies afférentes

L'innervation cholinergique des NSO et NPV est très modérée et provient de l'hypothalamus latéral (Hatton et al., 1983 ; Takahashi et al., 1997 ; Takahashi et al., 2001a).

Une innervation histaminergique provenant des noyaux tubéromammillaires et de l'aire supramammillaire contacte les neurones magnocellulaires vasopressinergiques et ocytocinergiques (Panula et al., 1984 ; Yang et Hatton 1994). De plus le NPV et le NSO reçoivent des informations directes du noyau suprachiasmatique et de la rétine (Buijs, 1996 ; Cui et al., 1997 ; Vrang et al., 1997) qui participent avec la glande pinéale, à la régulation de l'activité cyclique du système

Introduction

hypothalamo-hypophysaire (Windle et al., 1996). Enfin le NPV et le NSO sont les cibles d'afférences d'origine diverse dont l'aire préoptique, le septum, le noyau arqué et les bulbes olfactifs (Leng et al., 1988 ; Oldfield et al., 1985 ; Saphier et Feldman 1987 ; Swanchenko et al., 1983 ; Smithson et al., 1989 ; Thellier et al 1994).

5. Efférences

Les axones non myélinisés des neurones magnocellulaires des NSO et NPV forment le tractus hypothalamo-neurohypophysaire. Environ un tiers des fibres proviennent du NPV, elles atteignent les NSO pour ensuite aller vers l'éminence médiane interne. Les fibres des NSO, quant à elles, se projettent vers la ligne médiane pour rejoindre les fibres provenant des neurones magnocellulaires des NPV au niveau de l'éminence médiane interne. Toutes ces fibres axonales se terminent sur les vaisseaux fenêtrés de la posthypophyse où a lieu la sécrétion des peptides AVP et OT. Par ailleurs, des collatérales axoniques de neurones OT et VP situées dorsalement dans le NSO peuvent former des synapses avec des neurones de l'hypothalamus latéral (Mason et al., 1984).

IV. Biologie cellulaire des neurones endocrine

Contrairement aux neurotransmetteurs conventionnels tels que l'acétylcholine, les acides aminés et les monoamines, qui sont synthétisés, recyclés, puis accumulés localement dans des petites vésicules au niveau de la terminaison nerveuse, les neuropeptides, tels que l'OT et l'AVP, présentent des mécanismes de biosynthèse et de sécrétion originaux. En effet, ils nécessitent une transcription, une traduction et un transport continu de protéines à partir des corps cellulaires. Ces protéines sont ensuite dirigées à partir de l'appareil de Golgi vers une voie de sécrétion régulée. Elles sont accumulées dans des grandes vésicules à cœur dense, où elles vont subir de nombreuses modifications post-traductionnelles pour acquérir leur forme active lors du transport axonal les conduisant jusqu'aux terminaisons nerveuses. Contrairement au cas des vésicules synaptiques claires, la sécrétion à partir des vésicules à cœur dense est rarement provoquée par un unique potentiel d'action ; elle requiert plutôt un train de potentiels d'action (Lundberg 1990 ; Gainer et al., 1994). Ces deux mécanismes de sécrétions peuvent cependant coexister au sein d'un même neurone (Kupfermann 1991).

Introduction

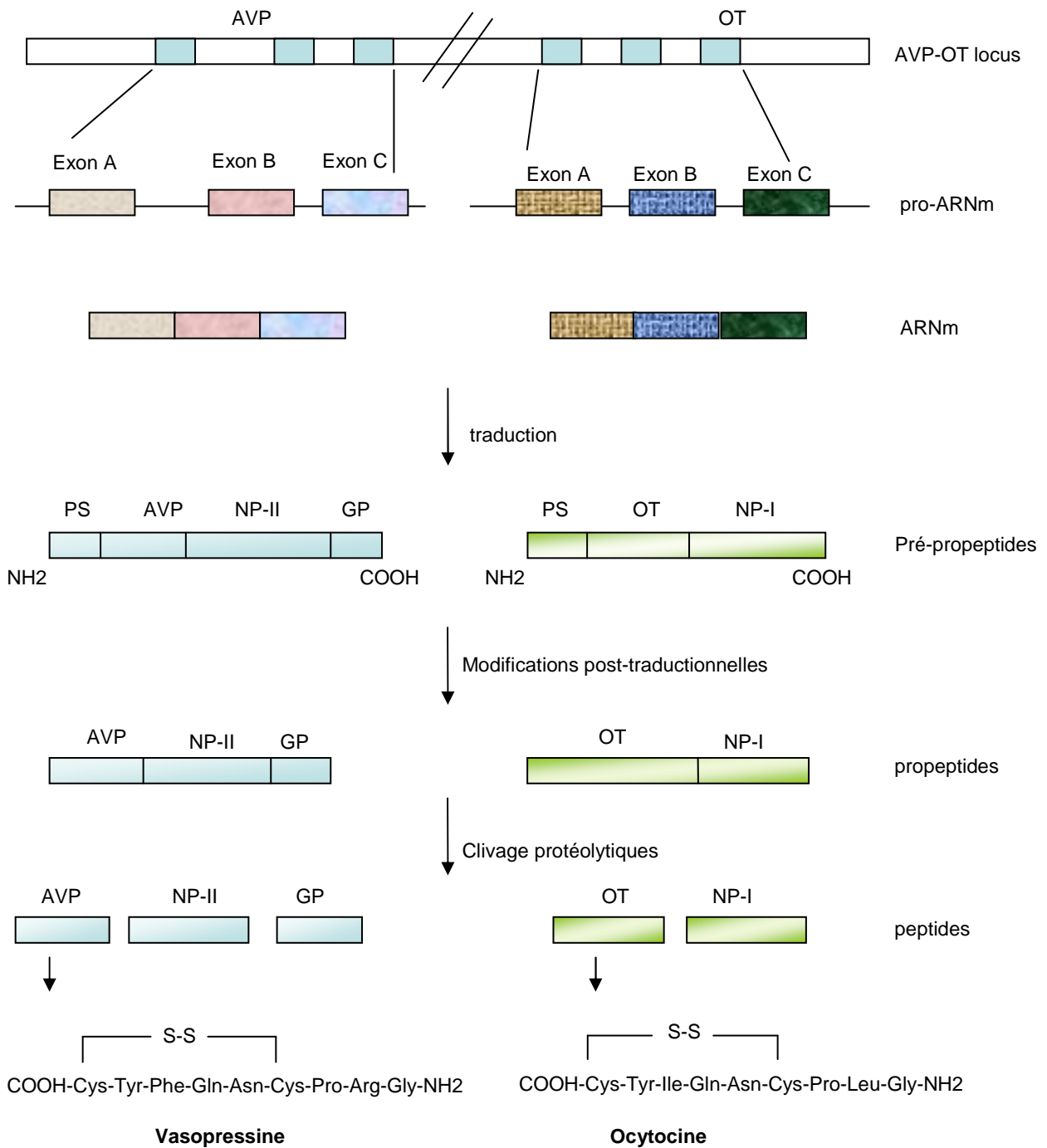


Figure 3: Organisation des gènes AVP et OT. PS: peptide signal; NPI: Neurophysine I; NP-II: Neurophysine II; GP: Glycopeptide.

Introduction

Les gènes AVP et OT sont localisées sur le même chromosome, à très peu de distance l'un d'autre et en position tête-bêche (voir Burbach et al., 2001). Bien que l'organisation des exons soit simple, la région intergénique est plus complexe : elle présente de longues séquences d'éléments répétés, les LINEs (long interspersed repeated DNA elements). Cette région intergénique est nécessaire à l'expression *in vitro* des gènes AVP et OT car elle contient au moins quatre *enhancers* (Fields et al., 2003). Le gène de l'AVP code pour une pré-pro-hormone de 166 acides aminés constituée d'un peptide signal, rapidement clivé lors de la biosynthèse, de la séquence de l'AVP (comprenant 9 acides aminés reliés par un pont disulfure entre 1 et 6), et de la séquence de la neurophysine II, une protéine liant l'AVP et qui sera libérée avec elle au niveau des terminaisons nerveuses. La partie terminale de la pré-pro-AVP est un glycopeptide de 39 acides aminés dont la fonction reste encore inconnue (Poulain et Jard 1995). Le gène OT code de façon similaire pour un précurseur qui contient également une neurophysine, la neurophysine I. Cependant la prépro-hormone de l'OT ne présente pas de glycopeptide. La structure primaire de l'OT ne diffère de celle de l'AVP que par deux acides aminés, en position 3 et 8. Le pont disulfure y est également présent.

Les gènes AVP et OT sont constitués de trois exons dont le premier exon A, code pour le peptide signal, la neurohormone, les 3 acides aminés de transition et les 9 premiers acides aminés de la partie NH₂-terminale de la neurophysine. L'exon B code pour une portion extrêmement conservée de la neurophysine (acides aminés 10 à 76). L'exon C du gène AVP code pour les derniers acides aminés de l'extrémité COOH-terminale de la neurophysine, pour un site de clivage monobasique et pour le glycopeptide de 39 acides aminés. En ce qui concerne le gène OT, l'exon C ne code que pour la partie COOH-terminale de la neurophysine II (figure 3).

Après la transcription des ARNm des prépro-hormones par les ribosomes du reticulum endoplasmique granuleux, les protéines-précurseurs résultantes subissent plusieurs étapes de maturation, en particulier l'élimination du peptide signal, la formation des ponts disulfures et pour l'AVP, les premières étapes de glycosylation. Elles passent progressivement du reticulum à l'appareil de Golgi puis aux vésicules à cœur dense. Au cours de ce processus, les neurophysines serviraient de protéines-chaperonnes et permettraient l'adressage des neurohormones. Le clivage final du peptide et de la neurophysine a lieu dans les vésicules qui contiennent des prohormones convertases (de type 1/3 pour les neurones AVP et de type 5 pour les neurones OT) et des carboxypeptidases (de type H/E). L'expression de ces enzymes est régulée, en particulier au cours de la déshydratation, suggérant un niveau supplémentaire dans le contrôle de la sécrétion des neurohormones (Mahata et al., 1992).

Introduction

Comme nous venons de le souligner, les vésicules à cœur dense jouent un rôle important dans la maturation de l'AVP et l'OT mais aussi dans leur transport et leur stockage, soit au niveau dendritique ou axonal, et enfin dans leur sécrétion. Les vésicules à cœur dense ont un diamètre de 160 à 200 nm, avec un contenu riche en protéines et peptides, ce qui les rend opaque en microscopie électronique (Castel et al., 1984). Le pH intravésiculaire est de l'ordre de 5 à 6 et permet de stabiliser le contenu des vésicules, et en particulier l'association de l'AVP et de l'OT avec leur neurophysine. Après leur formation dans le système trans-golgien, les vésicules à cœur dense sont transportées de façon antérograde par le réseau de microtubules en utilisant des moteurs moléculaires de type kinésine. Les vésicules à cœur dense sont ensuite stockées au niveau de la post-hypophyse dans les terminaisons où elles sont mobilisées et sécrétées sous l'effet de potentiel d'action. Cependant on trouve aussi des vésicules à cœur dense dans les corps cellulaires et les dendrites, où elles peuvent être sécrétées de façon calcium-dépendante, notamment lors de la lactation (Ludwig, 1998). Les mécanismes moléculaires responsables de la sécrétion des peptides à partir des vésicules à cœur dense sont très proches de ceux qui libèrent les neurotransmetteurs depuis les petites vésicules synaptiques (Robinson et Martin, 1998). Pour la sécrétion des neurotransmetteurs, les vésicules doivent être attachées à la membrane à proximité des canaux calciques pour pouvoir libérer leur contenu (figure 4).

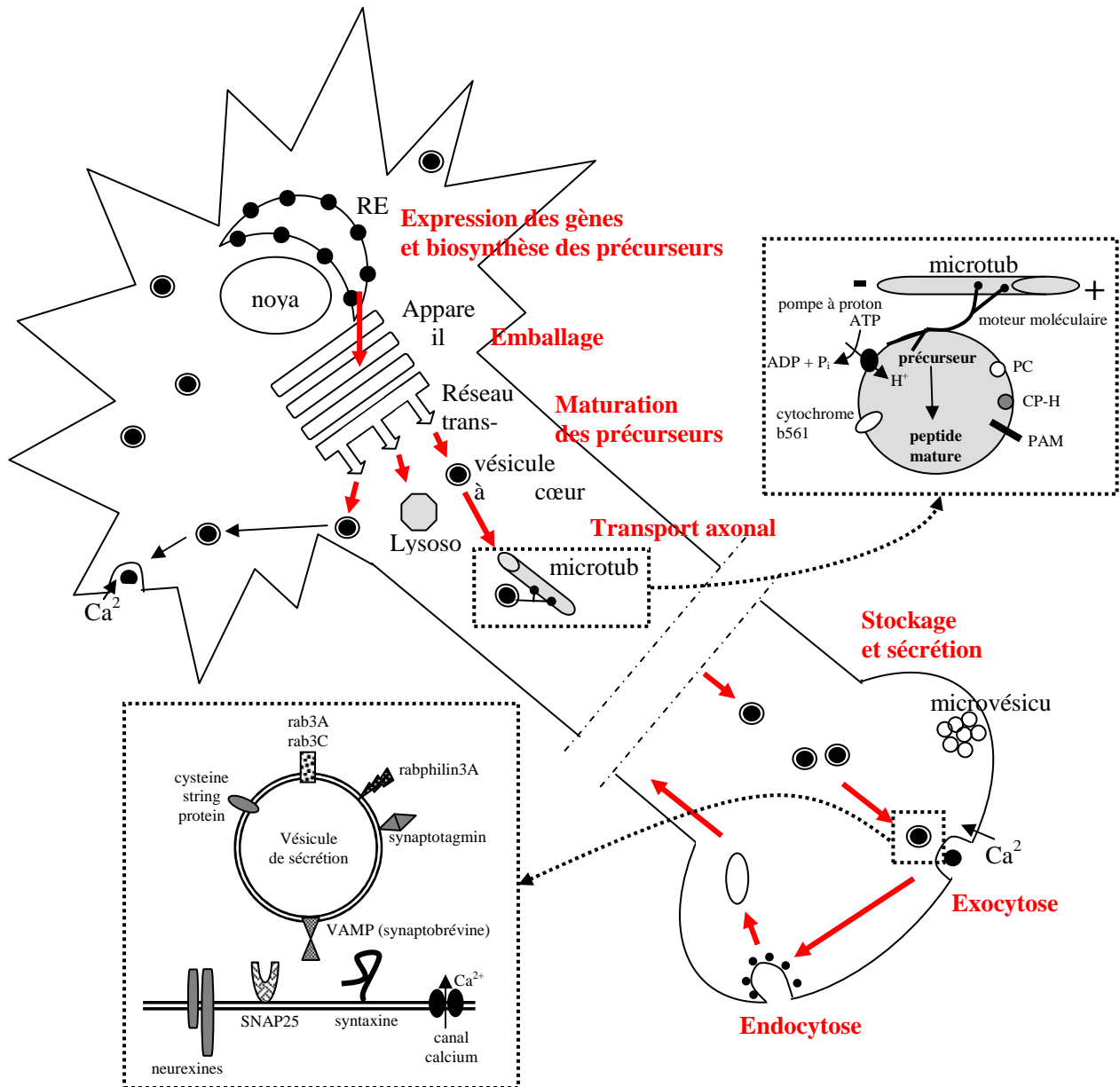


Figure 4 : Propriétés cellulaires et moléculaires d'un neurone peptidergique
(d'après Burbach et al., 2001)

REG : reticulum endoplasmique granuleux, PC1 : pro-hormone convertase, CP-H : carboxypeptidase-H, PAM : peptidyl glycine α-amidating monooxygenase

Les neuropeptides du système hypothalamo-neurohypophysaire

Les neurones magnocellulaires du système hypothalamo-neurohypophysaire produisent et sécrètent deux hormones présentant de grandes analogies structurales : **la vasopressine et l'ocytocine**. Il s'agit en effet dans les deux cas de peptides de 9 acides aminés dont la structure générale est restée extrêmement conservée chez les Vertébrés.

I. L'arginine vasopressine (AVP)

La vasopressine ou *hormone antidiurétique* est une hormone peptidique synthétisée principalement par les noyaux supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus et libérée par l'hypophyse postérieure.

1. Structure et biosynthèse de l'AVP

L'AVP est un polypeptide comportant neuf acides aminés, dont les deux groupements cystéine sont reliés par un pont disulfure (figure 3). La structure peptidique de l'AVP a été déterminée par Du Vigneaud en 1953. Le gène de l'AVP est situé sur le chromosome 20 et il est constitué de trois exons et de deux introns (Sausville et al., 1985).

Comme nous l'avons déjà souligné précédemment, la biosynthèse et la sécrétion des neuropeptides comme l'AVP contrairement à la majorité des neurotransmetteurs sont transcrits et traduits de manière constitutive (pour revue, Burbach et al., 2001). Chez l'homme, une pré-prohormone contenant un peptide signal est synthétisée. Par la suite, le peptide signal est retiré de la préprohormone, permettant ainsi l'apparition de la prohormone qui comprend trois domaines : l'AVP, le domaine neurophysine I (région importante impliquée dans l'emballage de l'AVP dans des granules de sécrétion), et le domaine glycopeptide (Itoi et al., 2004). Le transport axonal de la prohormone vers la neurohypophyse nécessite environ trente minutes et dépend essentiellement de la neurophysine. Par la suite, la prohormone est libérée des domaines neurophysine I et glycopeptide qui permet l'apparition de la forme active de l'hormone, autrement dit l'AVP. L'AVP est alors libérée soit dans la circulation- porte par les neurones parvocellulaires, soit dans la circulation sanguine par les neurones magnocellulaires. Lors d'une stimulation

physiologique (déshydratation, lactation), seulement 10 à 20 % de la quantité de vasopressine accumulée dans la neurohypophyse est sécrétée dans la circulation sanguine (Sklar et Schrier 1983).

2. Les différents statuts de médiateurs de l'AVP

Les populations de neurones produisant l'AVP sont localisées majoritairement dans l'hypothalamus. Dans cette région, l'AVP provient essentiellement des neurones magnocellulaires neurosécrétoires des NSO et NPV (Swanson et Sawchenko 1983), ainsi que des neurones parvocellulaires du NPV et du noyau suprachiasmatique (NSC) (Card et al., 1988 ; Card et Moore 1984 ; Van Leeuwen et Caffé 1983).

L'AVP provenant des neurones magnocellulaires exerce un rôle de neurohormone. Elle est transportée par la voie axonale qui passe par la zone interne de l'éminence médiane, et arrive au lobe nerveux de l'hypophyse (Hatton, 1990 ; Swanson et Sawchenko 1983), elle est alors sécrétée dans la circulation générale pour moduler l'activité de certains organes, comme le rein (Boersma et Van Leeuwen 1994 ; Falke 1991).

L'AVP présente également une fonction de neurotransmetteur, dans ce cas le peptide provient essentiellement des neurones parvocellulaires du NPV (Whitnall et al., 1987). L'AVP est transportée par les axones de ces neurones jusqu'à la zone externe de l'éminence médiane et est libérée par le système porte hypothalamo-antéhypophysaire afin de moduler la sécrétion hypophysaire de l'ACTH (hormone adrénocorticotrope) lors d'une situation de stress (Aguilera, 1994 ; Antoni, 1993).

3. Récepteurs et rôles physiologiques de l'AVP

3. 1. Récepteurs

Les récepteurs de l'AVP (V1a, V1b et V2), appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (pour revue, Barberis et al., 1998 ; Burbach et al., 2001).

a) le récepteur V1a

Ce récepteur couplé à une protéine G active les phospholipases C, D et A₂ déclenchant ainsi l'hydrolyse du PIP₂ en seconds messagers, l'IP₃ et le DAG. Cela entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium responsable de la vasoconstriction (Briley et al., 1994 ;

Introduction

Chandrashekhar et al., 2003 ; Goldsmith et Gheorghiadu, 2005). Ce récepteur est exprimé en particulier par les cellules du foie, des reins, et des muscles lisses entourant les vaisseaux sanguins (Lolait et al., 1992 ; Ostrowski et al., 1993). Il présente également une localisation cérébrale, notamment dans les cortex frontal et piriforme, les noyaux olfactifs antérieurs et postérieurs, l'hippocampe, l'amygdale, le septum, l'hypothalamus latéral, les noyaux paraventriculaire, suprachiasmatique, ventro-médian, le dorso-médian, et noyau arqué, la glande pinéale, le noyau de tractus solitaire et le cervelet (Szot et al., 1994).

b) le récepteur V1b

L'activation de ce récepteur induit une augmentation de la concentration cytosolique en calcium suite à la stimulation de la phospholipase C. Ce récepteur est essentiellement synthétisé par les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse et il est responsable de la régulation de l'axe corticotrope (Robert et Clauser 2005). Il est synthétisé dans le cerveau, en particulier par les neurones vasopressinergiques du NSO et le NSC, les bulbes olfactifs, le cortex piriforme, l'hippocampe et la substance noire, ainsi que dans les tissus périphériques tels que les reins, le thymus, les poumons, l'utérus et les glandes mammaires (Hernando et al., 2001 ; Hurbin et al., 1998 ; Lolait et al., 1995 ; Vaccari et al., 1998, Robert et Clauser, 2005).

c) le récepteur V2

Ce récepteur est couplé à une protéine Gs, dont l'activation induit une production d'AMPc suite à l'activation de l'adénylate cyclase (Orloff et Handler 1967, Goldsmith et Gheorghiadu 2005 ; Robert et Clauser 2005). Ce récepteur est exclusivement exprimé dans les reins chez le rat adulte (Lolait et al., 1995 ; Ostrowski et al., 1992). Par contre l'ARNm de ce récepteur est détecté dans le cerveau de rat nouveau né jusqu'à la deuxième semaine post-natale (Hirasawa et al., 1994).

3. 2. Implications physiologiques

a) l'équilibre hydrominéral

Le rôle biologique le plus important de l'AVP est la régulation de l'excrétion de l'eau par le néphron. Ce mécanisme dépend des concentrations plasmatiques en AVP, et donc de son taux de synthèse et de libération par les neurones magnocellulaires (Schrier, 1985). Ce processus se produit principalement dans des cellules du tube collecteur d'urine où la réabsorption de l'eau est induite après une liaison de l'AVP à son récepteur de type V2 situé au pôle basolatéral des cellules du tube collecteur (Orloff et Handler 1967). La stimulation de ce récepteur par l'AVP provoque une

Introduction

augmentation de l'AMPC qui à son tour conduit à la translocation des canaux hydriques, les aquaporines, vers la membrane apicale de ces cellules, permettant la réabsorption de l'eau (Robert et Clauser 2005).

b) la vasoconstriction

Lors d'une hémorragie, la diminution du volume sanguin entraîne une augmentation de la concentration plasmatique d'AVP qui provoque une vasoconstriction *via* l'activation des récepteurs V1a et V1b présents sur les muscles lisses des parois vasculaires et une atténuation de l'hypotension (Thibonnier et Clauser 1996 ; Lohmeier, 2003 ; Den Ouden et Meinders, 2005). Cependant l'AVP ne semble pas intervenir dans la maintien de la pression artérielle (Hirsch et al., 1993).

c) la régulation corticotrope

L'AVP libéré dans le système porte hypothalamo-antéhypophysaire par les neurones parvocellulaires du NPV lors d'un stress, contribue avec le corticotrope releasing hormone (CRH) à la sécrétion d'adrenocorticotropin hormone (ACTH) par les cellules corticotropes de l'adénohypophyse *via* le récepteur V1b (Antoni, 1993 ; Laszlo et al., 2001 ; Itoi et al., 2004). Par ailleurs, l'AVP libérée par les neurones magnocellulaires pourrait également être impliquée dans le contrôle de la libération d'ACTH en agissant sur l'hypothalamus et augmenter la synthèse et la libération du CRH (Antoni, 1993 ; Raff, 1993; Lohmeier, 2003).

d) autres implications physiologiques

En plus de ces effets classiques, l'AVP exerce d'autres effets. Il joue un rôle dans la régulation des rythmes circadiens tant par son action locale que par son rôle médiateur de l'information circadienne du NSC qui est la principale horloge circadienne chez les Mammifères *via* les récepteurs V1 (Ingram et al., 1996). De plus, l'AVP favorise l'apprentissage et la mémorisation, intervient dans les comportements sexuel et social, et la dépression (Scantamburlo et al., 2001 ; Swaab et al., 2005 ; Ring, 2005 ; Debiec, 2005 ; Ogier et al., 2006),

4. Facteurs de régulation de la synthèse et de la sécrétion d'AVP

4. 1. La stimulation osmotique

La stimulation osmotique par privation d'eau ou par boisson d'eau salée entraîne une augmentation des ARNm codant pour l'AVP dans les NSO et NPV, ainsi qu'une augmentation de sa libération dans le sang (Landgraf et al., 1988, Lightman et Young 1987; Uhl et al., 1985 ; Verbalis et al., 1991 ; Meister et al., 1990 ; Kondo et al., 2004). Une administration intrapéritoneale d'une solution saline hypertonique induit l'activation électrique des neurones vasopressinergiques, ainsi qu'une augmentation du niveau des ARNm. Cette activation se manifeste par l'expression de c-fos dans les neurones magnocellulaires du NSO et du NPV (Ciosek, 2002 ; Pirnik et al., 2004).

Après quelques heures d'une stimulation osmotique, l'activité transcriptionnelle du gène codant l'AVP dans les neurones magnocellulaires est significativement augmentée (Carter et Murphy 1990 ; Kakiya et al., 2000). D'autre part, la queue poly (A) des ARNm codant l'AVP s'allonge de 250 à 400 résidus. Cet allongement consécutif à la stimulation osmotique aurait pour effet de stabiliser l'ARNm et ainsi d'augmenter sa demi-vie et par conséquent la traduction de l'AVP (Zeevi et al., 1982 ; Carrazana et al., 1988 ; Carter et Muephy 1991). De plus, les neurones AVP augmentent leur activité électrique, qui est phasique et asynchrone, il en résulte une libération soutenue d'AVP dans la circulation générale. Enfin, une stimulation osmotique est associée à une forte augmentation des niveaux des ARNm codant pour l'AVP dans le lobe nerveux de l'hypophyse, sans aucune modification de leur queue poly (A) par rapport à une situation contrôle chez le rat et la souris (Murphy et al., 1989). Au contraire, dans les cas d'hypo-osmolarité, la synthèse et la libération d'AVP est fortement diminuée (pour revue, Antunes-Rodrigues et al., 2004).

4. 2. Les monoamines

Parmi les afférences aux noyaux magnocellulaires, les afférences de type monoaminergique ont une place particulière. Nous avons déjà évoqué les afférences catécholaminergiques issues du tronc cérébral et du bulbe rachidien et qui se terminent principalement sur les neurones à AVP. De nombreuses études ont montré que la **noradrénaline (NA)** libérée par ces terminaisons, exerce un effet stimulateur sur la libération d'AVP par les neurones magnocellulaires par le biais des récepteurs α -1 adrénergiques. Cependant, pour des concentrations élevées en NA, on constate une

Introduction

inhibition de la libération de l'hormone par l'intermédiaire des récepteurs α -2 et β - adrénergiques (Armstrong et al., 1986 ; Brooks et al., 1986 ; Day et al., 1985 ; Leibowitz et al., 1990 ; Randale et al., 1986 ; Shioda et al., 1997 ; Willoughby et al., 1987 ; Yamashita et al., 1987).

La première voie est mise en jeu dans les cas d'hypo-volémie modérée et implique essentiellement les groupes noradrénergiques A1 et A2 (Day et Sibbald 1989 ; Raby et Renaud 1989). Par contre, lors d'une chute importante de la pression artérielle ou d'une hémorragie, l'inhibition des barorécepteurs de la crosse aortique et l'activation des chémorécepteurs des corpuscules carotidiens stimulent les neurones magnocellulaires vasopressinergiques via un réseau polysynaptique incluant le groupe noradrénergique A6 (Bissett et Chowdrey 1988 ; Jhamandas et al., 1989).

L'étude menée par Vacher et al., (2002) a montré que la NA augmente l'expression et la synthèse de l'AVP dans les neurones magnocellulaires chez la souris. Par ailleurs, il été démontré que l'injection de la NA dans le NPV ne modifie pas la synthèse d'AVP dans les neurones parvocellulaires du NPV alors qu'elle est associée à une augmentation de la synthèse de CRH (pour revue, Itoi et al., 2004). Cet effet pourrait être dû à un feed back négatif par la corticostérone qui est particulièrement puissant sur le gène de l'AVP (Helmreich et al., 2001).

Il existe aussi un contrôle sérotoninergique issu des groupes B7, B8 et B9 sur la synthèse et la libération de l'AVP. Plusieurs travaux ont montré que la **sérotonine (5-HT)** pouvait moduler l'activité des neurones magnocellulaires vasopressinergiques. En effet il été montré que la 5-HT a un effet stimulateur sur l'expression et la synthèse de l'AVP (Vacher et al., 2002, Vacher et al., 2003). L'administration de pCPA (un inhibiteur de la 5-HT), diminue l'expression de l'AVP dans des noyaux NSO et NPV (Vacher et al., 2002). Des multiples récepteurs de la 5-HT ont été mis en évidence dans ces noyaux : 5-HT1A, 5-HT1B ; 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT5A, et 5-HT7 (Belenky et Paicard 2001 ; Duncan et al., 2000 ; Oliver et al., 2000, Pikard et al., 1999).

4. 3. Autres facteurs de régulation

L'innervation cholinergique provient pour l'essentiel de l'hypothalamus latéral (Hatton et al., 1983). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'acétylcholine stimule la sécrétion de l'AVP par les neurones magnocellulaires (Sladek et al., 1977 ; Clarke et al., 1978 ; Takahashi et al., 1994 ; Takahashi et al., 1996; Takahashi et al., 2001a, 2001b).

Par ailleurs, une innervation histaminergique originaire des noyaux mamillaires peut stimuler les neurones vasopressinergiques par les récepteurs H1 (Knigge et al., 1999 ; Yang et Hatton 1994). Ainsi Knigge et al. (1999) ont montré que l'administration intracérébroventriculaire d'histamine induit l'expression de *c-fos* dans les neurones vasopressinergiques et stimule l'expression d'AVP (Kjaer et al., 1994a, 1994b). Un rôle physiologique des projections histaminergiques a été mis en évidence sur la régulation de la sécrétion de l'AVP en réponse à la déshydratation, puisque le blocage du système histaminergique inhibe la réponse de l'AVP à la déshydratation (Kjaer et al., 1994a ; Schagen et al., 1996 ; Kjaer et al., 1995 ; Knigge et al., 1999).

Les fibres dopaminergiques provenant de l'aire tegmentaire ventrale (Iijima et al., 1981), de la région des groupes A13 et A14 (Lindvall et al., 1984), ont un effet activateur sur les neurones vasopressinergiques et sur la libération du peptide (Bridges et al., 1976 ; Mason, 1983).

Enfin, les glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur sur la transcription d'AVP (Davis et al., 1986 ; Schilling et al., 1991). Ce mécanisme prend place dans un ensemble de la boucle de feed-back négative entre les glandes surrénales qui produisent les glucocorticoïdes et l'axe hypothalamo-anthéhypophysaire qui sécrète l'ACTH. Il semble que les récepteurs aux glucocorticoïdes ne sont pas seulement présents sur les neurones vasopressinergiques parvocellulaires mais aussi sur les neurones magnocellulaires (Berghorn et al., 1995, Itoi et al., 2004). Cela pourrait expliquer l'hypersécrétion d'AVP chez des patients souffrant d'hypofonctionnement hypophysaire entraînant une inhibition chronique des glucocorticoïdes (Oelkers 1989 ; Olchovsky et al., 2005).

II. L'ocytocine (OT)

1. Nature et structure

En 1906, Dale mit en évidence que la contraction de l'utérus est induite *in vivo* et *in vitro*, par un extrait de lobe postérieur d'hypophyse. La substance active a été dénommée par la suite **ocytocine**.

Ce sont aux travaux des équipes de Du Vigneaud, qui a reçu le prix Nobel en 1955, qu'on doit l'essentiel des connaissances actuelles sur les structures peptidiques des hormones neurohypophysaires (Du Vigneaud 1953a ; 1953b). L'OT est un neuropeptide d'un poids moléculaire d'environ 1000 Da, dont l'extrémité est formée par une boucle de 6 acides aminés refermée sur elle-même par un pont disulfure (S-S) entre deux cystéines, à laquelle s'ajoute une queue de trois acides aminés à l'extrémité C-terminale (pour revue Gimpl et Fahrenholz, 2001) (figure 3).

L'OT a une structure très voisine de celle de la vasopressine puisque les différences ne portent que sur deux acides aminés. Le gène de l'OT est situé sur le même chromosome que celui de l'AVP.

2. Biosynthèse et sécrétion

L'OT est synthétisée de manière équivalente à l'AVP. Comme nous l'avons signalé précédemment, elle est synthétisée dans les neurones hypothalamiques sous forme d'un précurseur nommé pré-pro-ocytocine. Ce précurseur possède à la suite du peptide signal, deux domaines correspondant respectivement à l'OT, et à un polypeptide associé : la neurophysine 1, dont l'OT se détache pendant la migration axonale des grains de sécrétion vers les terminaisons du lobe nerveux (Burbach et al., 2001 ; Lipschitz et al. 2005). L'arrivée des potentiels d'action induit une dépolarisation membranaire qui provoque un influx de calcium déclenchant la libération d'OT par les terminaisons dans la circulation sanguine (figure 4).

3. Récepteur et rôles biologiques

3. 1. Récepteur

Les multiples fonctions hormonales et nerveuses de l'OT sont assurées par son récepteur unique OTR. Kimura et al., (1992) a pour la première fois cloné l'ADN codant pour l'OTR chez l'homme. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Barbaris et al., 1998 ; Gimpl et Fahrenholz 2001). Ce récepteur n'est pas spécifique de l'OT parce qu'il présente une affinité similaire pour l'AVP (Kiss et Mikkelsen 2005). L'activation de ce récepteur induit une augmentation de calcium (Ca^{+2}) cytosolique consécutive à la stimulation de la phospholipase C (Marc et al., 1986 ; Gimpl et Fahrenholz 2001). Ce récepteur est exprimé dans l'utérus, les glandes mammaires (Kimura et al., 1992 ; Rozen et al., 1995), les reins, le cœur, le thymus, le pancréas (Kiss et Mikkelsen 2005), et le système nerveux central (Yoshimura et al., 1993). La distribution cérébrale de ce récepteur varie selon les espèces. Chez le rat, on le trouve en particulier dans l'hippocampe, le NSC, l'hypothalamus, le système limbique, la moelle épinière, la partie compacte de la substance noire, le cortex piriforme et le noyau rouge (Vaccari et al., 1998 ; Gimpl et Fahrenholz 2001).

3. 2. Rôles physiologiques

a) la reproduction

L'OT est synthétisée par de nombreuses structures qui sont directement liées aux fonctions de reproduction. En effet, ce peptide règle divers aspects physiologiques et comportementaux de la fonction reproduction, ainsi que le maintien de la parturition, l'initiation de la lactation et l'éjection du lait. Lors de la parturition, le myomètre utérin augmente très fortement son expression d'OTR et l'OT est libérée de façon importante par la post-hypophyse. Associée aux prostaglandines, elle provoque des contractions puissantes et l'expulsion du nouveau-né (Burbach et al., 2001).

Lors de la lactation, l'implication de l'OT est double puisqu'elle permet d'une part l'éjection du lait en stimulant la contraction des cellules myoépithéliales des canaux galactophores entourant les alvéoles des glandes mammaires (Samson et al., 1986; Leng et al., 2005) et d'autre part elle agit sur la production du lait en stimulant la libération de la prolactine (Lipschitz et al., 2005). Le rôle de l'OT a été récemment réexaminé car des souris transgéniques dépourvue d'OT sont viables et fertiles, et elles présentent des comportements maternels normaux (Young et al., 1996 ; Russell et al., 2003). Cependant elles sont incapables d'allaiter leur portée. Ainsi, ces résultats indiquent que l'OT jouerait un rôle crucial dans l'éjection du lait mais pas dans la

Introduction

parturition. Cependant, de nombreuses études sont en faveur d'une action de l'OT, et les traitements ocytocinergiques sont efficaces pour le déclenchement de l'accouchement. Enfin, l'administration d'antagonistes OT retardent la délivrance (Antonijevic et al., 1995).

L'OT est impliquée dans la régulation de certains comportements sexuels. Dans ce cas l'OT n'agit pas en tant que neurohormone mais elle agit en tant que neurotransmetteur. L'OT participe à certains aspects de la fonction reproductrice chez la femelle comme le cycle ovarien, le comportement sexuel concernant notamment la posture de lordose chez la femelle et la copulation chez les mâles (Argiolas et al., 1988). De plus, chez le mâle, l'innervation ocytocinergique provenant des neurones parvocellulaires du NPV projettent en dehors de l'hypothalamus, notamment dans la moelle épinière à partir de laquelle des voies nerveuses périphériques et autonomes innervent le corps caverneux du pénis. Une fois qu'ils sont activés, les neurones secrètent l'OT qui facilite l'érection du pénis et la copulation (Giuliano et Rampin 2000 ; Argiolas et Melis., 2004 ; Leng et al., 2005 ; Kita et al 2006).

b) l'équilibre hydrominéral

Bien que l'OT soit impliquée majoritairement dans la reproduction, elle exerce également des effets stimulants sur la natriurèse (Verbalis et al., 1991 ; Ozaki et al., 2004). L'OT exerce son effet *via* les récepteurs OTR présents sur les cellules de la macula densa et du tube proximal du néphron, et dont l'expression est sensible aux oestrogènes (Breton et al., 1996 ; Ostrowski et Lolait 1995 ; Ostrowski et al., 1995).

c) autres rôle physiologiques

En plus des ces effets classiques, l'OT assure d'autres fonctions telles que la stimulation de la sécrétion de la prolactine, de la LH, de l'ACTH ; ainsi l'OT est impliqué dans le comportement maternel et social, les émotions, le stress, l'anxiété, l'apprentissage, la mémoire, et la dépression (McCarthy et al. 1996 ; Evans, 1997 ; Scantamburlo et al., 2001 ; Choleris et al., 2003 ; Swaab et al., 2005 ; Leng et al., 2005 ; Debiec, 2005).

4. Régulation physiologique de la synthèse et de la sécrétion de l'OT

4. 1. La reproduction

Durant la grossesse, la parturition et l'allaitement il se produit des modifications très marquées de l'expression et de la sécrétion de l'OT.

Pendant la grossesse, l'OT est accumulée dans les neurones magnocellulaires grâce à trois facteurs : la polyadénylation des ARNm, l'augmentation de l'expression du peptide et l'inhibition de la libération de l'hormone (Zingg et al., 1989 ; Crowley et al., 1993 ; Van Tol et al., 1988 ; Zingg et Leferbvre 1988; Douglas et al., 1993 ; Leng et al., 1999).

L'OT est massivement libérée au moment de la parturition. Cette libération est due à une augmentation de la production de prostaglandines par l'utérus. Les prostaglandines provoquent une chute de la production de la progestérone, qui a pour conséquence une augmentation de l'expression des OTR dans l'utérus et des contractions des cellules du myomètre (Leng et al., 2005). Le signal de l'utérus contracté est transmis *via* les nerfs vague et pelvien. Ces voies sont reliées au noyau du tractus solitaire, dans lequel les cellules A2 noradrénergiques projettent directement sur les neurones ocytocinergiques (Douglas et al., 2001). Durant la parturition, la NA libérée dans les NSO dépolarise les neurones ocytocinergiques *via* le récepteur $\alpha 1$ -noradrénergique, induisant la libération de l'OT. Ainsi un «*feedback-positif*» est établi entre l'utérus contracté et les neurones ocytocinergiques (Leng et al., 2005).

Au cours de la gestation, l'activité électrique des neurones ocytocinergiques augmente progressivement. La parturition est également accompagnée d'une augmentation de l'activité électrique de ces neurones qui commence environ quinze minutes avant les contractions abdominales. Chaque forte contraction puis l'expulsion de fœtus ou du placenta sont précédées par une décharge à haute fréquence de ces neurones. Pendant la lactation, les neurones ocytocinergiques réagissent toutes les cinq à quinze minutes à une tétée continue, par une décharge de potentiels d'action à haute fréquence. Cette décharge répétitive est responsable d'une libération massive d'OT qui provoque quelques secondes plus tard la contraction des cellules myoépithéliales des glandes mammaires et l'éjection du lait. Pendant la lactation, l'activité des neurones ocytocinergiques est synchrone non seulement dans chaque noyau, mais aussi entre les quatre

noyaux magnocellulaires (Lincoln et Wakerley, 1975 ; Belin et Moos, 1986 ; Theodosis, 2002 ; Lipschitz et al., 2005 ; Leng et al., 2005).

4. 2. La stimulation osmotique

Chez les Mammifères, l'OT fonctionne avec l'AVP dans le contrôle de l'osmolalité plasmatique. Les neurones ocytocinergiques tout comme les neurones AVP présentent des caractéristiques osmoresptrices. L'hyperosmolalité induit une activation électrique des neurones ocytocinergiques. L'OT secrétée en réponse à l'hyperosmolalité agit avec l'AVP au niveau du rein et stimule la natriurèse (Verbalis et al., 1991 ; Ozaki et al., 2004). Une administration intrapéritonéale de solution saline hypertonique induit l'activation des neurones ocytocinergiques, qui se manifeste par l'augmentation d'expression de c-fos dans le NSO et NPV (Pirnik et al., 2004). Elle induit également une augmentation des niveaux des ARNm codant pour l'OT dans les NSO et NPV, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de l'hormone dans le sang (Burbach et al., 1984 ; Lightman et Young 1987 ; Meister et al., 1990 ; Zingg et et al., 1986 ; Verbalis et al., 1991 ; Bourque et Chakfe, 2000 ; Bourque et al., 2002). Une hyperosmolalité chronique augmente le nombre de neurones co-exprimant l'AVP et l'OT (Kiyama et Emson 1990). De plus la queue poly (A) des ARNm-OT s'allonge de quelques centaines de résidus (Carter et Murphy 1989 ; Carter et Murphy 1991). En revanche, l'hypo-osmolalité n'a en aucun effet sur le niveau et la taille des ARNm OT (Svane et al., 1995).

4. 3. Les monoamines

a) la noradrénaline

La NA exerce un effet différent sur l'activation des neurones ocytocinergiques suivant sa concentration, ce qui est probablement lié à la mise en jeu des récepteurs différents. En effet, la NA semble stimuler la libération d'OT par le biais du récepteur α 1-adrénérique (Randle et al., 1986 ; Yamashita et al., 1987). Cependant, la NA est également capable d'inhiber la libération de l'OT via des récepteurs β -adrénériques (Willems et al., 1999).

Par ailleurs, l'activation des neurones ocytonergiques par la NA a été mise en évidence pendant la parturition et le réflexe d'éjection du lait lors de la tétée, via le groupe A2 du NTS (Buller et Day 1996 ; Luckman, 1995 ; Onaka et al., 1995 ; Rinaman et al., 1995 ; Theodosis, 2002 ; Russell et

al., 2003 ; Theodosios et al., 2004). Et enfin, la NA stimule l'expression et la synthèse de l'OT dans les noyaux NSO et NPV chez la souris (Vacher et al., 2002).

b) la sérotonine

De même que pour l'AVP, la 5-HT semble activer la libération d'OT dans la circulation générale. Un étude pharmacologique a rapporté que la 5-HT induit la sécrétion de l'OT via de récepteur 5-HT_{2A} (Saydoff et al., 1991). Par ailleurs, un effet activateur de la 5-HT sur l'expression et la synthèse de l'OT dans le NSO et le NPV a été montré puisque l'administration de pCPA (inhibiteur de la 5-HT) est associée à une diminution des niveaux d'OT et de son ARNm dans ces structures (Vacher et al., 2002).

4. 4. Autres facteurs

Il existe de nombreuses évidences de l'effet stimulateur de l'acétylcholine (ACh) sur la sécrétion d'OT chez les animaux allaitants ou non allaitants. En effet, l'ACh active la libération d'OT via des récepteurs présents sur les neurones magnocellulaires (Rotter et al., 1984).

Par ailleurs, des projections histaminergiques directes provenant des corps mammillaires peuvent inhiber les neurones ocytocinergiques via les récepteurs H₂ (Yang et Hatton 1994). Cependant l'administration intracérébroventriculaire d'histamine stimule l'expression d'OT (Kjaer et al., 1994b, c ; Kjaer et al., 1995). Ainsi, la déplétion centrale en histamine supprime l'augmentation de la concentration plasmatique d'OT en réponse à la lactation et à la déshydratation (Schagen et al., 1996 ; Kjaer et al., 1995). Les projections histaminergiques pourraient également être impliquées lors de la parturition (Luckman et Larsen., 1997) et de la lactation (Schagen et al., 1996).

L'OT libérée localement par les corps cellulaires et les dendrites pourrait être impliquée dans réorganisation structurale des neurones ocytocinergiques et dans les mécanismes liés à la synchronisation et la régulation de la sécrétion du peptide (Pow et Morris 1989 ; Ludwig et al., 1996 ; Ludwig 1998; Leng et al., 2005).

III. Neuropeptides et protéines co-localisées

Les neurones magnocellulaires vasopressinergiques et ocytocinergiques co-expriment différents peptides dont les niveaux d'expression peuvent varier selon les conditions physiologiques ou expérimentales. Des études morphologiques utilisant l'immunohistochimie et l'hybridation in situ ont montré que la dynorphine, le neuropeptide Y, le VIP et l'angiotensine II sont exprimés dans les neurones vasopressinergiques, tandis que le CRH, la *cholécystokinine* (CCK), la *thyrotropin releasing hormone* (TRH) et l'endothéline-1 sont préférentiellement exprimés dans les neurones ocytocinergiques. Par ailleurs, la galanine, la forme neuronale de la *nitric oxide synthase* (nNOS), et les enképhalines sont co-exprimés dans les deux types de neurones ocytocinergiques et vasopressinergiques (Xiao et al., 2005). Il a été suggéré que ces neuropeptides ont des effets modulateurs sur la sécrétion de l'AVP et de l'OT (Meister, 1993). Des études immunohistochimiques ont montré que les enképhalines et la dynorphine A étaient contenues dans les mêmes grains de sécrétion que l'AVP (Whitnall et al., 1983). De même, la dynorphine A pourrait inhiber sélectivement la sécrétion d'OT au niveau de la neurohypophyse (Bondy et al., 1988 ; Kiss and Mikkelsen, 2005). Le TRH quant à lui semble être un facteur stimulateur pour la sécrétion de l'AVP et l'OT dans les conditions normales de l'équilibre hydrominéral mais un facteur inhibiteur dans des conditions de stimulation osmotique (Ciosek 2002).

Quant à galanine, elle stimule la CCK dans les neurones OT, qui à son tour stimule la libération de l'AVP et l'OT (Bondy et al., 1989). Cependant, l'effet de la galanine sur la libération de l'OT et l'AVP semble être essentiellement inhibiteur (Landry et al., 1995 ; Gundlach et al., 2001), tandis que dans des conditions de déshydratation par boisson d'eau salée, la galanine induit une augmentation de niveau de l'AVP et l'OT dans l'hypothalamus et la neurohypophyse (Cisowska-Maciejewska et Ciosek, 2005).

La plasticité neurochimique et structurale du système hypothalamo-neurohypophysaire

Le système hypothalamo-neurohypophysaire est considéré comme un système particulièrement intéressant pour étudier la plasticité. En effet, ce système subit un remarquable changement à la fois neurochimique et morphologique lors de stimulations physiologiques telles que la déshydratation, la parturition et la lactation.

I. La plasticité neurochimique

Lors de stimulations physiologiques ou pharmacologiques des neurones magnocellulaires, l'expression des neuropeptides co-exprimés avec l'AVP et l'OT est profondément modifiée. En effet, des nouveaux neuropeptides, des enzymes de biosynthèse des neurotransmetteurs sont exprimés *de novo*, ce qui contribue en quelque sorte à modifier le langage du neurone. Une telle plasticité neurochimique a été mise en évidence pour la première fois lors de l'ontogenèse avec l'acquisition du phénotype cholinergique ou noradrénergique des neurones végétatifs de la crête neurale en fonction de leur environnement (Le Douarin, 1980). Cette plasticité a depuis été étendue à la vie adulte, en particulier grâce à l'étude du système hypothalamo-neurohypophysaire (Calas et al., 1994). Dans les neurones magnocellulaires, cette plasticité neurochimique est observée lors de la déshydratation, la parturition, la lactation, au cours du vieillissement et dans quelques modèles génétiques, tels que le rat Brattleboro et le rat Zucker.

Du point de vue des neuropeptides, on remarque une modification de l'expression d'AVP et d'OT dans les neurones magnocellulaires, par exemple : de 1 à 2% de neurones magnocellulaires co-expriment l'AVP et l'OT en situation contrôle, cependant on passe à 17% au deuxième jour de l'allaitement (Mezey et Kiss 1991). Par ailleurs, on observe une augmentation de l'expression de certains neuropeptides tels que la dynorphine dans les neurones AVP au cours de la déshydratation (Sherman et al., 1986), et l'expression de nouveaux neuropeptides comme la galanine dans les neurones OT au cours de l'allaitement (Landry et al., 1997). Enfin, une expression de la tyrosine hydroxylase (TH) est observée dans les neurones AVP. Cependant, cette TH ne conduit pas à la

synthèse de catécholamines et son rôle reste à déterminer (Young et al., 1987 ; Marsais et Calas 1999 ; Marsais et al., 2002).

Enfin, certaines régulations post-traductionnelles exercées sur l'expression de l'AVP et de l'OT lors des stimulations de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire, peuvent être classées dans la catégorie de la plasticité neurochimique. Ainsi, lors d'une déshydratation, la longueur de la queue poly (A) des ARNm codant l'AVP et l'OT augmente très rapidement. Par contre les ARNm des neuropeptides co-exprimés ne sont pas affectés (Carrazana et al., 1988).

II. La plasticité structurale

La plasticité de l'hypothalamus neuroendocrine ne se limite pas à des aspects neurochimique mais s'accompagne d'un remodelage structural, mettant en jeu à la fois les neurones magnocellulaires, les interneurons, les terminaisons des afférences des noyaux magnocellulaires et les cellules gliales (Hatton, 1997 ; El Majdoubi et al., 2000 ; Oliet et al., 2004).

1. Plasticité neuronale

Au cours de la lactation, les neurones ocytocinergiques subissent des modifications morphologiques qui augmentent le nombre de synapses qui les contactent. Ces modifications apparaissent dès les premières heures de stimulation et réversent lorsque la stimulation cesse. La manifestation la plus visible de cette plasticité synaptique est le changement du nombre de synapses qui contactent simultanément plusieurs éléments post-synaptiques dans le NSO. Ces synapses dénommées *partagées* sont observées entre des soma adjacents, entre des soma et des dendrites ou entre des dendrites adjacentes (Theodosis et al., 1986, Theodosis, 2002 ; Theodosis et al., 2004). L'analyse ultrastructurale des synapses *partagées* a démontré qu'il s'agissait principalement de synapses entre des interneurons, GABAergiques et glutamatergiques, et les neurones OT. Les afférences noradrénergiques sont aussi concernées par ce phénomène (Michaloudi et al., 1997 ; Theodosis et al., 2004).

Au cours de la déshydratation, le système hypothalamo-neurohypophysaire est le siège d'une plasticité similaire qui affecte non seulement les neurones OT, mais aussi les neurones AVP (Marzban et al., 1992 ; Miyata et al., 1994 ; Hatton, 1997). Les réarrangements neuronaux s'accompagnent d'une augmentation de la libération du glutamate et du GABA et d'une

Introduction

modification de l'expression de leurs récepteurs, *i.e* les récepteurs glutamatergiques NMDA, mGluRIII et les récepteurs GABA_A (Tasker et al., 2002).

Au cours de la déshydratation les neurones ocytocinergiques modifient également leurs appositions somatiques, alors que les neurones vasopressinergiques augmentent uniquement de taille (Theodosis et Poulain 1993, Theodosis, 2002).

Le remodelage synaptique s'accompagne d'une augmentation de la taille des neurones (Theodosis et Poulain, 1993). Ce remodelage pourrait avoir un effet spécifique qui pourrait modifier l'activité électrique, en particulier durant la lactation et plus généralement lors de la stimulation de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire. En effet, les neurones magnocellulaires ont une activité électrique à basse fréquence à l'état de repos. En condition de stimulation du système osmotique ou cardiovasculaire, les neurones AVP augmentent leur activité électrique, qui est phasique et asynchrone, il en résulte une libération soutenue d'AVP dans la circulation générale. L'activité électrique des neurones OT, quant à elle, augmente également (Hussy, 2002 ; Theodosis et al., 2006). Cependant, dans le cas de la parturition et de la lactation, les neurones OT se mettent à décharger de façon couplée et sous forme de bouffées de potentiel d'action à haute fréquence, induisant une libération pulsatile d'OT (Theodosis, 2002). L'absence d'apposition somatique pour les neurones AVP peut s'expliquer par le fait que ces neurones, lorsqu'ils sont activés, déchargent de façon asynchrone. Un couplage structural entre les somas n'est donc pas nécessaire.

2. Plasticité gliale

Durant des stimulations physiologiques chroniques, la couverture gliale est également modifiée : les pieds astrocytaires séparant les corps cellulaires ocytocinergiques se rétractent, permettant l'apposition de leurs membranes. Une des principales fonctions de l'astrocyte est de capter et de dégrader le glutamate et le GABA libérés lors de la transmission synaptique. La rétraction gliale a donc pour effet de diminuer le retrait du glutamate et du GABA des fentes synaptiques et augmente ainsi l'effet des terminaisons glutamatergiques et GABAergiques sur les neurones OT. Les astrocytes régulent également la concentration des neurotransmetteurs. Il a été montré que durant la lactation, la transmission synaptique dans le NSO est diminuée en comparaison aux rates vierges (Oliet et al., 2001). Ce phénomène s'explique par la diminution de la recapture du glutamate due à la rétraction des pieds astrocytaires apposés aux synapses. De plus, les astrocytes interviennent dans l'homéostasie de la concentration extracellulaire en ions. En effet, après le passage de l'influx nerveux, les astrocytes assurent le retrait des ions K⁺. Ainsi la

rétraction astrocytaire provoquée lors de la lactation entraîne une augmentation de la concentration extracellulaire des ions K^+ et augmente par conséquent l'excitabilité neuronale. La rétraction gliale dans le NSO s'accompagne d'une diminution spécifique et réversible de la GFAP. Une diminution de l'épaisseur de la glia limitante ventrale et une réorientation des prolongements astrocytaires qui deviennent perpendiculaires à la surface du cerveau sont observées (Salm, 2000). De plus, la rétractation des processus astrocytaires facilite l'action paracrine des neuropeptides libérés par un neurone sur ses voisins, ainsi que sur les terminaisons. Enfin, les astrocytes synthétisent et libèrent la taurine (un gliotransmetteur inhibiteur) qui inhibe l'activité des neurones magnocellulaires, via les récepteurs Glycine et $GABA_A$, et dont le rôle dans la signalisation de l'osmorégulation a été démontré (Hussy et al., 1997 ; Hussy et al., 2000 ; Hussy et al., 2001 ; Oliet, 2002 ; Theodosis, 2002). Ainsi, une fois encore, la diminution de la couverture gliale a pour conséquence d'augmenter l'excitabilité des neurones magnocellulaires (Langle et al., 2002).

III. Contrôle noradrénergique de la plasticité neuroendocrine

Comme nous l'avons déjà mentionné, les afférences noradrénergiques constituent les afférences modulatrices majeures du système hypothalamo-neurohypophysaire. Ces afférences monoaminergiques sont impliquées dans la régulation de la plasticité neurochimique et structurale de ce système. Des études immunohistochimiques et d'hybridation *in situ* montrent que les terminaisons noradrénergiques stimulent l'expression et la libération de l'AVP et de l'OT dans les noyaux NPV et NSO (Vacher et al. 2002). Cependant, les mécanismes précis de cette régulation ne sont pas encore bien élucidés. En effet, plusieurs facteurs moléculaires et/ou cellulaires pourraient être impliqués dans cette régulation.

En effet, la NA pourrait agir directement par le biais de ses récepteurs qui sont exprimés dans les noyaux magnocellulaires. Une action indirecte de la NA peut être envisageable ; elle impliquerait des interactions cellulaires qui permettraient de relayer ou de régler l'effet de la NA sur l'expression de l'AVP et de l'OT par les neurones magnocellulaires. Ces effets indirects peuvent notamment impliquer des molécules telles que le glutamate, le GABA, le NO et les molécules de la matrice extracellulaire (MEC).

1. Voie glutamatergique de l'innervation noradrénergique

Des études pharmacologiques et électrophysiologique ont montré que le glutamate est un neurotransmetteur excitateur important dans l'hypothalamus (Meeker et al., 1993; Van den Pol et al., 1990). Le glutamate agit via les récepteurs ionotropique NMDA et non NMDA (AMPA), et qui sont exprimés sur les neurones magnocellulaires (Al-Ghoul et al., 1997 ; Armstrong et al., 1997 ;Gribkoff, 1991 ; Hattori et al., 1998). Daftary et ces collègues (1998) ont suggéré l'existence d'interneurones glutamatergiques relayant le contrôle noradrénergique de la libération d'AVP et d'OT par les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus, via le récepteur α -1 adrénergique. Par ailleurs, il semble que la NA puisse régler la libération de glutamate dans les NSO et NPV en agissant sur les terminaisons pré-synaptiques via des récepteurs pré-synaptiques α -1 et α -2 (Boudaba et Tasker 2003).

Les synapses glutamatergiques représentent 25% des synapses impliquant les neurones magnocellulaires vasopressinergiques et ocytocinergiques en condition normale (El Majdoubi et al., 1996 ; El Majdoubi et al., 1997 ; Meeker et al., 1993; Theodosis, 2002). Cette proportion augmente chez les femelles allaitantes pour atteindre la valeur de 30% dans le NSO (Stern et al., 2000). Les niveaux de glutamate augmentent fortement dans le NSO juste avant la parturition et diminuent avant la fin de l'accouchement (Herbison et al., 1997). De plus, l'injection intracérébroventriculaire d'un antagoniste de récepteur glutamatergique inhibe le réflexe d'OT pendant la tétée (Parker et Crowley 1993). Ces variations sont parallèles à celles des niveaux de NA dans le NSO et d'OT dans le sang (Herbison et al., 1997 ; Theodosis 2002). Par ailleurs, les deux systèmes apparaissent très importants pour le réflexe d'éjection du lait en réponse à la tétée (Parker et Crowley 1993). Ainsi une augmentation parallèle du nombre de synapses au glutamate et à la NA sur les neurones OT a été mis en évidence pendant la lactation (El Majdoubi et al., 1996 ; Michloudi et al., 1997). Chez la rate allaitante la sécrétion de l'OT peut être stimulée par un agoniste du récepteur α -adrénergique ou un agoniste du récepteur AMPA. Enfin, l'utilisation d'un antagoniste contre l'un ou l'autre récepteur (récepteur noradrénergique ou Glutamatergique) bloque la libération de l'OT.

En ce qui concerne la déshydratation, il a été mis en évidence une augmentation parallèle de nombre des synapses glutamatergiques et noradrénergiques (Meeker et al., 1994 ; Di et Tasker, 2004).

2. Voie GABAergique de l'innervation noradrénergique

Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur prédominant dans l'hypothalamus : approximativement 40% de synapses sont des synapses GABAergiques (El Majdoubi et al., 2000 ; Oliet et Piet 2004) et ce pourcentage augmente chez la femelle allaitante (Theodosios et al., 1995. El Majdoubi et al., 1997). Un effet indirect de la NA sur l'activité des neurones vasopressinergiques et ocytocinergiques *via* les neurones GABAergiques a été mis en évidence. En premier lieu, Wang et ses collègues (1998) ont montré que la NA pouvait inhiber la libération de GABA dans le NSO via les récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques. Une telle interaction entre les deux neurotransmetteurs a été aussi mise en évidence d'une part, dans l'hypothalamus médio-basal en cas d'hypoglycémie (Beverly et al., 2001), et d'autre part, dans le NSO durant la déshydratation chronique (Di et Tasker, 2004).

Par ailleurs, l'implication de ce neurotransmetteur dans l'inhibition de l'activité des neurones magnocellulaires a été largement démontrée (pour revue, Renaud et Bourque 1991). Il été suggéré que le GABA pouvait inhiber la libération d'AVP et d'OT par les neurones magnocellulaires (Poulain et Wakerley 1982). L'action du GABA implique des récepteurs post-synaptiques GABA_A et pré-synaptiques GABA_B. Des injections intracérébroventriculaires ou des microinfusions directes au niveau du NSO, de muscimol (agoniste) et de bicuculine (antagoniste), des récepteurs GABA_A inhibent l'activité basale des neurones vasopressinergiques et ocytocinergiques et le réflexe d'éjection du lait lors de la tétée (Moos 1995 ; Voisin et al., 1995). Ces récepteurs sont exprimés par les neurones AVP et OT du NSO et NPV (Fenelon et al., 1995). Du plus, les récepteurs GABA_B sont localisés au niveau des terminaisons glutamatergiques et GABAergiques du NSO et ces récepteurs pourraient être impliqués à la fois dans l'excitation glutamatergique et l'inhibition GABAergique sur les neurones magnocellulaires (Ibrahim et al., 1998 ; Kombian et al., 1996).

3. Implication du monoxyde d'azote (NO)

Dans ce travail, nous avons plus particulièrement porté notre attention tout d'abord sur l'implication du NO dans la voie de signalisation de la régulation d'AVP et OT par la NA, car cette voie est stimulée à la fois par le glutamate et la NA et modulée par le GABA (Srisawat et al., 2000, Grange-Messent et al., 2004). De plus, le NO joue un rôle important dans le contrôle de l'activité des neurones magnocellulaires (Kadekaro, 2004).

Le monoxyde d'azote

II. Le monoxyde d'azote (NO) : synthèse et mécanisme d'action

Le NO est un neuromédiateur gazeux inorganique de demi-vie très courte (6-30s) capable de diffuser à travers la membrane des cellules. Le NO possède des propriétés de messenger inter- et intracellulaire (Bredt et Snyder 1992 ; Lowenstein et Snyder 1992). Il est produit par des NO synthases (NOS) à partir de L-arginine et d'oxygène et cette réaction utilise un co-substrat : le Nicotinamide-Adénine Dinucléotide- Phosphate (NADPH) (Moncada and all., 1991; Knowles and Moncada 1994; Moncada et Higgs 1993). La NOS catalysant cette réaction existe sous trois isoformes : neuronale (nNOS), endothéliale (eNOS) et inducible (iNOS). Chacune de ces trois isoformes possède ses propres caractéristiques en terme de distribution cellulaire et mode de fonctionnement. Les formes neuronale et endothéliale, respectivement localisées dans les neurones et les cellules endothéliales, sont constitutives et calcium-dépendantes (Moncada et al., 1991 ; Knowles et Moncada, 1994. Gotti et al., 2005), tandis que la iNOS est exprimée dans de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les neutrophiles, ainsi que dans les cellules gliales et les neurones, et son activation est calcium-indépendante (Knowles et Moncada, 1994 ; Murphy et al., 1993 ; Kilbourn et Belloni 1990 ; Olivenza et al., 2000).

Les trois isoformes de la NOS possèdent des domaines de liaison à son co-substrat le NADPH et également un domaine de liaison pour la calmoduline. La liaison de la calmoduline à l'enzyme, essentielle pour son activité, est induite par le calcium pour les NOS constitutives. Les nNOS et eNOS produisent du NO de manière intermittente lors d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. La iNOS est normalement absente dans les cellules mais son activité est induite par certains stimuli comme les endotoxines et les cytokines. L'activité catalytique de la iNOS n'est pas dépendante du calcium car l'enzyme est liée à la calmoduline de manière stable, et par conséquent cette enzyme est continuellement activée et produit une large quantité de NO lorsqu'elle est exprimée (Nathan, 1997). Le NO atteint ses cibles cellulaires en diffusant dans l'environnement proche à une distance maximale de quelques centaines de microns (De Vente et al., 1998).

Contrairement aux neurotransmetteurs, le NO n'est pas stocké dans des vésicules synaptiques, ni libéré par exocytose, mais diffuse rapidement à travers les membranes, franchit l'espace interneuronal et pénètre dans les cellules voisines. Dans le système nerveux central, le NO opère

Introduction

principalement en activant une enzyme largement distribuée, la guanylate cyclase soluble (GCs) (Murphy, 2000). Le NO est capable de se lier au site hémique de la GCs induisant un changement de la conformation de l'enzyme qui active son activité catalytique, conduisant à une production de GMPc dans le cytosol (Knowles et al., 1989 ; Murad, 1994 ; Pfeilschifter, 2000), (Figure 5).

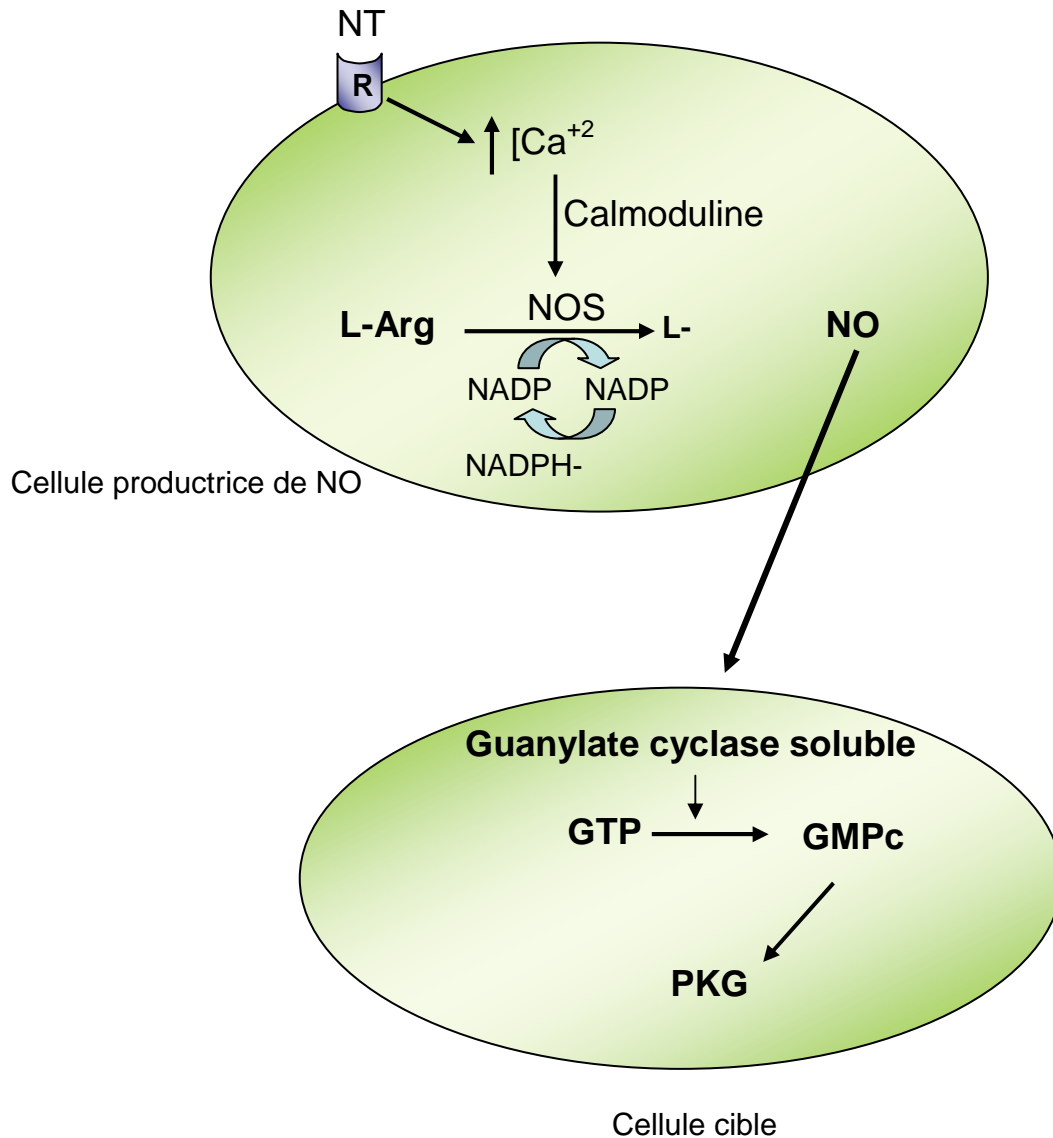


Figure 5: La voie de NO/GMPc

GMPc: Guanosine Monophosphate cyclique; NO: monoxyde d'azote; NOS: NO Synthase; NT: Neurotransmetteur; PKG: Protéine Kinase dépendante du GMPc; R:

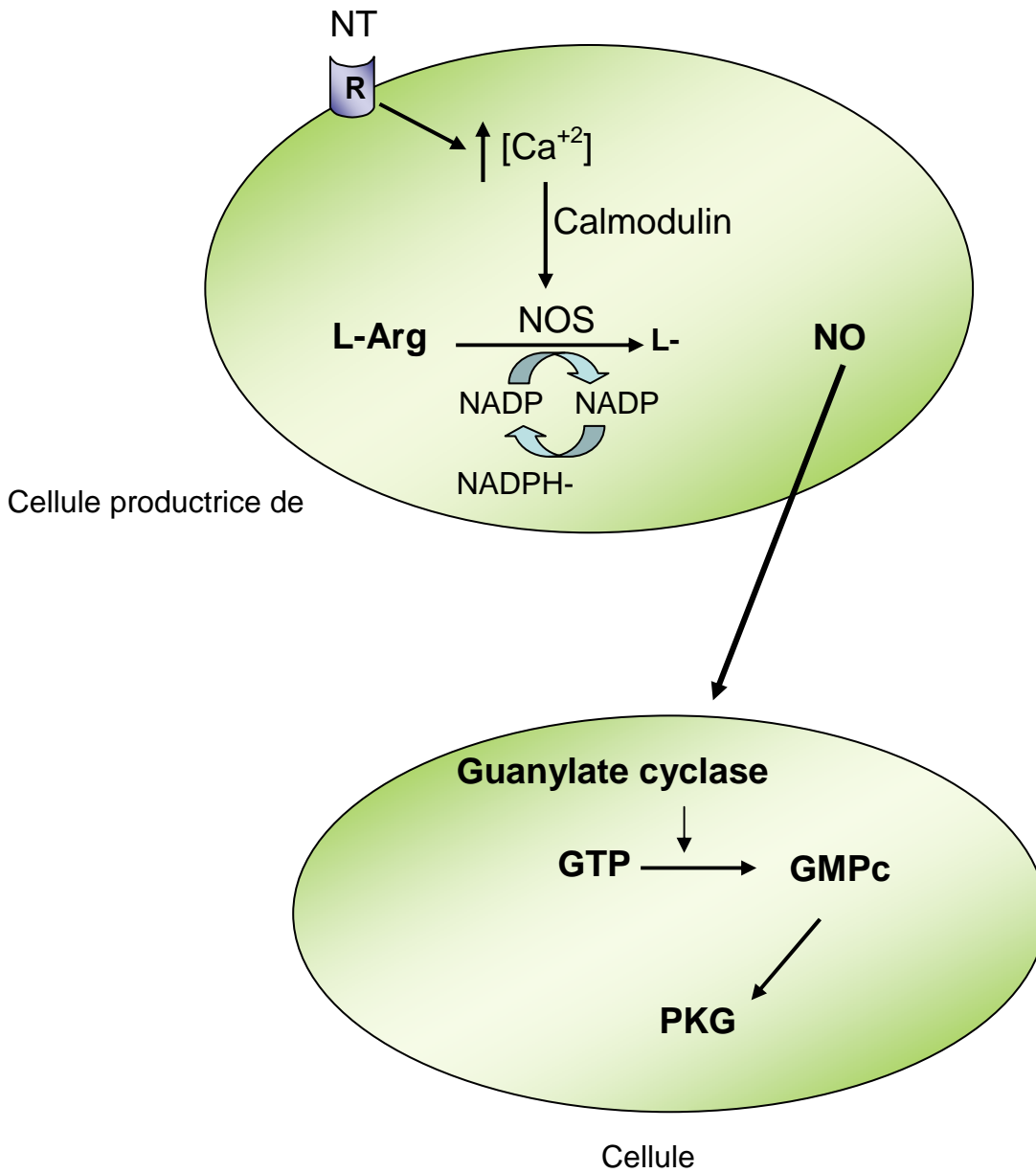


Figure 5: La voie de NO/GMPc

GMPc: Guanosine Monophosphate cyclique; NO: monoxyde d'azote; NOS: NO Synthase; NT: Neurotransmetteur; PKG: Protéine Kinase dépendante du GMPc; R:

II. Rôles biologiques du NO

Les caractéristiques chimiques générales du NO lui confèrent une grande versatilité dans les systèmes biologiques. Le NO peut agir soit comme une molécule régulatrice, soit comme une molécule toxique (Bishop et Anderson 2005).

A faible concentration, dans des conditions normales non pathologiques, le NO pourrait être impliqué dans les effets produits par les acides aminés excitateurs tels que le glutamate. En effet dans le système nerveux central, le NO dont la production est déclenchée par l'augmentation du calcium cytosolique qui suit l'activation des récepteurs au glutamate, pourrait jouer un rôle dans l'apprentissage et la mémoire (Christopherson et Bredt 1997). L'inhibition de la synthèse du NO empêche l'apparition de la potentialisation à long terme, observée dans l'hippocampe, et celle de la dépression à long terme dans le cervelet (Schuman et Madison 1994 ; Shibuki et Okada 1991). Outre ses éventuelles fonctions dans la régulation des synapses excitatrices du SNC, le NO semble participer à des nombreuses autres actions parmi lesquelles, par exemple : l'établissement des connections neuronales au cours du développement embryonnaire (synaptogenèse des projections rétino-tectales) et la modulation de la libération de certaines hormones hypothalamo-hypophysaires (pour revue voir Szabo, 1996).

Lorsque le NO est produit en forte quantité dans des conditions pathologiques, il pourrait jouer alors un rôle clef dans les mécanismes d'excitotoxicité. L'effet neurotoxique est associé à une activation prolongée des récepteurs du glutamate, et en effet, l'accumulation intracellulaire de calcium conduit à l'activation de plusieurs enzymes dont la NOS. Le NO en forte quantité est associé à diverses pathologies telles que : l'ischémie cérébrale, l'impuissance sexuelle masculine, la maladie de Parkinson, la Chorée de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, le choc septique et certains cancers (Christopherson et Bredt, 1997 ; Brenman et al., 1995 ; Moro et al., 2004).

III. Implication du NO dans la biologie cellulaire des noyaux magnocellulaires

La détection immunohistochimique des NOS et l'utilisation de l'activité NADPH-diaphorase associée à la NOS sont à l'origine de plusieurs travaux montrant que les NOS sont largement distribuées dans le système nerveux central (Bredt et al., 1990 ; Vincent et Kimura 1992). En particulier, la nNOS est fortement exprimée dans les neurones magnocellulaires

Introduction

vasopressinergiques et ocytocinergiques des NPV et NSO (Arevalo et al., 1992 ; Bredt et al., 1991; Miyagawa et al., 1994 ; Hatakeyama et al., 1996 ; Gonzalez-Hernandez et al., 2006 ; Yu et al., 2006). Par ailleurs, les neurones magnocellulaires des NPV et NSO sont riches en sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ de la sGC, qui sont fortement synthétisées dans ces noyaux (Furuyama et al., 1993 ; Koesling et Friebe 1999 ; Koesling et al., 2004 ; Kadekaro, 2004). Les stimulations osmotiques telles que la déshydratation ou la prise de boisson salée sont associées à une augmentation de l'expression et de l'activité de NOS par les neurones magnocellulaires ainsi qu'une augmentation de l'activité de NADPH-diaphorase (Kadowaki et al., 1994 ; Villar et al., 1994 ; Ueta et al., 1995). Ainsi, l'activité de la NOS augmente par les mêmes stimuli que l'expression d'AVP et OT (Villar et al., 1994). Plusieurs études ont démontré la participation de NO dans des activités neurosécrétoires, cependant, il existe toujours une controverse au sujet de la modulation nitreurgique de l'expression d'AVP et d'OT.

La matrice extracellulaire et les métalloprotéinases

Dans le SNC, les interactions des cellules neuronales et gliales avec la matrice extracellulaire (MEC) permettent la migration cellulaire, la différenciation, le guidage axonal, la formation des synapses et la stabilité du réseau neuronal (Reichardt et Tomaselli, 1991 ; Wright et al., 2002). La MEC est un dépôt de diverses molécules sécrétées et immobilisées en dehors de la cellule. Elle est composée de collagènes, des glycoprotéines non-collagéniques et des protéoglycans comme la fibronectine, la laminine, la ténascine, le phosphocane, le brevicane, et le collagène de type IV (Fields et Itoh 1996 ; Goldbrunner et al., 1998. Wright et al., 2002).

Les protéines de la MEC peuvent interagir entre elles, mais aussi avec des molécules d'adhérence comme la NCAM (neural cell adhesion molecule) ou des facteurs de croissance. Les principaux récepteurs des molécules de la MEC sont les intégrines (Hemler, 1990). Il s'agit d'une famille de protéines transmembranaires composée de deux sous-unités, α et β , qui possèdent des sites de liaisons pour les différentes molécules de la MEC (Stupack et Cheresch 2002). Les intégrines permettent d'établir un lien moléculaire entre le cytosquelette et la MEC, et stabilisent ainsi l'adhérence cellule-matrice (Martin et al., 2002).

La protéolyse de la MEC induit un remodelage de ce réseau extracellulaire, l'élimination ou l'assemblage de ses composants, la libération de fragments bioactifs et de facteurs de croissances (Nagase et Woessner, 1999). La libération de ces molécules permet à la cellule de répondre rapidement aux changements de son micro-environnement, comme cela est le cas lors de la néo-vascularisation et de la réparation tissulaire (Change et Werb 2001). Les protéases intervenant dans le remodelage de la MEC sont les **métalloprotéinases** (MMPs, Van den Steen et al., 2001).

Dans le système hypothalamo-hypophysaire, les neurones et les cellules gliales maintiennent une expression d'un certain nombre de molécules dites « juvéniles » qui favorisent des changements morphologiques, dont les molécules de la MEC (Theodosis et al., 2004). Comme nous le soulignons précédemment, les MMPs régulent la fonction de ces molécules et dans ce contexte l'une des questions à laquelle nous souhaitons répondre est de déterminer si ces enzymes peuvent participer à la plasticité du système hypothalamo-post hypophysaire.

Les MMPs sont des enzymes de dégradation, zinc-dépendantes, sécrétées ou membranaires, capables de cliver soit les constituants de la MEC, soit des molécules solubles ou membranaires

Introduction

impliquées dans la transmission des signaux intercellulaires tels que, les cytokines, les chimiokines, les facteurs trophiques, les protéines d'adhésion et différents récepteurs. Les MMPs se répartissent en 4 grandes sous-familles, dont : les collagénases, qui clivent les fibres collagènes, les gélatinases, les stromélysines (MMP3), et des MMP spécifiques d'un type de membrane (TM-MMP), (Campbell et Pagenstecher, 1999 ; Rivera et al., 2004), (tableau 1). L'activité des MMPs est inhibée par des antagonistes endogènes appelés TIMP (tissu inhibitor of metalloproteinases)

Tableau 1 : Classification des métalloprotéinases

Sous-groupes	MMP	Autre appellation	Substrats
Gélatinases	MMP-2	Gélatinase A	Collagène IV, V, VII, X,
		72 kDa Gélatinase	gélatine
	MMP-9	Gélatinase B	Fibronectine, élastine
Collagénases	MMP-1	Collagénase interstitielle	Collagène I,II,III,VII,X,
		Collagénase fibroblastique	MMP-5, entactine
	MMP-8	Collagénase neutrophilique	Collagène I, II
		PMNL Collagénase	
MMP-13	Collagénase-3	Collagène I	
Stromélysines	MMP-3	Stromélysine-1	Coll III,IV,IX,X, Gélatine,
		Transine-1	Laminine, Fibronectine
	MMP-7	PUMP-1, Matrilysine	Elastine, Caséine
			Caséine, Fibronectine, Gélatine
	MMP-10	Stromélysine-2	Collagène II,IV,V,
			Transine-2
MMP-11	Stromélysine-3	Collagène IV	
MMP-12	Métalloélastase	Elastine, Fibronectine	
Liaisons membranaires	MMP-14	MT1-MMP, MMP-X1	MMP-2
	MMP-15	MT2-MMP	
	MMP-16	MT3-MMP	MMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	MMP-2

I. Structure et régulation de l'activité des MMPs

Les MMP forment une famille structurellement homologue. Toutes ces enzymes ont en commun trois domaines, le pro-peptide, le domaine catalytique, et le domaine hemopexine-like C-terminal, qui se lie au domaine catalytique par une région flexible dénommé l'*hinge region* (Yong et al., 1998; Wright et al., 2002). En général les MMPs contiennent un peptide signal.

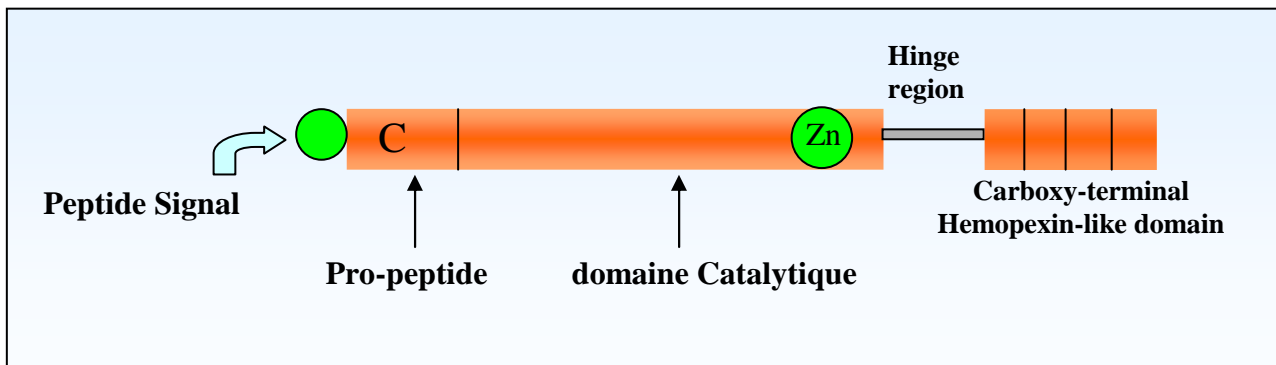


Figure 6 : structure des MMPs d'après de (Wright et al., 2002).

La régulation de l'activité des MMPs est strictement contrôlée à trois niveaux : la transcription du gène, l'activation de la pro-enzyme et l'activité des inhibiteurs des MMP, les TIMP (Sternlicht et Werb, 2001 ; Yong et al., 2001; Wright et Harding, 2004). La plupart des MMPs ne sont pas exprimées de manière constitutive. En effet, leur transcription est stimulée par différentes molécules telles que les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance, les chémokines, les oncogènes, mais également par des interactions de type cellule-cellule ou cellules-MEC (Yong, 1999 ; Nagase et Woessner 1999).

La modification post-traductionnelle constitue le deuxième niveau de régulation. La plupart des MMPs sont exprimée sous forme *zymogène*, qui correspond à la forme inactive de l'enzyme. Cette forme présente un résidu cystéine localisé dans la région pro-peptide, qui lie l'ion zinc de la région catalytique (Figure 6). De nombreux facteurs incluant notamment la cascade plasminogène-plasmine ainsi que certaines MMPs permettent de rompre l'interaction entre le résidu cystéine et l'ion zinc. Ce processus appelé le « *cystein switch* » provoque la suppression du pro-peptide et ainsi l'activation des MMPs (Nagase, 1997, Strenlicht et Werb 2001).

Enfin, le troisième niveau de régulation des MMPs est constitué par l'interaction de la forme active ou inactive des MMPs avec leurs inhibiteurs, les TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) qui sont au nombre de quatre TIMP (1, 2, 3, et 4), Ils inhibent l'activité des

MMPs en se liant au domaine catalytique soit de la forme *zymogène* soit de la forme active (Edwards, 2000 ; Woessner et Nagasse 2000).

II. Fonction des MMPs

En plus des protéines de la MEC telles que le collagène et la fibrine, les MMPs peuvent cliver et dégrader des chimiokines, des facteurs de croissance, des récepteurs des facteurs de croissance, des molécules d'adhérence et des médiateurs apoptotiques (Quaranta, 2000).

Les MMPs sont impliquées dans de nombreux processus biologiques qui sont considérés comme bénéfiques tels que l'angiogenèse, l'implantation du blastocyte, l'ovulation et la cicatrisation des blessures (pour revue, Ennis et Matrisian, 1994 ; Kahari et Saarialho-Kere 1997 ; Yong et al., 1998 ; Wright et Harding, 2004). Les MMPs sont aussi impliquées dans la croissance dendro-axonique et la plasticité neuronale. Par exemple, elles participent à la croissance neuritique, à l'axogenèse, au guidage des cônes de croissance dans l'environnement matriciel, au cours du développement ou dans la plasticité réactive (Rivera et al., 2004). De plus, les MMPs peuvent jouer un rôle protecteur lorsqu'elles modifient l'activité biologique de molécules qui engagent les cellules dans des voies apoptotiques. A ce titre, les effets neurotoxiques du peptide β -amyloïde peuvent être inhibés ou potentialisés selon que le ligand de Fas (FasL), qui induit la mort cellulaire par apoptose après l'interaction avec Fas, est clivé ou non par des MMPs (Ethell et al., 2002).

Malgré cela, les MMPs sont aussi impliquées dans des nombreuses maladies du système nerveux central telles que la maladie d'Alzheimer (Gottschall et Deb, 1996 ; Lim et al., 1997 ; Yoshiyama et al., 2000 ; Crocker et al., 2004) et la sclérose en plaque (Rosenberg, 2002 ; Sobel, 1998 ; Vos et al., 2003 ; Yong et al., 1998). Plusieurs évidences indiquent que les MMPs sont essentielles à l'invasion tumorale (Goldbrunner et al., 1998 ; Kaczmarek et al., 2002 ; Fang et al., 2003). Les MMPs sont aussi activées lors du stress induit par les ultraviolets (Yang et al., 2002), et en cas de traumatismes cérébraux, ou d'ischémie cérébrale (Lo et al., 2002 ; Muir et al., 2002 ; Yong et al., 1998, 2001 ; Zhang et al., 2003).

III. Les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMP)

Comme nous l'avons souligné précédemment, les MMPs sont inhibées par les TIMP, qui sont des glycoprotéines. TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-4 sont secrétées, alors que TIMP-3 est associée à la MEC par un glycosaminoglycane (Yu et al., 2000, Crocker et al., 2004). L'activité inhibitrice des TIMPs est liée à leur extrémité N-terminale (Kai et al., 2002), (Tableau 2).

IV. Les MMPs dans le SNC intact et lésé

Le cerveau adulte intact exprime faiblement les MMPs (Yong et al., 2001). Néanmoins on détecte certaines d'entre elles dont les MMP2 et MMP9 (Vecil et al., 2000 ; Vaillant et al., 1999; Szklarczyk et al., 2002). En effet, deux structures cérébrales, l'hippocampe et le cervelet, expriment fortement les MMPs. L'ARNm et la protéine MMP9 sont détectés dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe et du gyrus denté chez l'homme (Backstrom et al., 1996). Par ailleurs, Szklarczyk et al. (2002) ont montré que l'expression de la MMP2 dans l'hippocampe est essentiellement d'origine gliale contrairement à la MMP9. Il a été montré que la MMP2 est exprimée en grande quantité par les cellules de Purkinje et les neurones granulaires du cervelet de rat adulte alors que l'expression de la MMP9 est plus restreinte dans ces cellules (Vaillant et al., 1999). En revanche, dans le cervelet de rat âgé de 15 jours, âge auquel une forte synaptogenèse est encore observée, on détecte une forte expression de la MMP9 (Vaillant et al., 1999).

On observe une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine MMP9 lors de lésions excitotoxiques induites par le kaïnate dans la couche dendritique et les corps cellulaires des neurones du gyrus dentate (Szklarczyk et al., 2002). Après des lésions mécaniques de cerveau et de la moelle épinière, les MMP2 et MMP9 sont exprimées et notamment produites par les cellules microgliales et les astrocytes (Jaworski, 2000 ; Duchossoy et al., 2001 ; Muir et al., 2002). L'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation de l'expression des MMPs pourrait être impliquée dans la plasticité du SNC qui se manifeste de manière physiologique ou pathologique.

Bien que la localisation et l'expression de MMP2 et de MMP9 soient bien démontrées dans l'hippocampe et le cervelet, jusqu'ici aucune étude n'a démontré la présence de ces protéines dans le système hypothalamo-neurohypophysaire. Par la mesure où ce système subit des plasticités aussi bien neurochimiques que structurales, cela nous a donc conduit à déterminer si la MMP2 et la MMP9 peuvent être impliquées dans la plasticité de l'axe hypothalamus-neurohypophysaire régulée par la noradrénaline.

Tableau 2 : Caractéristique des TIMP chez les Mammifères

	Pois moléculaire (kDa)	Localisation extracellulaire
TIMP-1	28.5	secrétée
TIMP-2	21	secrétée
TIMP-3	24	membranaire
TIMP-4	23	secrétée

But du travail et modèle

But du travail et modèle

I. But du travail

Les résultats obtenus par notre équipe et par d'autres groupes montrent que les terminaisons noradrénergiques stimulent l'expression, et la libération de la vasopressine et de l'ocytocine dans les noyaux NPV et NSO. Mais les mécanismes précis de cette régulation ne sont pas encore bien élucidés. En effet, plusieurs facteurs moléculaires ou cellulaires pourraient être impliqués dans cette régulation.

Le contrôle de la NA sur l'expression des peptides de l'hypothalamus neuroendocrine (AVP et OT) peut s'exercer par l'intermédiaire de ses récepteurs présents dans le NSO. Cependant, les afférences ne contactent pas seulement les neurones peptidergiques eux-mêmes mais interagissent avec les autres populations cellulaires présentes dans ces noyaux, en particulier des interneurones glutamatergiques et GABAergiques. Ainsi, dans le NSO, plusieurs études ont montré que l'effet de la NA pouvait s'exercer à la fois directement mais aussi indirectement sur les neurones AVP et OT (Vacher et al. 2003).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au **monoxyde d'azote (NO)**. Les études de la distribution de la nNOS dans le système nerveux central ont montré que celle-ci est exprimée dans les neurones AVP et OT des NSO et NPV chez le rat et que son activité est influencée par le GABA et le glutamate environnant (Srisawat et al., 2000). De plus, notre équipe a démontré que la NA augmente l'expression et l'activité de NOS chez le rat (Grange-Messent et al., 2004). Par ce fait, le NO pourrait être une des voies de signalisation impliquées dans la régulation exercée par la NA. La première partie de ce travail a été consacrée à la question suivante : **Le NO est-il impliqué dans la voie de régulation noradrénergique de l'expression de l'AVP et de l'OT ?**

La plasticité de l'hypothalamus neuroendocrine ne se limite pas à des aspects neurochimiques mais s'accompagne d'un remodelage structural, mettant en jeu à la fois les cellules gliales environnantes, la matrice extracellulaire et les molécules d'adhésion. Une étude de notre équipe montre un remaniement astrocytaire sous l'effet des afférences monoaminergiques. Les résultats suggèrent que les monoamines sont capables de modifier le cytosquelette des astrocytes dans le NSO et le NPV. Elles pourraient agir directement *via* leurs récepteurs présents à la surface des astrocytes, ou pourraient également agir de manière indirecte, puisque l'activité des astrocytes peut aussi être modulée par les interneurones, glutamatergiques et GABAergiques, et par le NO (Vacher et al., 2003).

But du travail et modèle

Ces changements morphologiques des noyaux magnocellulaires apparaissant lors des stimulations physiologiques ne se limitent pas aux astrocytes et aux neurones mais affectent également la matrice extracellulaire permettant les réarrangements et la cohésion des cellules entre elles. La matrice extracellulaire n'exerce pas seulement un rôle morphologique mais aussi un rôle fonctionnel : par exemple, les métalloprotéinases, enzymes réglant l'activité biologique des molécules de la matrice, peuvent dégrader les neuropeptides, notamment la galanine (Jureus et al., 1998) et les protéines membranaires comme le β -dystroglycane (Kaczmarek et al. 2002 ; Zhong et al., 2006). D'autre part elles interagissent avec des facteurs trophiques, indispensables à la survie neuronale ou à la morphogénèse. De tels phénomènes se produisent au cours du développement du système nerveux central.

En se basant sur ces informations, nous avons recherché : *Si les MMPs sont impliquées dans la plasticité structurale durant la plasticité induite par la NA dans le NSO*

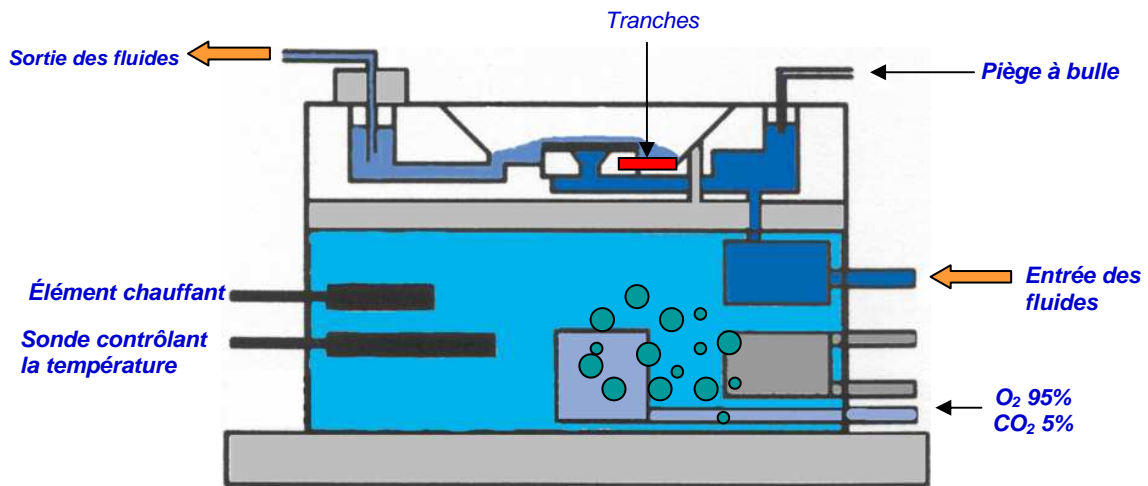
II. Modèles et techniques utilisés

1. Modèle expérimental

Le modèle expérimental utilisé est un modèle *ex-vivo* de tranches d'hypothalamus maintenues en survie dans différentes conditions pharmacologiques. Cette méthode permet de contrôler l'environnement en ions, en neurotransmetteurs ou en hormones des cellules étudiées tout en préservant les interactions cellulaires locales (réseaux neuronaux, interactions neurones-glie).

Des tranches coronales d'hypothalamus de 400 μ m d'épaisseur contenant les NSO sont maintenues en survie dans une chambre d'incubation pendant quelques heures (Figure 7). Ces tranches sont obtenues à partir des souris mâles C3H âgées de 6 semaines. Ces tranches ont subi des traitements pharmacologiques pendant 1h ou 4h en présence de noradrénaline (NA 10^{-4} M), de L-arginine méthyl ester (L-NAME 3 μ M, inhibiteur de NO), de sodium nitroprusside (SNP 0.1mM, donneur de NO), d'EGTA (1mM, chélateur du Ca^{+2}), ou de phénanthroline (1mM, inhibiteur des MMPs).

But du travail et modèle



Composition du liquide cérébro-spinal artificiel (Shoji et al., 1991):

NaCl 117mM; KCl 4.7mM; NaH₂PO₄ 1.2mM; NaHCO₃ 25mM; CaCl₂ · 2H₂O 2.5mM; MgCl₂ · 6H₂O 1.2mM;

Figure 7: Schéma de la chambre d'incubation pour le maintien des tranches de cerveau en survie

But du travail et modèle

2. Techniques :

2. 1. Immunohistochimie

Les marqueurs neurochimiques ont été détectés par simple ou double immunofluorescence. Cette technique repose sur la reconnaissance des molécules endogènes que l'on cherche à détecter par des anticorps spécifiques dits premiers anticorps. Les complexes immuns ainsi formés sont mis en évidence par des anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines de l'espèce ayant produit les premiers anticorps. Nous avons utilisé deux types d'anticorps secondaires : des anticorps couplés de manière covalente à des marqueurs fluorescents (FITC ou CY3), ou des anticorps biotinylés. L'emploi de ces derniers permet d'amplifier le signal immunohistochimique et ils sont révélés par leur liaison avec une streptavidine fluorescente. Les complexes formés sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence.

2. 2. Dosages immunoenzymatiques (EIA)

Les dosages EIA appartiennent à la famille des dosages par compétition. Ils nécessitent la mise en jeu de trois composants : un anticorps, un antigène marqué (traceur), et un antigène non marqué (qui est celui dont on recherche la concentration). Le traceur et l'antigène non marqué sont capables de se lier aux mêmes sites anticorps et de ce fait, peuvent entrer en compétition si la concentration des sites anticorps est limitée. Les traceurs sont couplés à une enzyme, l'acétylcholine estérase (AChE), et cette enzyme est détectée avec le réactif d'Ellman, constitué d'acétylthiocholine, un pseudo substrat de l'AChE, et de DTNB (acide 5,5 dithiobisnitrobenzoïque). L'hydrolyse de l'acétylthiocholine, catalysée par l'AChE, induit la production de thiocholine qui réagit avec le DTNB oxydé et entraîne la formation de DTNB réduit. Ce dernier est un chromophore soluble qui absorbe fortement dans les longueurs d'onde visibles (414nm) en produisant une couleur jaune.

Après décapitation, les cerveaux sont prélevés immédiatement, et des coupes épaisses d'hypothalamus (400µm) sont préparées à l'aide d'un vibroslice. Après les traitements pharmacologiques, les NSO bilatéraux sont prélevés, à l'aide d'une aiguille creuse de 200µm de diamètre. La fraction peptidique des échantillons est extraite, les surnageants sont séchés à l'aide d'un Speed Vac puis les résidus secs sont repris dans un approprié (tampon EIA). La concentration en protéines pour chaque échantillon est déterminée par le dosage des protéines totales.

Pour déterminer les contenus en AVP et OT par dosage EIA, les anticorps anti-AVP et anti-OT de lapin sont dilués respectivement au 1/5000, 1/10000 (Vacher et al., 2002). La phase solide

But du travail et modèle

est réalisée dans des plaques de 96 puits, recouvertes d'anticorps monoclonaux de souris anti-IgG de lapin permettant de fixer les anticorps anti-AVP ou anti-OT. Chacune des solutions composant la phase liquide (peptide standard, échantillon, traceur, et antiserum de lapin dirigé contre l'OT et l'AVP) est ajoutée dans les puits. Après incubation pendant une nuit à 4°C, l'activité enzymatique des complexes liés à la phase solide est révélée par addition de réactif d'Ellman.

2. 3. Histochimie de la NADPH-diaphorase

Cette technique histochimique permet de localiser spécifiquement les structures qui présentent une activité NOS constitutive dans le système nerveux central. Le principe est que les NOS constitutives sont associées à la NADPH-diaphorase pour recycler le NADPH et cette enzyme est utilisée comme marqueur histochimique. Cette méthode peut se pratiquer sur des tissus fixés, car l'activité de l'enzyme est protégée de la fixation. La détection de l'activité NADPH-diaphorase est réalisée à l'aide d'un substrat chromogène, le Nitro Bleu de Tétrazolium (NBT) qui forme un précipité de formazan bleu après réduction par la NADPH-diaphorase.

2. 4. Zymographie in situ

Cette technique histochimique permet de déterminer l'activité gélatinase des MMPs. La technique est basée sur l'utilisation d'un kit (EnzChek kit) qui contient de la gélatine (DQ gelatin), conjuguée à la fluorescéine quenchée. La technique consiste à appliquer ce substrat de gélatine sur des tissus frais. Le substrat est efficacement digéré par les plupart des gélatinases et collagénases et libère un peptide fortement fluorescent. L'augmentation de fluorescence est proportionnelle à l'activité protéolytique.

Résultats

Article 1

Les données actuelles indiquent que les afférences noradrénergiques n'ont pas uniquement une action directe sur les neurones AVP et OT. En effet, elles établissent des contacts avec d'autres populations cellulaires notamment les interneurons glutamatergiques et GABAergiques, ce qui suggère l'existence d'un mode d'action indirect de la NA pour la libération des neurohormones AVP et OT.

Plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans cette régulation, l'un d'entre eux est le **monoxyde d'azote (NO)** auquel nous nous sommes intéressés dans cette étude. En effet, le NO module l'activité des neurones AVP et OT dans le NSO (Yang et Hatton, 1999 ; Srisawat et al., 2000). De plus, la distribution de la nNOS dans le SNC est localisée dans les neurones AVP et OT des NSO chez le rat. Récemment, notre équipe a mis en évidence que la NA augmente l'expression et l'activité de la nNOS et de la iNOS chez le rat (Grange-Messent et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que le NO pourrait intervenir dans la voie de signalisation déclenchée par la NA et permettre la libération d'AVP et OT par le NSO. Ainsi, j'ai donc entrepris de vérifier cette hypothèse dans la première partie de mon travail de thèse.

A l'aide un modèle *ex-vivo* nous avons déterminé l'effet de la NA sur l'expression de l'AVP et l'OT et la place du NO dans cette régulation. Ce modèle nous permis dans un premier temps de valider notre modèle *ex-vivo* chez la souris en vérifiant par EIA que la NA induit une augmentation de l'expression l'AVP et l'OT sur des tranches d'hypothalamus contenant les NSO et incubées pendant 1h ou 4h avec la NA. Dans un deuxième temps, par analyses immunohistochimiques, nous avons observé l'expression de nNOS et iNOS dans des nombreuses cellules du NSO. Leurs expressions sont augmentées remarquablement après l'incubation avec la NA 1h ou 4h. Cependant, aucune détection de l'eNOS n'a été observée. L'activité NADPH-diaphorase a également augmentée dans les neurones magnocellulaires après l'incubation avec la NA. Ces résultats nous ont permis de constater un effet positif exercé par la NA sur l'expression de la nNOS et iNOS. Afin d'identifier les cellules exprimant la nNOS et la iNOS, nous avons réalisé une étude par double marquage immunohistochimique en utilisant des marqueurs cellulaires tels que OT, AVP et GFAP. Nos résultats montrent que les deux isoformes sont exprimées strictement dans des neurones magnocellulaires et pas dans les astrocytes. Ainsi, les deux isoformes nNOS et iNOS sont exprimés dans les neurones OT, tandis que, l'isoforme iNOS est exprimée seulement dans les neurones AVP. Nous avons observé de plus que, en présence de la

Résultats

NA, le nombre de cellules qui expriment à la fois l'OT et la nNOS ou la iNOS, et l' AVP et la iNOS augmente.

Afin d'évaluer la contribution de NO dans la voie de signalisation de la NA, des traitements pharmacologiques par le L-NAME (L-arginine méthyle ester, NO inhibiteur), le SNP (sodium nitroprusside, NO donneur) et la NA associée au L-NAME a été alors effectué. Les résultats montrent que la présence de SNP induit une augmentation des contenus d'AVP et qu'en présence de L-NAME l'effet stimulateur de NA a été supprimé. En ce qui concerne OT la présence de L-NAME n'a pas affecté l'effet stimulateur de NA sur OT.

Enfin, pour préciser la source du NO impliqué dans la régulation d'AVP induite par la NA, un traitement par l'EGTA (1 mM un bloqueur de l'activité nNOS) a été utilisé. Les résultats montrent qu'en présence d'EGTA le contenu de l'AVP est réduit 50%, ce qui suggère que le NO impliqué dans la régulation d'AVP provient à la fois de l'activité de la nNOS et de la iNOS. *Ces résultats nous ont permis de montrer que le NO est un médiateur dans la voie de régulation d'AVP par NA mais pas dans la voie de régulation d'OT par NA.*

Noradrenergic regulation in mice SON involves a nitric oxide pathway only to regulate AVP expression and not OT expression

Nasren Maolood, Valérie Grange-Messent, Danièle Raison and Hélène Hardin-Pouzet*

NSI, CNRS UMR 7101, Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, Paris, France

* : correspondence to : Hélène Hardin-Pouzet, CNRS UMR 7101, Université Pierre et Marie Curie, case courrier 002, 7 quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France. e-mail : helene.pouzet@snv.jussieu.fr

Running title: noradrenergic control of AVP expression

Abstract

Noradrenalin (NA) regulates the expression of arginine-vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) by magnocellular neurons in the supraoptic nucleus (SON) of the hypothalamus. Nitric oxide (NO) may be one of the factors involved in the NA signaling pathway regulating AVP and OT expression. To test this possibility, we used an *ex-vivo* experimental model of mouse hypothalamus slices. An increase in AVP and OT levels in the SON were detected by immuno-histochemistry and immunoenzyme assays after one hour and four hours incubations with NA (10^{-4} M). There was also an increase in the expression and activity of nNOS and iNOS in the SON as assessed by immunohistochemical and histoenzymological analysis of NADPH-diaphorase, whereas eNOS was undetectable. To specify the role of NO, the slices were treated with NA and L-arginine methyl ester (L-NAME, an NOS inhibitor, 3μ M). This treatment for 1hr abolished the NA-induced increase in AVP. Treatment with sodium nitroprusside (SNP, an NO donor, 0.1mM) increased AVP levels confirming that NO regulates AVP expression. Addition of 1 mM EGTA during the incubation with NA reduced by an half the AVP increase, indicating that both nNOS and iNOS activities are implicated in the regulation. A 1 hr treatment with L-NAME did not prevent the increase in OT induced by NA; similarly treatment with SNP had no effect. These findings show that NO is involved in the regulation of AVP expression by NA, and that NA control of OT expression is independent of NO.

Keywords

Vasopressin, noradrenalin, nitric oxide, supraoptic nucleus, brain slices

Introduction

The neurohypophyseal hormones, arginine, vasopressin (AVP) and oxytocin (OT), are mainly produced by the magnocellular neurosecretory neurons of supraoptic nucleus (SON) and paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. These neuropeptides are transported to the axonal terminals in the posterior pituitary from where they are released into blood circulation (Poulain and Wakerley, 1982). Plasmatic AVP regulates the extracellular fluid balance, and OT triggers the contraction of the smooth muscle fibers of the uterine and the mammary glands (Cunningham and Sawchenko, 1991 ; Richard *et al.* 1991; Ludwig 1998).

The synthesis and the release of AVP and OT by the PVN and SON are stimulated by increased plasma osmolality (Sherman *et al.*, 1986 ; Meister *et al.*, 1990 ; Amaya *et al.*, 1999), hypovolemia (Stricker and Verbalis, 1986 ; Huang *et al.*, 2001), suckling stimuli (Grosvenor and Mena, 1982 ; Zingg and Lefebvre, 1988), parturition (Douglas *et al.*, 1998) and stress (Plotsky, 1987). Morphological data have shown that the PVN and the SON are the main hypothalamic targets of the brainstem cell groups A1/A2 and A6 (Sawchenko and Swanson, 1982). Electrophysiological and pharmacological studies implicate this noradrenergic input in the release of AVP and OT, in particular when an increased hormone level is necessary (Willoughby *et al.*, 1987; Faull *et al.*, 1993; Saydoff *et al.*, 1996; Bealer and Crowley, 1998). Noradrenergic control of AVP and OT is not limited to the neurohypophysis, but extends to the whole hypothalamo-neurohypophyseal complex: Vacher and her co-workers (2002) demonstrated that AVP and OT expression in mice hypothalamus *in vivo* can be positively regulated by noradrenalin (NA). NA could act directly on magnocellular neurons via noradrenergic receptors which are expressed in the SON (Randle *et al.*, 1986 ; Shioda *et al.*, 1997). However, the neurochemical identity of the cells expressing the noradrenergic receptors has not been determined. Thus, it is possible that indirect pathways are involved, for example activation of the glutamatergic or GABAergic interneurons within the SON (Daftary *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Boudaba *et al.*, 2003).

Nitric oxide (NO) is of particular interest as it modulates the release of AVP and OT by magnocellular neurons (Kadowaki *et al.*, 1994; Srisawat *et al.*, 2000). NO is a free reactive gas, that acts as an intercellular messenger, and is synthesized from L-arginine by the action of nitric oxide synthase (NOS). Three isoforms of NOS have been identified, and all require reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) as the electron donor. The neuronal and the endothelial isoforms (nNOS, eNOS respectively) are constitutive and calcium-dependent. The inducible isoform (iNOS) is calcium-independent and is induced by cytokines (Moncada *et al.*, 1991; Knowles and Moncada 1994). In the rat, nNOS and iNOS isoforms are expressed in the AVP and OT neurons of the SON (Bredt *et al.*, 1990 ; Grange-Messent *et al.*, 2004) and their expression and activity are regulated by NA (Grange-Messent *et al.*, 2004). It is thus possible that NO is one of the factors regulating AVP and OT expression by NA. To test this, we established an *ex-vivo* experimental model based on mouse hypothalamic slices. The AVP and OT levels were measured after pharmacologically treating the slices with NA; experiments were performed in the presence and absence of L-NAME which blocks NOS activity. We thereby characterized the cells expressing nNOS and iNOS in the mouse SON. Our results showed that NO is a factor in the NA-signaling pathway for the regulation of AVP expression, and that OT expression was independent of NO levels.

Material and Methods

1. Animals

Six week-old adult male C3H/HeJ mice (Janvier, Saint-Berthevin-France), weighing 20-25g, were used. They were housed under controlled conditions. The mice had free access to food and water. They were anesthetized and killed in accordance with the French and European legal requirements (Decree 87-848, 86/609/ECC). Groups of 3 rats for immunohistochemistry and histoenzymolgy experiments and of 5 rats for EIA were constituted. All of the experiments were independently repeated 3 times.

2. Slice preparation

After deep anesthesia with pentobarbital (25mg/kg), mice brains were quickly removed and immersed in cooled artificial cerebrospinal fluid (aCSF) consisting of (in mM): 117 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 glucose. Coronal hypothalamic slices were cut with a vibroslice. Using the optic chiasma as a landmark, one 400µm thick section including SON was selected, transferred to a brain slice chamber system and equilibrated for one hour in aCSF before exposure to pharmacological test conditions. After incubation, slices were processed for immunohistochemistry, histoenzymology, and enzyme immunoassay.

3. Drug application

After equilibration, slices were incubated for 1 or 4 hr with 10⁻⁴ M noradrenaline (NA) (Daftary and *al.*, 1998) (Sigma, St. Louis, MO) dissolved with 0.01% ascorbic acid in aCSF. Control slices were incubated as above, with 0.01% ascorbic acid-aCSF. Other slices were incubated with 3µM nitro L-arginine methyl ester (L-NAME; Sigma, St. Louis, MO), 0.1mM sodium nitroprusside (SNP; Sigma, St. Louis, MO), L-NAME+NA (3µM and 10⁻⁴ M respectively)

and EGTA + NA (1mM and 10^{-4} M respectively) for 1hr, all dissolved in 0.01% ascorbic acid-aCSF.

4. Immunohistochemistry and histoenzymology

At the end of the pharmacological treatments, slices were fixed overnight at 4°C with 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4), then cryo-protected by incubation in 20% sucrose for 48 hr and frozen at -30°C in isopentane. Serial coronal sections (20µm thick) including the SON were selected.

4.1 AVP, OT, nNOS, and iNOS immunohistochemistry

a- Single immunohistochemistry

Sections were incubated with 0.05M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100 to block non-specific binding sites, and then with rabbit antiserum against AVP (1:5000), OT (1:2000) (gifts from Dr. G. Alonso, 1988), mouse monoclonal IgG anti-nNOS (1:500; Sigma, St. Louis, MO) or mouse monoclonal IgG anti-iNOS (1:1000; Sigma, St Louis, MO). The immune complexes were revealed with biotinylated anti-rabbit IgG antibodies (1:250 in PBS/BSA) for AVP and OT, and with biotinylated anti-mouse IgG antibodies (1:250; Vector laboratories, Burlingame, USA) for nNOS and iNOS. The sections were then incubated with Streptavidin-Cy3 conjugate (1:250; Sigma, St Louis, MO), and examined under a confocal microscope.

b- Double immunohistochemistry

Other sections were set aside for double-labeling experiments with polyclonal anti-OT, anti-AVP and anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP). This technique, similar to that described above, was modified as follows : the first incubation included both mouse anti-nNOS or iNOS monoclonals (1:500, 1:1000 dilution) and rabbit anti-AVP, OT or GFAP (1:5000, 1:2000 and

1:500 respectively; Dako, Carpinteria, CA). Bound antibodies were revealed with secondary antibodies : anti-rabbit IgG-Cy3 conjugate (1:200 dilution in PBS ; Sigma, St Louis, MO) and anti-mouse IgG fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (1:200 dilution in PBS; Vector Laboratories, Burlingame, USA). Double-fluorescent cells were identified under a confocal microscope.

4.2 Histoenzymology of NADPH-diaphorase

NADPH-diaphorase staining was performed as described by Scherer-Singler *et al.* (1983), by incubation of the slide-mounted sections with 1mM reduced- β -NADPH, 0.2mM nitroblue tetrazolium, 0.1M Tris-HCl (pH 7.2), and 0.2% Triton X-100 for 1hr at 37°C. After rinsing in a bath of Tris-HCl, the sections were observed under a light microscope (Leiz, Wetzlar, Germany).

5. AVP and OT immunoassay

AVP and OT levels (treated and control groups) were assessed by enzyme immunoassays (EIA) in the SON samples of C3H/HeJ mice as previously described (Vacher *et al.*, 2002). After pharmacological treatments with NA, L-NAME, L-NAME+NA, and SNP, we extracted the bilateral SON with a 200 μ m-internal diameter needle. Peptides were extracted from the samples ; the resulting supernatants were dried in a speed vacuum and the dry residues were dissolved in EIA buffer (0.1M potassium buffer, pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.1% BSA, and 0.01% sodium azide). The protein concentration of each sample was determined by using the Coomassie Plus Protein Assay Reagent kit (Pierce, Bezons, France). Enzymatic competitive immunoassays were used to assess AVP and OT levels in the extracted samples (Pradelles *et al.*, 1985). The rabbit anti-AVP and anti-OT antisera (the same ones as used for immunohistochemistry) were diluted 1:50000 and 1:10000, respectively. We performed solid-phase EIA in 96-well microtiter plates (Immunoplate Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark), and we added various reactants (peptide standard, sample, enzymatic

tracer, and diluted rabbit antiserum) to the plates. After an 18hr incubation at 4°C, the enzymatic activity of the solid phase-bound immunological complex was detected by the addition of Ellman's medium. The absorbance of each well was measured at 414 nm. The sensitivity of the assay was determined from the ratio of binding in the absence of competitor (B) to the concentration of unlabeled peptide resulting in a 50% decrease in binding (B_0). The AVP and OT concentrations in the samples were calculated from the standard curves and were standardized to the total amount of protein.

6. Statistical Analysis

Values reported are mean percentages of the control value \pm standard error of the mean (SEM). We compared groups using one-way analysis of variance (ANOVA) and Scheffe's test, and differences were considered significant if $p < 0.05$.

Results

1- Effect of NA on OT and AVP levels

Oxytocin immunoreactive (OT-IR) cell bodies in control mice occupied the dorsal portion of the SON (fig. 1A). We observed two kinds of OT-IR fibers: a) long fibers emerging from the SON, b) shorter fibers limited to the SON. After incubation with noradrenalin (NA 10^{-4} M) for either 1hr or 4hr, more OT-IR neurons were found. The perikarya and the fibers were stained more intensely in the NA-treated slices than in the control slices (fig. 1B). EIA confirmed higher levels of OT in the SON of slices treated with NA for 1hr than the control samples ($167 \pm 6.5\%$ vs $100 \pm 3.4\%$; * $p < 0.05$) and 4hr ($186 \pm 3.7\%$ vs $103 \pm 3.9\%$; * $p < 0.05$) (fig. 4A).

Vasopressin immunoreactivity (AVP-IR) was observed in numerous cells in the ventral and lateral part of the SON (fig. 1C). As for OT, two kinds of AVP-IR fibers were observed : long fibers emerging from the SON, and shorter fibers limited to the SON. After incubating the slices with NA, for either 1 or 4hr, we observed more AVP-IR neurons and they were more intensely labeled than the control at the same time point. There were more fibers projecting from the SON and these were more strongly labeled in the slices treated with NA than in control slices (fig. 1D). EIA confirmed the higher AVP levels in the incubated slices with NA for 1hr ($262 \pm 3.6\%$ vs $100 \pm 7.9\%$; * $p < 0,05$) or 4hr ($261 \pm 6\%$ vs $127 \pm 11\%$; * $p < 0,05$) (fig. 4C).

2- Effect of NA on nNOS and iNOS levels and distribution

nNOS expression was detected in the dorsal part of the SON (fig. 1E). After incubation with NA for 1hr or 4hr, the number of stained cells was greater than in the control samples, but they remained confined to the dorsal part of the SON (fig. 1F). nNOS-IR was distributed throughout the whole cell perikaria and also extended into some of the fibers. The treatment with NA resulted in higher NADPH-diaphorase activity than in control slices (fig. 1E, F inserts).

The iNOS isoform was found in the ventral part of the SON (fig. 1G). After incubation with NA for 1 or 4hr, more cells containing iNOS-IR were observed (fig. 1H). iNOS-IR was only found in the perinuclear area and none of the fibers were positive for iNOS-IR.

3- Identification of nNOS and iNOS expressing cells

To identify the cell types expressing nNOS and iNOS, a double immunohistochemistry experiment was performed with OT, AVP and GFAP antibodies.

There was no co-localization of nNOS and AVP in the SON in the control (fig. 2A, and insert): nNOS-IR was only detected in OT-positive neurons and all of the OT neurons were double-stained (fig. 2C and insert). After incubation with NA for 4hr, the nNOS-IR was still restricted to OT neurons (fig 2B, D). The number of double-stained neurons was higher than in the control and very few neurons expressed only OT (fig. 2D). We found similar results after a 1hr incubation with NA (data not shown).

Most iNOS-IR was detected within the perinuclear area of all of the AVP positive neurons in the control (fig. 2E and insert). Few cells were double-stained for iNOS and OT (fig. 2G and insert). After incubation with NA for 4hr, there were more AVP-positive neurons than in the control, and they all expressed iNOS (fig 2F). We observed an extensive co-localization of iNOS and OT, with few OT neurons not expressing iNOS (fig. 2H and insert).

Double labeling of iNOS or nNOS with GFAP, demonstrated that iNOS (fig. 3) and nNOS (data no shown) were not expressed in astrocytes but were exclusively expressed in the magnocellular neurons.

4- Involvement of NO in the NA signalling pathway

To determine the role of NO in the NA regulation of OT and AVP levels in the SON, the neuropeptides were assayed by EIA. EIAs were performed on samples incubated with 10^{-4} M of

Résultats

NA for 1 hr in the presence or absence of 3 μ M of L-NAME, an inhibitor of NOS activity. Treatments with L-NAME alone and SNP 0.1mM (an NO donor) were used as controls.

The presence of L-NAME for one hour did not prevent the increase of OT levels induced by NA ($195 \pm 12.4\%$ in the presence of L-NAME and $167 \pm 6.5\%$ in its absence ; * $p < 0.05$) from the control value ($100 \pm 20.8\%$) in the SON (fig. 4B). In negative control experiments without NA, the inhibition of NOS activity with L-NAME ($63 \pm 18.3 \%$) and the treatment with SNP ($128 \pm 13.7 \%$) did not significantly change OT levels from the control values.

The same experiments were carried out for AVP. The presence for 1 hr of L-NAME ($101 \pm 2.8 \%$) abolished the increase in AVP level induced by NA. In contrast, the NO donor SNP increased AVP levels ($258 \pm 9.8\%$ vs $100 \pm 7.9\%$ for the control; * $p < 0.05$) (fig. 4D). The presence of L-NAME alone did not modify the level of AVP ($96 \pm 8.5 \%$).

To precise nNOS and iNOS implication in the control of AVP level, the nNOS activity blocker EGTA was added in the incubation bath. The presence of EGTA for one hour reduced the increase of AVP levels induced by NA ($176 \pm 18,2 \%$ in the presence of EGTA and $262 \pm 3,6 \%$ in its absence ; * $p < 0,05$) from the control value ($100 \pm 7,9 \%$) in the SON (fig 4C).

Discussion

Since noradrenalin regulates the expression of AVP, OT, and NOS (Vacher *et al.*, 2002 ; Grange-Messent *et al.*, 2004), we investigated here the relationships between NA and NO in the regulation of OT and AVP expression in the SON.

First, we adapted our rat *ex vivo* model of NA-treated hypothalamic slices for mice (Grange-Messent *et al.*, 2004). Our immunohistochemical and EIA results confirm that NA enhances the *in vivo* expression of AVP and OT in the mouse (Willoughby *et al.*, 1987; Bealer and Crowley 1998; Vacher *et al.*, 2002). The catecholaminergic input is the major monoaminergic afferent in the SON and PVN. Noradrenergic afferents make up about 10% of all synapses on magnocellular neurons, but they are also in close proximity with SON interneurons (Michaloudi *et al.*, 1997). Therefore, NA may act directly or indirectly on magnocellular neurons (Randle *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1998; Di and Tasker, 2004). Among the many factors that may be involved in the noradrenergic pathway, NO may have a role in the regulation of OT and AVP, because NOS expression and activity have been demonstrated to increase under NA stimulation of the SON in the rat (Grange-Messent *et al.*, 2004).

NO is an important signaling molecule that regulates various physiological functions, including the neuroendocrine system (Nelson *et al.*, 1997) and the release of hypothalamic neuropeptides, including OT and AVP (Kadowaki *et al.*, 1994 ; Srisawat *et al.*, 2000 ; Kadekaro, 2004). The analysis of the NO cellular targets in the mouse SON by Vacher and her co-workers (2003) has suggested that NO could regulate the release of OT and AVP indirectly by modulating the activity of the magnocellular neuron afferents.

Three distinct isoforms of NOS have been identified : nNOS (neuronal NOS), iNOS (inducible NOS) and eNOS (endothelial NOS). We first analyzed the presence of these three isoforms in the SON : only nNOS and iNOS were detected by immunohistochemistry. We were

not able to discriminate a staining for eNOS from the background (data not shown), indicating that nNOS and iNOS are the major isoforms expressed in the magnocellular nuclei.

Using a specific antibody for nNOS, we confirmed that nNOS is exclusively present in OT neurons, and not in AVP neurons, in the mouse (Bredt *et al.*, 1991 ; Arevalo *et al.*, 1992 ; Hatakeyama *et al.*, 1996 ; Vacher *et al.*, 2003). This is different from the rat where nNOS is found in both types of neurons (Grange-Messent *et al.*, 2004 ; Xiao *et al.*, 2005 ; Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2006). We observed, after incubation with NA, an increase in the number of neurons labeled for nNOS, and also in NOS activity visualized by NADPH-diaphorase histochemistry. nNOS activity is calcium-dependent, so it is possible that NA activates the SON α 1-noradrenergic receptors, leading to an increase in intracellular free calcium. The free calcium may then combine reversibly with calmodulin to activate nNOS expression and activity (Canteros *et al.*, 1996; Daftary *et al.*, 1998). Glutamatergic interneurons may also have a role, as NO production is related to the activation of NMDA receptors (Bains and Ferguson, 1997).

Co-detection with OT, AVP or GFAP showed that cells expressing the iNOS isoform were not astrocytes, but cells corresponding to both OT and AVP magnocellular neurons, as in rats (Grange-Messent *et al.*, 2004). The increase in iNOS expression in magnocellular neurons after NA treatment suggests that iNOS expression may be controlled by non-inflammatory and non-immunological signals. This unusual expression of iNOS in neurons may be related to the plastic properties of the hypothalamo-neurohypophyseal complex which undergoes neurochemical and structural modifications under physiological stimuli, including dehydration and lactation. This kind of physiological plasticity may share common mechanisms, particularly the involvement of the nitric pathway, with the plasticity that occurs during neuroprotection and regeneration processes. This view is strengthened by the observation of chemokine expression in vasopressinergic neurons under dehydration (Callewaere *et al.*, 2006).

Résultats

To determine if NO is involved in the NA regulation of OT and AVP expression, we used an NOS inhibitor, L-NAME. The increase in AVP levels induced by NA was abolished in the presence of 3 μ M of L-NAME, consistent with the participation of NO in the action of NA. Incubation with 0.1 mM of SNP, an NO donor, increased the AVP level, confirming that NO stimulates AVP expression. Yamaguchi and Hama (2003) showed that adding SNP to the anteroventral third ventricular region (AV3V) initiated basal AVP secretion in conscious rats. Under normovolemic and isosmotic conditions, NO inhibits the basal release of AVP from the neurohypophyseal system. However, when plasma osmolality increases during dehydration and osmotic stimulation, the inhibitory influence of NO on AVP secretion is removed (Kadekaro and Summy-Long, 2000). Our results are consistent with the dehydration signal being mediated by noradrenergic afferents from the peripheral organs to the hypothalamus. Under hyperosmotic conditions, NA activates NOS expression and activity in the magnocellular neurons via a mechanism which still needs to be understood. Addition of 1 mM EGTA to block nNOS activity during the incubation with NA reduced the increase in AVP levels by an half suggesting that nNOS and iNOS are both implicated in AVP induction. The nitric oxide produced diffuses into the extracellular space and increases AVP expression by an autocrine or paracrine pathway; this is independent of a cGMP signal (Vacher *et al.*, 2003) and of activation of glutamatergic interneurons (Day, 1990). It has been proposed that NO may exert its action via protein s-nitrosylation (Terrell, 2003).

By contrast, the presence of L-NAME in the NA bath did not affect NA stimulation of OT. Thus, NO is not involved in the NA regulation of OT expression. Incubation with SNP had no effect on OT levels, confirming that OT expression pathways are independent of NO. This is consistent with the absence of variation of OT expression in iNOS and nNOS knock-out mice (Nomura *et al.*, 2005). This also confirms that the NO targets in the SON are not the magnocellular

neurons themselves, but the surrounding terminals and glial cells (Vacher *et al.*, 2003). As NO is able to control OT levels in plasma (for review, see Kadekaro, 2004 and Calka, 2006), we propose that NO preferentially affects OT release by the neurohypophyseal terminals rather than OT expression in the SON cell bodies. This type of difference in the anatomic site of regulation has already been demonstrated for estrogens (Langle *et al.*, 2002).

Our results show that NO is produced by both OT and AVP neurons by nNOS and/or iNOS. NO participates in the NA signaling pathway of AVP expression, but not in OT expression in the SON. As previously described, NO acts differentially on OT and AVP, having a facilitatory effect on AVP in response to hypernatremia (Ventura *et al.*, 2005). The control of AVP expression by the noradrenergic afferents has been extensively studied but the underlying mechanisms remain to be established. It has been suggested that the regulation could be mediated *in vivo* by ATP, which is co-released with NA (Kapoor and Sladek, 2000) because P2X5 receptors are expressed on AVP neurons (Xiang *et al.*, 2006). However, our *ex vivo* results demonstrate that NA, in the absence of any co-transmitter, is able to regulate the AVP levels in the SON perhaps by activation of an NO- mediated s-nitrosylation of proteins.

References

- Alonso G. 1998. Effects of colchicine on the intraneuronal transport of secretory material prior to the axon: a morphofunctional study in hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. *Brain Res.* 21;453(1-2):191-203.
- Amaya F, Tanaka M, Tamada Y, Tanaka Y, Nilaver G, Iбата Y. 1999. The influence of salt loading on vasopressin gene expression in magno- and parvocellular hypothalamic neurons: an immunocytochemical and in situ hybridization analysis. *Neuroscience.* 89(2):515-23.
- Arevalo R, Sanchez F, Alonso JR, Carretero J, Vazquez R, Aijon J. 1992. NADPH-diaphorase activity in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat. *Brain Res Bull.* 28(4):599-603.
- Bains JS, Ferguson AV. 1997. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. *J Physiol.* 499 (Pt 3):733-46.
- Bealer SL, Crowley WR. 1998. Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats. *Am J Physiol.* 274(3 Pt 1):E453-8.
- Boudaba C, Di S, Tasker JG. 2003. Presynaptic noradrenergic regulation of glutamate inputs to hypothalamic magnocellular neurones. *J Neuroendocrinol.* 15(8):803-10.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. 1991. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* 7(4):615-24.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347(6295):768-70.
- Calka J. 2006. The role of nitric oxide in the hypothalamic control of LHRH and oxytocin release, sexual behavior and aging of the LHRH and oxytocin neurons. *Folia Histochem Cytobiol.* 44(1):3-12.
- Callewaere C, Banisadr G, Desarmenien MG, Mechighel P, Kitabgi P, Rostene WH, Melik Parsadaniantz S. 2006. The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4. *Proc Natl Acad Sci USA.* (21):8221-6.
- Canteros G, Rettori V, Genaro A, Suburo A, Gimeno M, McCann SM. 1996. Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: increase by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(9):4246-50.
- Cunningham ET Jr, Sawchenko PE. 1991. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends Neurosci.* 14(9):406-11.
- Daftary SS, Boudaba C, Szabo K, Tasker JG. 1998. Noradrenergic excitation of magnocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus via intranuclear glutamatergic circuits. *J Neurosci.* (24):10619-28.
- Day TA, Renaud LP, Sibbald JR. 1990. Excitation of supraoptic vasopressin cells by stimulation of the A1 noradrenaline cell group: failure to demonstrate role for established adrenergic or amino acid receptors. *Brain Res.* 516(1):91-8.
- Di S, Tasker JG. 2004. Dehydration-induced synaptic plasticity in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic nucleus. *Endocrinology.* 145(11):5141-9.
- Douglas AJ, Meeren HK, Johnstone LE, Pfaff DW, Russell JA, Brooks PJ. 1998. Stimulation of expression of the oxytocin gene in rat supraoptic neurons at parturition. *Brain Res.* 782(1-2):167-74.
- Faull CM, Charlton JA, Butler TJ, Baylis PH. 1993. The effect of acute pharmacological manipulation of central serotonin neurotransmission on osmoregulated secretion of arginine vasopressin in the rat. *J Endocrinol.* 139(1):77-87.
- Gonzalez-Hernandez T, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Barroso-Chinea P, Abreu P, del Mar Perez-Delgado M, Rancel-Torres N, del Carmen Gonzalez M. 2006.

- Interleukin-6 and nitric oxide synthase expression in the vasopressin and corticotrophin-releasing factor systems of the rat hypothalamus. *J Histochem Cytochem.* 54(4):427-41.
- Grange-Messent V, Raison D, Dugas B, Calas A. 2004. Noradrenaline up-regulates the neuronal and the inducible nitric oxide synthase isoforms in magnocellular neurons of rat brain slices. *J Neurosci Res.* 78(5):683-90.
- Grosvenor CE, Mena F. Regulating mechanisms for oxytocin and prolactin secretion during lactation. In : *Neuroendocrine perspectives, 1982, Vol 1*, Müller EE, MacLeod RM, eds, New York, Elsevier.
- Hatakeyama S, Kawai Y, Ueyama T, Senba E. 1996. Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express Fos following stress stimuli. *J Chem Neuroanat.* 11(4):243-56.
- Huang W, Sjoquist M, Skott O, Stricker EM, Sved AF. 2001. Oxytocin antagonist disrupts hypotension-evoked renin secretion and other responses in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280(3):R760-5.
- Kadekaro M, Summy-Long JY. 2000. Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostases. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 27(5-6):450-9.
- Kadekaro M. 2004. Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophysial system. *Braz J Med Biol Res.* 37(4):441-50.
- Kadowaki K, Kishimoto J, Leng G, Emson PC. 1994. Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophysial system after chronic salt loading: evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology.* 134(3):1011-7.
- Kapoor JR, Sladek CD. 2000. Purinergic and adrenergic agonists synergize in stimulating vasopressin and oxytocin release. *J Neurosci.* 20(23):8868-75.
- Knowles RG, Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298 (Pt 2):249-58.
- Langle SL, Poulain DA, Theodosis DT. 2002. Neuronal-glia remodeling: a structural basis for neuronal-glia interactions in the adult hypothalamus. *J Physiol Paris.* 96(3-4):169-75.
- Ludwig M. 1998. Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J Neuroendocrinol.* 10(12):881-95.
- Meister B, Cortes R, Villar MJ, Schalling M, Hokfelt T. 1990. Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res.* 260(2):279-97.
- Michaloudi HC, el Majdoubi M, Poulain DA, Papadopoulos GC, Theodosis DT. 1997. The noradrenergic innervation of identified hypothalamic magnocellular somata and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. *Neuroendocrinol.* 9(1):17-23.
- Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM. 1991. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(6):2166-70.
- Nelson RJ, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM. 1997. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. *Front Neuroendocrinol.* 18(4):463-91.
- Nomura M, Tsutsui M, Shimokawa H, Fujimoto N, Ueta Y, Morishita T, Yanagihara N, Matsumoto T. 2005. Effects of nitric oxide synthase isoform deletion on oxytocin and vasopressin messenger RNA in mouse hypothalamus. *Neuroreport.* 16(4):413-7.
- Plotsky PM. 1987. Regulation of hypophysiotropic factors mediating ACTH secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 512:205-17.
- Poulain DA, Wakerley JB. 1982. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience.* 7(4):773-808.
- Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. 1985. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem.* 57(7):1170-3.

- Randle JC, Bourque CW, Renaud LP. 1986. Alpha 1-adrenergic receptor activation depolarizes rat supraoptic neurosecretory neurons in vitro. *Am J Physiol.* 251(3 Pt 2):R569-74.
- Richard P, Moos F, Freund-Mercier MJ. Central effects of oxytocin. 1991. *Physiol Rev.* 71(2):331-70.
- Sawchenko PE, Swanson LW. 1982. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res.* 257(3):275-325.
- Saydoff JA, Rittenhouse PA, Carnes M, Armstrong J, Van De Kar LD, Brownfield MS. 1996. Neuroendocrine and cardiovascular effects of serotonin: selective role of brain angiotensin on vasopressin. *Am J Physiol.* 270(3 Pt 1):E513-21.
- Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG. 1983. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods.* 9(3):229-34.
- Sherman TG, McKelvy JF, Watson SJ. 1986. Vasopressin mRNA regulation in individual hypothalamic nuclei: a northern and in situ hybridization analysis. *J Neurosci.* 6(6):1685-94.
- Shioda S, Yada T, Muroya S, Takigawa M, Nakai Y. 1997. Noradrenaline activates vasopressin neurons via alpha1-receptor-mediated Ca²⁺ signaling pathway. *Neurosci Lett.* 226(3):210-2.
- Srisawat R, Ludwig M, Bull PM, Douglas AJ, Russell JA, Leng G. 2000. Nitric oxide and the oxytocin system in pregnancy. *J Neurosci.* 20(17):6721-7.
- Stricker EM, Verbalis JG. 1986. Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *Am J Physiol.* 250(2 Pt 2):R267-75.
- Terrell ML, Salas N, Bui V, Summy-Long JY, Kadekaro M. 2003. NO inhibition of the magnocellular neuroendocrine system in rats is independent of cGMP signaling pathway. *Exp Neurol.* 184(2):846-56.
- Vacher CM, Fretier P, Creminon C, Calas A, Hardin-Pouzet H. 2002. Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J Neurosci.* 22(5):1513-22.
- Vacher CM, Hardin-Pouzet H, Steinbusch HW, Calas A, De Vente J. 2003. The effects of nitric oxide on magnocellular neurons could involve multiple indirect cyclic GMP-dependent pathways. *Eur J Neurosci.* 17(3):455-66.
- Ventura RR, Giusti-Paiva A, Gomes DA, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. 2005. Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. *Neurosci Lett.* 379(2):75-80.
- Wang YF, Shibuya I, Kabashima N, Setiadji VS, Isse T, Ueta Y, Yamashita H. 1998. Inhibition of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSC) by noradrenaline in rat supraoptic neurons through presynaptic alpha-2adrenoreceptors. *Brain Res.* 807 (1-2) : 61-9.
- Willoughby JO, Jervois PM, Menadue MF, Blessing WW. 1987. Noradrenaline, by activation of alpha-1-adrenoceptors in the region of the supraoptic nucleus, causes secretion of vasopressin in the unanaesthetized rat. *Neuroendocrinology.* 45(3):219-26.
- Xiang Z, He C, Burnstock G. 2006. P2X5 receptors are expressed on neurons containing arginine vasopressin and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1099(1):56-63.
- Xiao M, Ding J, Wu L, Han Q, Wang H, Zuo G, Hu G. 2005. The distribution of neural nitric oxide synthase-positive cerebrospinal fluid-contacting neurons in the third ventricular wall of male rats and coexistence with vasopressin or oxytocin. *Brain Res.* 1038(2):150-62.
- Yamaguchi K, Hama H. 2003. A study on the mechanism by which sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, applied to the anteroventral third ventricular region provokes facilitation of vasopressin secretion in conscious rats. *Brain Res.* 968(1):35-43.
- Zingg HH, Lefebvre DL. 1988. Oxytocin and vasopressin gene expression during gestation and lactation. *Brain Res.* 464(1):1-6.

Legends

Figure 1: Immunohistochemical detection of OT (A, B), AVP (C, D), nNOS (E, F), iNOS (G, H) and histoenzymatic detection of NADPH diaphorase (E, F inserts) in the SON in brain slices from C3H mice incubated for 1hr with (B, D, F, H) or without (A, C, E, G are controls) 10^{-4} M NA.

OT, AVP, nNOS and iNOS immunoreactivity was higher in slices incubated with NA than in control slices. OC, optic chiasma, scale bar = $100\mu\text{m}$, insert scale bar = $25\mu\text{m}$.

Figure 2 : Confocal laser microscopy of coronal sections of mice brain slices double-immunolabeled for nNOS (A, B, C, D), and iNOS (E, F, G, H) with AVP or OT (A, C, E, G : control slices ; B, D, F, H : slices incubated with NA 10^{-4} M). Green fluorescence reveals iNOS or nNOS immunoreactivity , and red fluorescence OT or AVP immunoreactivity. Co-localization appears yellow on the merged projection of twenty successive $1\mu\text{m}$ -thick sections.

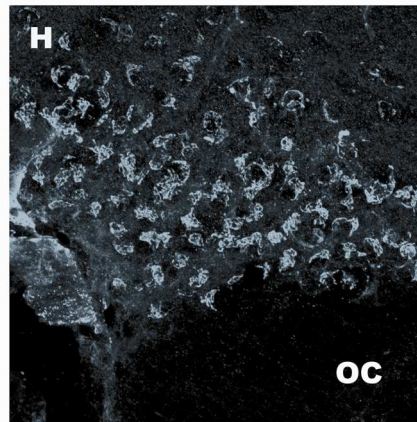
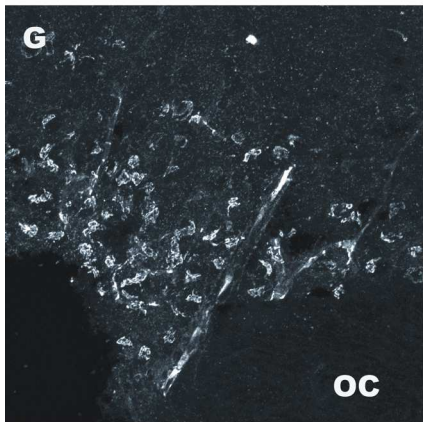
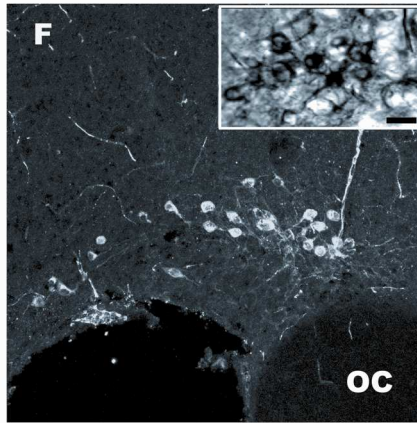
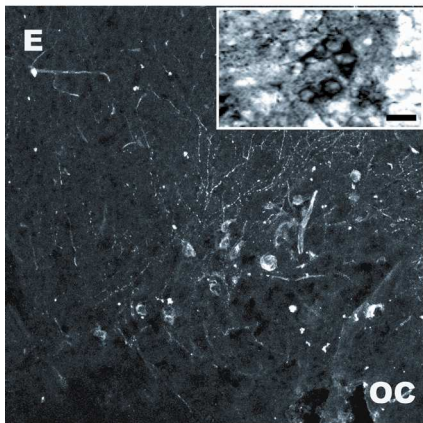
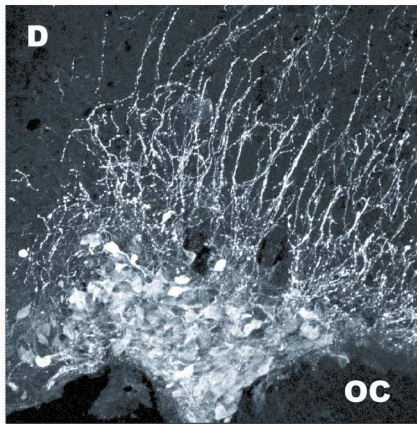
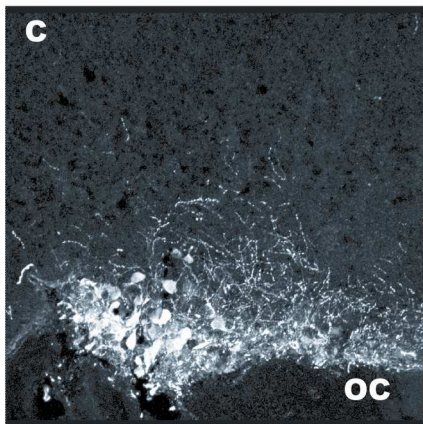
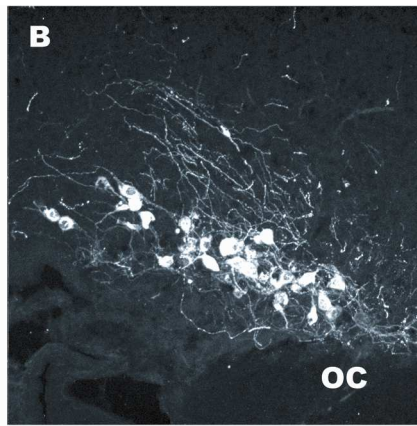
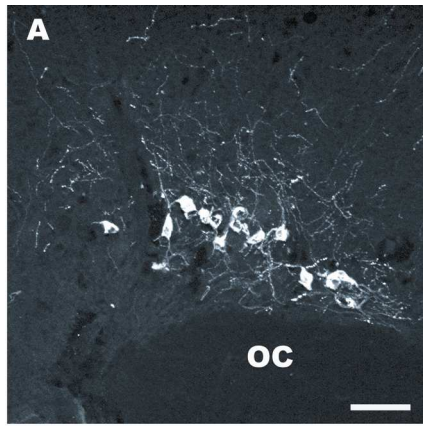
In the control, double immunolabeling for nNOS and AVP showed no co-localization (A) although nNOS and OT colocalized (C). Double immunolabeling revealed co-localizations between iNOS and both AVP (E) and OT (G). The number of magnocellular neurons which coexpress nNOS and OT (D), and which coexpress iNOS and AVP (F) or OT (H) are greater than the number in control slices. OC: optic chiasma, Scale bar = $100\mu\text{m}$. Inserts show boxed areas, scale bar = $50\mu\text{m}$

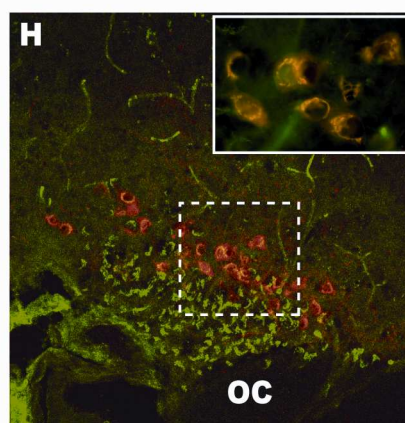
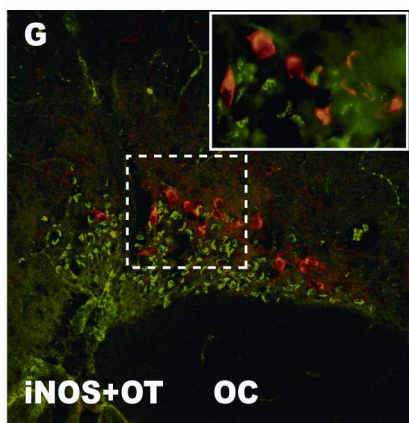
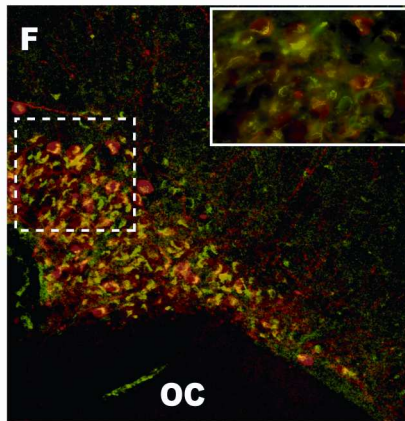
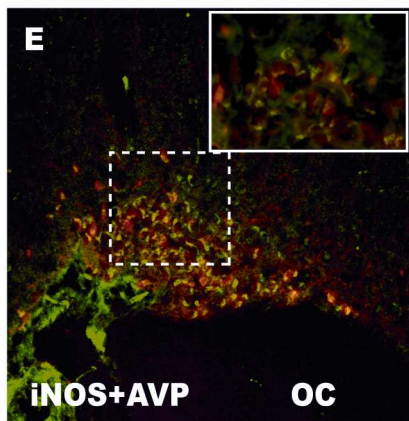
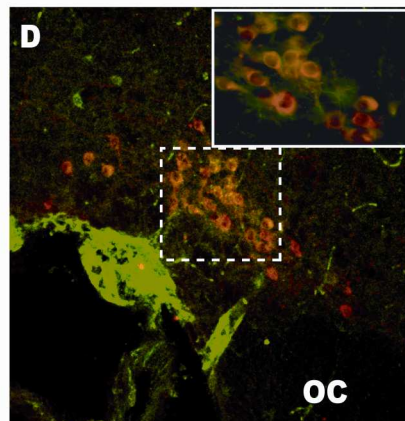
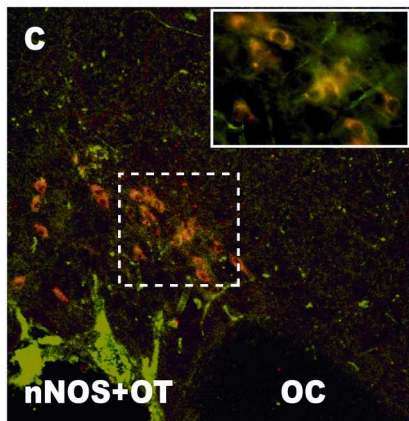
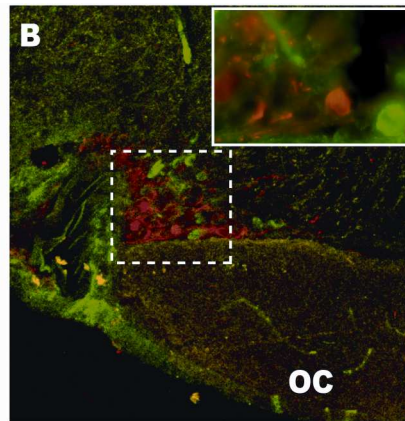
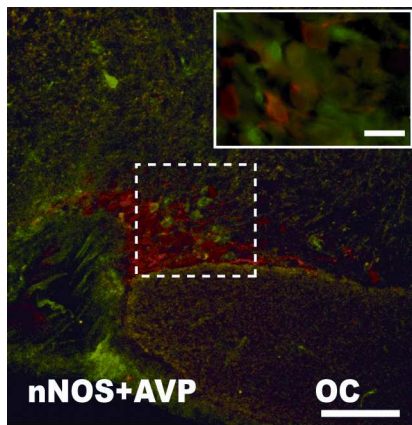
Figure 3 : Double immunostaining of iNOS and GFAP in the SON from control C3H mice. The double immunostaining showed no colocalization between GFAP (A) and iNOS (B). OC, optic chiasma, Scale bar = $100\mu\text{m}$.

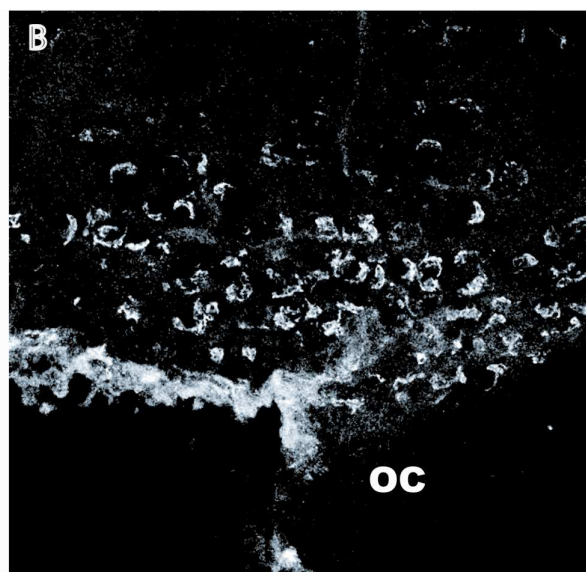
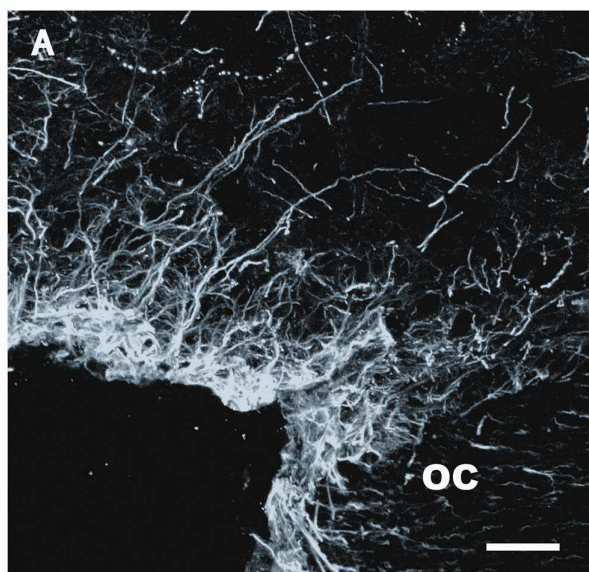
Figure 4 : Levels of OT (A, B) and AVP (C, D) determined by enzyme immunoassay in the SON from brain slices after control incubation or bath application of either 10^{-4} M NA for 1hr or 4hr, $3\mu\text{M}$ L-NAME for 1 hr, $3\mu\text{M}$ L-NAME + 10^{-4} M NA for 1 hr, 1mM SNP for 1 hr, or 1mM EGTA

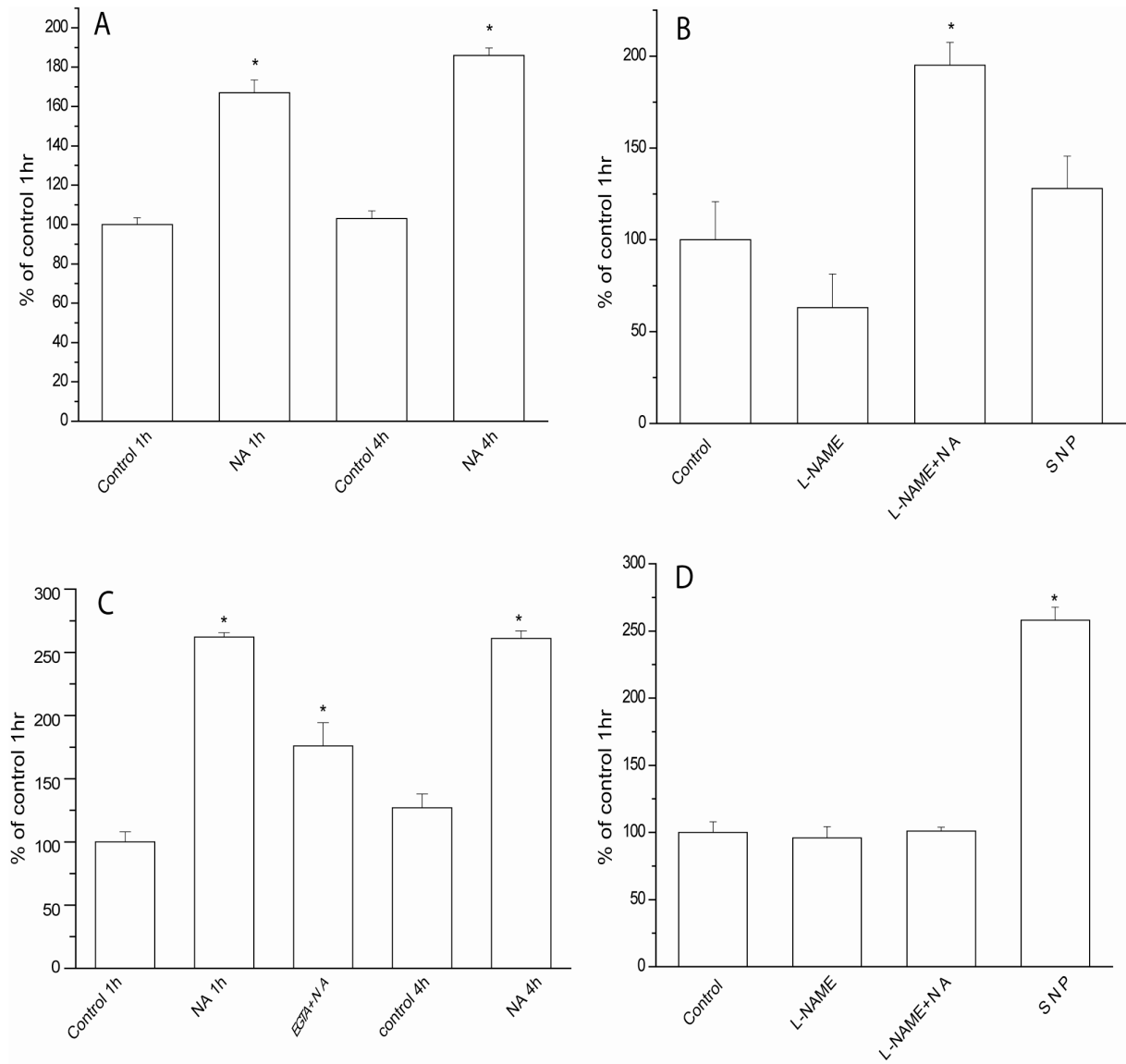
Résultats

+ 10^{-4} M NA for 1hr. Data reported are mean percentages of the 1hr control \pm standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$ as compared with control groups with a one-way ANOVA.









Article 2

Les changements morphologiques observés dans les noyaux magnocellulaires lors des stimulations physiologiques ne se limitent pas uniquement aux astrocytes et aux neurones, mais affectent également la MEC et les molécules d'adhésion induisant des réarrangements cellulaires et par conséquent des modifications de la cohésion des cellules entre elles. Des études récentes ont suggéré que la sécrétion de protéases induisant la protéolyse des protéines de la MEC pourrait fournir un mécanisme par lequel les prolongements neuronaux remodelent leurs connections synaptiques. Ces protéases sont ainsi considérées comme de bons candidats impliqués dans l'induction de la plasticité structurale de l'hypothalamus neuroendocrine (Miyata et al., 2005 ; Theodosis et al., 2004).

Les métalloprotéinases (MMPs) sont des endopeptidases zinc-dépendantes qui sont capables de dégrader des protéines de la MEC (Murphy et al., 1999 ; Seiki, 1999). Parmi les MMP, deux membres du sous-groupe des gélatinases, la MMP2 et la MMP9, sont activés lors de maladies cérébrovasculaires (Fatar et al., 2005 ; Liu et al., 2005). Néanmoins, l'information sur le rôle de MMP2 et MMP9 dans la plasticité reste à préciser (Szklarczyk et al., 2002), malgré l'étude récente de Nagy et al., (2006) qui a montré l'importance de la MMP9 dans la plasticité synaptique de l'hippocampe de rat se produisant lors des processus d'apprentissage et de mémorisation. La présence de la MMP2 et de la MMP9 a été également détectée dans l'hypothalamus de souris (Khuth et al., 2001). De plus, dans le contexte particulier du système hypothalamo-neurohypophysaire, Miyata et al., (2005) ont suggéré que les MMPs, pourraient être impliquées dans la plasticité structurale du NSO.

Ces données nous ont incités à rechercher si la MMP2 et la MMP9 sont impliquées dans les processus de la plasticité induite par la noradrénaline dans le NSO.

Nous avons utilisé le modèle *ex-vivo* de tranches d'hypothalamus contenant les NSO utilisé précédemment, et les tranches ont été traitées pendant 4h avec la NA à une concentration de 10^{-4} M. Nous avons alors réalisé des analyses immunohistochimiques des MMPs. L'expression de la MMP2 et de la MMP9 a été observée dans nombreuses cellules du NSO. Après 4h d'incubation avec la NA, leur expression est augmentée significativement. Des expériences de zymographie *in situ* ont montré que la NA induit une augmentation de l'activité protéolytique des enzymes MMP2 et la MMP9 dans les neurones magnocellulaires. Afin d'identifier la nature des cellules exprimant

Résultats

la MMP2 et la MMP9, nous avons réalisé une étude par double marquage immunohistochimique en utilisant des marqueurs cellulaires tels que OT, AVP et GFAP. Nos résultats montrent que les cellules exprimant ces gélatinases sont les neurones vassopressinergiques, ocytocinergiques, ainsi que les astrocytes.

Pour déterminer l'implication de la MMP2 et la MMP9 dans le mécanisme de régulation de l'AVP et l'OT par la NA, nous avons traité les tranches d'hypothalamus avec un inhibiteur des MMPs, la phénanthroline (1mM) seule ou combinée avec la NA (10^{-4} M). Les résultats montrent que l'application de la phénanthroline seule ou combinée avec la NA induit une diminution de l'expression de l'AVP et l'OT. *Ces résultats nous ont permis de montrer que la MMP2 et la MMP9 sont exprimées dans les neurones AVP, OT et les astrocytes du NSO. Leur expression et leur activité sont augmentées sous l'effet de la NA. Enfin, le blocage de leur activité diminue l'effet de la NA sur l'expression de l'AVP et de l'OT, suggérant un mécanisme reliant la plasticité neurochimique et la plasticité structurale du NSO.*

Receiving editor: J. Garthwaite (B. Lancaster)

**Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are involved in noradrenaline-induced
chemical plasticity in the mouse neuroendocrine hypothalamus**

N. Maolood, H. Hardin-Pouzet V. Grange-Messent*

NSI, CNRS UMR 7101, Université Pierre et Marie Curie-Paris, France

*: corresponding author

Correspondence to: Valerie Grange-Messent, CNRS UMR 7101, Université Pierre et Marie Curie, case
courrier 002, 7 quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France.

E-mail: valerie.messent@sny.jussieu.fr

Fax: 0033 144272508

Running title: MMPs and noradrenaline-induced plasticity

Total number of pages: 17

Number of figures: 4

Total number of words in the whole manuscript: 4670

Number of words in the abstract: 218

Number of words in the introduction: 408

Abstract

Magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic nuclei (SON) are involved in the synthesis and release of two major neuropeptides: oxytocin (OT) and arginine-vasopressin (AVP). Neurochemical plasticity in this system is induced by physiological conditions such as lactation, parturition, and dehydration, and may be accompanied by reversible structural plasticity affecting neurons, astrocytes and the extracellular matrix (ECM). The noradrenergic system plays a critical role in triggering this chemical plasticity associated with structural plasticity. Matrix metalloproteinases (MMPs) are good candidates for involvement in the ECM remodelling observed in structural plasticity. We investigated the possible involvement of two gelatinases, MMP2 and MMP9, in noradrenaline-induced chemical plasticity in the mouse neuroendocrine hypothalamus. We investigated the presence, location and activity of MMP2 and MMP9 in the mouse SON, using an *ex vivo* experimental model of mouse hypothalamic slices incubated for 4 hours with 10^{-4} M noradrenaline. We showed that: 1) immunoreactivity for MMP2 and MMP9 was detected in AVP-positive and OT-positive magnocellular neurons, but also in astrocyte processes in control and noradrenaline-treated slices, 2) MMP2 and MMP9 levels increased after incubation with noradrenaline, 3) MMP2 and MMP9 displayed markedly higher levels of gelatinolytic activity after noradrenaline treatment. These results suggest that both MMP2 and MMP9 are regulated by noradrenaline during chemical plasticity and may therefore also be involved in structural plasticity within the SON.

Introduction

Arginine-vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) are neuropeptides synthesised by the magnocellular neurons of the hypothalamo-neurohypophysial system. AVP is involved in regulating water-mineral metabolism, whereas OT is involved in regulating parturition and the ejection of milk (Sofroniew, 1985). Variations in the production and release of AVP and OT occurring during these physiological conditions are described as neurochemical plasticity.

We have described an increase in OT and AVP expression in the mouse hypothalamus in response to noradrenaline (NA) *in vivo* (Vacher *et al.*, 2002), consistent with published electrophysiological and pharmacological data (Willoughby *et al.*, 1987; Shioda & Nakai, 1992; Shioda *et al.*, 1997; Onaka *et al.*, 1995; Bealer & Crowley, 1998).

Neurochemical plasticity in the SON is accompanied by reversible structural plasticity affecting astrocytes, cell adhesion molecules and the extracellular matrix (ECM) (Miyata *et al.*, 1994; Modney & Hatton, 1989; Hawrylak *et al.*, 1998; Piet *et al.*, 2004). Interactions between neural cells and the ECM are affected by changes in both neural cell surface receptors and the molecules constituting the ECM. Thus, the release of proteases inducing the proteolysis of ECM proteins may facilitate the remodelling of synaptic connections by neuronal processes (Pittman *et al.*, 1989; Benson *et al.*, 2000; Shiosaka & Yoshida, 2000; Dityatev & Schachner, 2003). These molecules are considered to be good candidates for involvement in the induction of structural plasticity in the neuroendocrine hypothalamus (Miyata *et al.*, 2005; Theodosis *et al.*, 2004).

Members of the matrix metalloproteinase (MMP) family have been considered as candidates for involvement in ECM remodelling. MMPs are zinc-dependent endopeptidases that degrade all kinds of extracellular matrix proteins (reviewed by Murphy *et al.*, 1999; Seiki, 1999). Several studies have focused attention on the potential role of MMPs in the neuroplasticity and neuropathology of the brain (reviewed by Mun-Bryce & Rosenberg, 1998; Rivera & Khrestchatsky, 1999; Yong *et al.*, 2001, Wright & Harding, 2004). Two members of the gelatinase subgroup of MMPs, MMP2 and MMP9, are activated in cerebrovascular diseases (Fatar *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). However, little is known about the role of MMP2 and MMP9 in neural plasticity (Szklarczyk *et al.*, 2002). A recent study by Nagy *et al.* (2006) demonstrated the fundamental importance of MMP9 function for modulating rat hippocampal synaptic

plasticity during learning and memory. MMP2 and MMP9 have also been detected in the mouse hypothalamus (Khuth *et al.*, 2001). These data suggested a possible role for MMP2 and MMP9 in noradrenaline-induced chemical plasticity in the hypothalamic SON.

Materials and methods

Animals

We used six-week-old, adult male C3H/HeJ mice (Janvier, Saint-Berthevin, France) weighing 20 to 25g. These mice were housed under controlled conditions, with 12 h of light and 12 h of darkness and a temperature of $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. The mice had free access to food and water. They were anaesthetised and killed in accordance with French and European legal requirements (Decree 87-848, 86/609/ECC).

Slice preparation

Mice were placed under deep anaesthesia with pentobarbital (25 mg/kg) and decapitated. Their brains were quickly removed and immersed in cooled artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 2.5 mM $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM glucose. Coronal hypothalamic slices (400 μm) were cut on a vibrating microtome. For each brain, slices including the SON were selected and transferred to a brain slice chamber system, in which they were allowed to equilibrate for 1 h in aCSF before exposure to pharmacological conditions. After incubation with drugs, slices were processed for immunohistochemistry and histoenzymology.

Drug application

At the end of the one-hour equilibration period, brain slices were incubated with noradrenaline (NA) (Sigma, St. Louis, MO) at a final concentration of 10^{-4} M (Daftary *et al.*, 1998) for 4 h. Some slices were incubated with the broad-spectrum metalloproteinase inhibitor phenanthroline monohydrate (1 mM, Sigma, Rivera *et al.*, 2002) or with NA plus phenanthroline (1 mM, 10^{-4} M respectively) for 4 h. All drugs were dissolved in 0.01% ascorbic acid in aCSF.

Control slices obtained from other mice were incubated similarly, for 5 h, with 0.01% ascorbic acid in aCSF only.

Immunohistochemistry

At the end of pharmacological treatment, slices were fixed by incubation overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). They were then cryoprotected by incubation in 20% sucrose for 48 h and frozen. Serial coronal sections (20 µm) were cut from the frozen tissue, and successive sections including the SON were mounted on gelatin-coated slides. Sections from experimental and control groups were processed under the same conditions.

Simple immunohistochemistry:

- Detection of MMP-2 and MMP-9

Sections were rinsed for one hour at room temperature (RT) with 0.05M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.3% Triton X-100. Sections were incubated overnight at RT with rabbit antiserum against MMP-2 or MMP-9 (1:100, 1:1000 respectively, TEBU, Santa Cruz, USA), in a humid chamber. They were then rinsed three times, for 10 min each, with PBS/ BSA, and incubated for 2 h at RT with biotinylated anti-rabbit IgG antibody (1:250 in PBS/BSA) (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Sections were washed three times, for 10 min each, with 0.05 M PBS, and incubated for 2 h at RT with streptavidin-CY3 conjugate (1:250; Sigma). They were then washed for 10 min with 0.05 M PBS and mounted in Mowiol (Calbiochem- Novabiochem Corporation, La Jolla, CA). Sections were examined under a Zeiss epifluorescence microscope (Axiovert 200M, AxioCam RMm).

- Detection of OT and AVP

Non-specific binding sites were blocked by incubating the sections for 1 h with 0.05 M PBS pH 7.4 supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100. Sections were incubated overnight with rabbit antiserum against AVP or OT (1:5000, 1:2000 respectively, a gift from Dr. G. Alonso; Alonso, 1998). They were washed three times in 0.05 M PBS, and immune complexes were detected by incubation with biotinylated anti-rabbit IgG antibody (1:250 in PBS/BSA) followed by streptavidin-Cy3 conjugate (1:250; Sigma), for 2 h. Sections were examined under a Zeiss epifluorescence microscope (Axiovert 200M, AxioCam MRm).

Double immunohistochemistry

Other sections were reserved for double-labelling experiments with polyclonal antibodies against OT, AVP or GFAP. Double immunohistochemical staining for OT, AVP or GFAP was carried out as follows. Sections were first subjected to simple immunohistochemical staining for MMP-2 or MMP-9, these molecules being detected by incubation with biotinylated anti-rabbit IgG antibody followed by streptavidin-CY3 conjugate, as described above. They were then postfixed by incubation for 30 minutes in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). The sections were rinsed and incubated overnight at RT with rabbit IgG anti-OT (1:5000) or anti-AVP, (1:2000) (gift from Dr. G. Alonso, Alonso, 1998) or anti-GFAP (1:500; Dako, Carpinteria, CA) antibody. Sections were washed in PBS and the bound primary antibodies were detected by incubation for 1 h at RT with FITC-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies. We checked the specificity of the double-immunofluorescence staining using two polyclonal primary antibodies, by carrying out experiments in which one of the two primary antibodies — anti-MMP2 or anti-AVP, anti-MMP2 or anti-OT, anti-MMP9 or anti-AVP and anti-MMP9 or anti-OT — was omitted. Fluorescent cells were identified with a Zeiss epifluorescence microscope (Axiovert 200M, AxioCam MRm).

In situ zymography

In situ zymography was carried out on sections for the detection of gelatinase proteolytic activity in cells, as described by Oh *et al.* (1999). This procedure was modified so as to make it possible to use it on our *ex vivo* acute model of mouse hypothalamus slices. Fresh, unfixed SON-containing slices were rapidly frozen and cut into 20 μ m sections, which were mounted on aminoalkylsilane-treated slides. Control and treated fresh sections were incubated for 4 h, at 37°C with reaction buffer at pH 7.6 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM CaCl₂, and 0.03% sodium azide) supplemented with 50 μ g/ml quenched fluorescein-labelled DQ gelatin (EnzCheck gelatinase/collagenase assay, Molecular Probes) and 0.2% agarose, in a moist dark chamber. The sections were washed with 0.05M PBS, pH 7.4 and distilled water, mounted in Mowiol and covered with a coverslip. A fluorescent signal appeared only after enzymatic cleavage of DQ gelatin, revealing local

net gelatinase activity on the sections. The specificity of the reaction was demonstrated, using the broad-spectrum metalloproteinase inhibitor, phenanthroline monohydrate (100 to 500 µg/ml).

Results

Immunoreactivity for MMP9 and MMP2 was stronger in the SON of noradrenaline-treated hypothalamic slices

Immunoreactivity for both MMP-9 and MMP-2 was observed in many cells of the SON (fig. 1A to D). In control slices, a weak fluorescent signal was detected for MMP9 (fig. 1A), restricted to the perinuclear area. In contrast, MMP-2 immunoreactivity (fig. 1C) was more intense in control slices, encompassing the entire perikaryon. After the incubation of slices for 4 h with NA, MMP-9-positive (fig. 1B) and MMP-2-positive (fig.1D) perikarya were more numerous than in the control slices (fig.1A, C). The entire SON was labelled.

Identification of cells containing MMP9 or MMP2 in the SON

We identified MMP-containing cells in the SON, by carrying out double immunohistochemical staining with OT, AVP and GFAP antibodies. As previously reported for the mouse SON (Maaloud, Grange-Messent *et al.*, 2007, *in press*), immunoreactivity for OT (fig. 2B) and AVP (fig. 2E) was found to have increased after 4 h of incubation with NA (control data not shown).

The OT-immunoreactive cell bodies were located primarily in the dorsal part of the SON (fig. 2B), whereas AVP-immunoreactive neurons were located primarily in the ventral portion of the SON (fig. 2E). MMP-9 was detected in OT-positive neurons (fig.2C). The few OT-negative cells labelled for MMP-9 also contained AVP, and AVP-immunoreactive cells also contained MMP-9 (fig. 2F). MMP-9 immunoreactivity was also detected in the GFAP-positive astrocytic processes of the glial limitans (fig.2I). MMP-2 immunoreactivity was observed in both OT-positive (fig. 3C) and AVP-positive neurons (fig. 3F), and was also detected in the external glial limitans and in some astrocytic processes (fig. 3I).

The gelatinolytic activity of MMP-9 and MMP-2 was enhanced in the SON of noradrenaline-treated hypothalamic slices

We determined the histological distribution of the gelatinolytic activity of MMP9 and MMP2 and assessed possible modifications to this activity during noradrenaline-induced chemical plasticity in the mouse SON, using *in situ* zymography on *ex vivo* brain slices. Slices of the hypothalamus were incubated with gelatin substrate, which is efficiently digested by MMPs. The observed fluorescence was proportional to MMP proteolytic activity. In control and treated slices, gelatinolytic activity was observed mostly in the dorsal and ventral parts of the SON. No other cells in the parenchyma displayed fluorescence. A weak fluorescent signal was detected in control slices (fig. 1E), and the number of fluorescent cells and the intensity of their fluorescence were clearly greater in slices treated with NA for 4 h (fig. 1F).

The distribution of these fluorescent cells corresponded to that of AVP and OT magnocellular neurons and astrocytes. Fluorescence was abolished by incubation with phenanthroline (data not shown).

Inhibition of the activity of MMP-2 and MMP-9 affects immunoreactivity for AVP and OT

We assessed the involvement of MMP-2 and MMP-9 in the increase in AVP and OT levels reflecting chemical plasticity, by carrying out experiments on sections treated with 1mM phenanthroline (MMP inhibitor) or with a mixture of phenanthroline and NA (1 mM and 10^{-4} M, respectively) for 4 h.

OT-immunoreactive cell bodies occupied the dorsal portion of the SON in control slices (fig. 4A), whereas vasopressin immunoreactivity was observed in numerous cells located in the ventral and lateral parts of the SON (fig. 4D).

Incubation with phenanthroline or phenanthroline plus NA decreased the numbers of OT- and AVP-containing neurons (fig. 4B, 4C and 4E, 4F, respectively), but the intensity of the fluorescent signal was more important in the phenanthroline plus NA-incubated NSO than in the phenanthroline-incubated NSO (fig. 4B, 4C and 4E, 4F).

Discussion

Chemical plasticity, as revealed by changes in AVP and OT expression in endocrine magnocellular neurons, has been established in the Tg8 transgenic mouse model (Vacher *et al.*, 2002), raising questions about the possible involvement of noradrenaline, the main monoaminergic input in the SON. We have also confirmed the involvement of noradrenaline in the regulation of AVP and OT expression in an *ex vivo* experimental

model of mouse hypothalamic slices (Maaloud, Grange-Messent *et al.*, 2007, *in press*). In the study reported here, we investigated the possible contribution of the gelatinases MMP2 and MMP9 to the structural plasticity observed during NA-induced chemical plasticity in the SON. We used our *ex vivo* model of hypothalamic slices incubated with 10^{-4} M NA for 4 h. This concentration was chosen based on previous studies carried out on brain slices, in which incubation in a bath of 10^{-4} M NA induced an optimal magnocellular neuron response (Daftary *et al.*, 1998; Grange-Messent *et al.*, 2004). We also tried incubating the slices with NA for 1 h, but no significant change in immunoreactivity or enzymatic activity was observed for the MMPs tested. We therefore present here only the significant results obtained after incubation with NA for 4 h. We focused on the SON, because these nuclei are known to display marked structural plasticity under chronic physiological stimulation, such as dehydration and lactation (Hawrylak *et al.*, 1998; Langle *et al.*, 2002, Oliet, 2002; Theodosis *et al.*, 2006). They also have a highly homogeneous cellular structure, being composed exclusively of magnocellular neurons and glial cells, whereas the paraventricular nucleus also includes parvocellular neurons.

We demonstrated that MMP-9 and MMP-2 were present in magnocellular neurons and astrocytes of the mouse SON, and that the activity of these enzymes was regulated by NA.

Immunohistochemistry demonstrated the presence of both MMP-9 and MMP-2 in the mouse SON under normal conditions (in the absence of NA treatment). These MMPs were distributed within magnocellular neurons and astrocytes. Double-labelling experiments showed that MMP-9 and MMP-2 colocalised with OT and AVP magnocellular neurons and, to a lesser degree, with astrocytes identified on the basis of the presence of the specific astrocytic intermediate filament protein, GFAP. This result is consistent with the findings of a previous study describing the distribution and expression of MMP-2 and MMP-9 in neurons and astrocytes of the rat hippocampus (Szklarczyk *et al.*, 2002). Neuronal MMP-9 appeared to be concentrated in the perinuclear compartment of neuronal cell bodies, whereas MMP-2 was distributed throughout the perikaryon.

Four hours of NA treatment increased MMP-9 and MMP-2 levels. This increase in immunoreactivity coincided with an increase in gelatinolytic activity. The effect of NA was abolished in the presence of the broad-spectrum MMP inhibitor, phenanthroline. Our results suggest that both MMP-9 and MMP-2 may be involved in triggering structural plasticity during noradrenaline-induced chemical plasticity in the mouse

neuroendocrine hypothalamus. These endopeptidases may be activated and regulated directly or indirectly by NA, triggering the proteolysis of some of the ECM molecules present in the surroundings of magnocellular neurons.

Our observations recall those of Briest *et al.*, (2003), who described the role of MMPs, and MMP-2 in particular, in the noradrenaline-induced remodelling of the ECM of rat hearts. In rat hearts, NA induces left ventricle hypertrophy (Barth *et al.*, 2000), which is accompanied by ECM remodelling, with high levels of collagen I and III mRNA, and high levels of MMP-2 activity (Briest *et al.*, 2001). However, the brain ECM is markedly different from that in other organs. The extracellular space between neurons in adult brains has no basal lamina and does not seem to contain such classical MMP-sensitive ECM proteins as laminins and collagens (Sugita *et al.*, 2001). However, MMP targets are available in the brain and may be involved in neuronal plasticity. Dystroglycan is a particularly interesting potential physiological target molecule for MMP activity (probably MMP-2 or MMP-9, see Yamada *et al.*, 2001). Indeed, Kaczmarek *et al.* (2002) showed that β -dystroglycan is also broken down proteolytically in the rat hippocampus in response to kainate, in a temporal pattern paralleling the increase in MMP activity, with β -dystroglycan playing an important role in LTP, serving as a model of neuronal plasticity (Moore *et al.*, 2002). Zhong *et al.* (2006) showed that both MMP2 and MMP9 could degrade the extracellular domain of β -dystroglycan in a rat schwannoma cell line culture. β -dystroglycan associates with α -dystroglycan in the dystroglycan complex, linking the ECM and the cortical cellular cytoskeleton. The intracellular domain of β -dystroglycan binds to the cytoplasmic protein dystrophin, which mediates signalling by binding to α -dystrobrevin and syntrophin, which in turn anchor signalling molecules, such as neuronal nitric oxide synthase (nNOS) to the dystroglycan complex (Grady *et al.*, 1999). As nNOS is present in the SON of mice and rats (Vacher *et al.*, 2003; Grange-Messent *et al.*, 2004) and is upregulated in the rat SON by NA (Grange-Messent *et al.*, 2004), the activation of MMP2 and MMP9 by NA may be mediated by NO, thus identifying an NA signalling pathway involved in the structural plasticity associated with chemical plasticity in the hypothalamo-neurohypophyseal system.

References

- Alonso, G. (1998) Effects of colchicine on the intraneuronal transport of secretory material prior to the axon: a morphofunctional study in hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. *Brain Res.*, **453**, 191-203.
- Barth, W. Deten, A. Bauer, M. Reinohs, M. Leicht, M. & Zimmer, HG. (2000) Differential remodeling of the left and right heart after norepinephrine treatment in rats: studies on cytokines and collagen. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **32**, 273-84.
- Bealer, S. L. & Crowley, W.R. (1998) Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats. *Am. J. Physiol.*, **274**, 453-8.
- Benson, D. L. Schnapp, L. M. Shapiro, L. & Huntley, G. W. (2000) Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol.*, **10**, 473-82.
- Briest, W. Holzl, A. Rassler, B. Deten, A. Baba, H. A. & Zimmer, H. G. (2003) Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts. *Cardiovasc. Res.*, **57**, 379-87.
- Briest, W. Holzl, A. Rassler, B. Deten, A. Leicht, M. Baba, H. A. & Zimmer, H. G. (2001) Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc. Res.*, **52**, 265-73.
- Daftary, S. S. Boudaba, C. Szabo, K. & Tasker, J. G. (1998) Noradrenergic excitation of magnocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus via intranuclear glutamatergic circuits. *J. Neurosci.*, **24**, 10619-28.
- Dityatev, A. & Schachner, M. (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 456-68.
- Fatar, M. Stroick, M. Griebe, M. & Hennerici, M. (2005) Matrix metalloproteinases in cerebrovascular diseases. *Cerebrovascular Diseases*, **20**, 141-51.
- Grady, R. M. Grange, R. W. Lau, K. S. Maimone, M. M. Nichol, M. C. Stull, J. T. & Sanes, J. R. (1999) Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 215-20.
- Grange-Messent, V. Raison, D. Dugas, B. & Calas, A. (2004) Noradrenaline up-regulates the neuronal and the inducible nitric oxide synthase isoforms in magnocellular neurons of rat brain slices. *J. Neurosci. Res.*, **78**, 683-90.

- Hawrylak, N. Fleming, J. C. & Salm, A. K. (1998) Dehydration and rehydration selectively and reversibly alter glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus and subjacent glial limitans. *Glia.*, **22**, 260-71.
- Kaczmarek, L. Lapinska-Dzwonek, J. & Szymczak, S. (2002) Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J.*, **21**, 6643-8.
- Khuth, S. T. Akaoka, H. Pagenstecher, A. Verlaeten, O. Belin, M. F. Giraudon, P. & Bernard, A. (2001) Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. *J. Virol.*, **75**, 8268-82.
- Langle, S. L. Poulain, D. A. & Theodosis, D. T. (2002) Neuronal-glia remodeling: a structural basis for neuronal-glia interactions in the adult hypothalamus. *J. Physiol. Paris*, **96**, 69-75.
- Liu, Y. X. Gao, F. Wei, P. Chen, X. L. Gao, H. J. Zou, R. J. Siao, L. J. Xu, F. H. Feng, Q. Liu, K. & Hu, Z. Y. (2005) Involvement of molecules related to angiogenesis, proteolysis and apoptosis in implantation in rhesus monkey and mouse. *Contraception*, **71**, 249-62.
- Maolood, N. Grange-Messent, V. Raison, D. & Hardin-Pouzet, H. (2007) Noradrenergic regulation in mice SON involves a nitric oxide pathway only to regulate AVP expression and not OT expression. *J. Neurosci. Res.*, (*in press*).
- Miyata, S. Nakashima, T. & Kiyohara, T. (1994) Structural dynamics of neural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus during dehydration and rehydration. *Brain Res. Bull.*, **34**, 169-75.
- Miyata, S. Nakatani, Y. Hayashi, N. & Nakashima, T. (2005) Matrix-degrading enzymes tissue plasminogen activator and matrix metalloprotease-3 in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res.*, **1058**, 1-9.
- Modney, B. K. & Hatton, G. I. (1989) Multiple synapse formation: a possible compensatory mechanism for increased cell size in rat supraoptic nucleus, *J. Neuroendocrinology*, **1**, 21-27.
- Moore, S. A. Saito, F. Chen, J. Michele, D. E. Henry, M. D. Messing, A. Cohn, R. D. Ross-Barta, S. E. Westra, S. Williamson, R. A. Hoshi, T. & Campbell, K. P. (2002) Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature*, **418**, 376-7.

- Mun-Bryce, S. & Rosenberg, G. A. (1998) Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **18**, 1163-72.
- Murphy, G. Stanton, H. Cowell, S. Butler, G. Knauper, V. Atkinson, S. & Gavrilovic, J. (1999) Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS*, **107**, 38-44.
- Nagy, V. Bozdagi, O. Matynia, A. Balcerzyk, M. Okulski, P. Dzwonek, J. Costa, R. M. Silva, A. J. Kaczmarek, L. & Huntley, G. W. (2006) Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J. Neurosci.*, **26**, 1923-34.
- Oh, L. H. Larsen, P. H. Krekoski, C. A. Edwards, D. R. Donovan, F. Werb, Z. & Yong V. W. (1999) Matrix metalloproteinase-9/ gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J. Neurosci.*, **19**, 8464-8475.
- Oliet, S. H. (2002) Functional consequences of morphological neuroglial changes in the magnocellular nuclei of the hypothalamus. *J. Neuroendocrinology*, **14**, 241-6
- Onaka, T. Luckman, S. M. Antonijevic, I. Palmer, J. R. & Leng, G. (1995) Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarii to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat. *Neuroscience*, **66**, 403-12.
- Piet, R. Vargova, L. Sykova, E. Poulain, D. A. & Oliet, S. H. (2004) Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2151-5.
- Pittman, R. N. & Buettner, H. M. (1989) Degradation of extracellular matrix by neuronal proteases. *Dev. Neurosci.*, **11**, 361-75.
- Rivera, S. & Khrestchatisky, M. (1999) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuronal plasticity and pathology. In Baudry, M., Thomsom, R. F. & Davis, J.L. (eds), *Advances in Synaptic plasticity*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 53-86.
- Rivera, S. Ogier, C. Jourquin, J. Timsit, S. Szklarczyk, A. W. Miller, K. Gearing, A. J. Kaczmarek, L. & Khrestchatisky, M. (2002) Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 19-32.
- Seiki, M. (1999) Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS.*, **107**, 137-43.

- Shioda, S. Yada, T. Muroya, S. Takigawa, M. & Nakai, Y. (1997) Noradrenaline activates vasopressin neurons via alpha1-receptor-mediated Ca²⁺ signaling pathway. *Neurosci. Lett.*, **226**, 210-2.
- Shioda, S. & Nakai, Y. (1992) Noradrenergic innervation of vasopressin-containing neurons in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *Neurosci. Lett.*, **140**, 215-8.
- Shiosaka, S. & Yoshida, S. (2000) Synaptic microenvironments--structural plasticity, adhesion molecules, proteases and their inhibitors. *Neurosci. Res.*, **37**, 85-9.
- Sofroniew, M. V. (1985) Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins. In Bjorklund, A, Hokfelt, T. (eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam Elsevier. P. 93-152.
- Sugita, S. Saito, F. Tang, J. Satz, J. Campbell, K. & Sudhof, T. C. (2001) A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *J. Cell Biol.*, **154**, 435-45.
- Szklarczyk, A. Lapinska, J. Rylski, M. McKay, R. D. & Kaczmarek, L. (2002) Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J. Neurosci.*, **22**, 920-30.
- Theodosis, D. T. Piet, R. Poulain, D. A. & Oliet, S. H. (2004) Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochem. Int.*, **45**, 491-501.
- Theodosis, D. T. Trailin, A. & Poulain, D. A. (2006) Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **290**, 1175-82.
- Vacher, C. M. Fretier, P. Creminon, C. Calas, A. & Hardin-Pouzet, H. (2002) Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J. Neurosci.*, **22**, 1513-22.
- Vacher, C. M. Hardin-Pouzet, H. Steinbusch, H. W. Calas, A. & De Vente, J. (2003) The effects of nitric oxide on magnocellular neurons could involve multiple indirect cyclic GMP-dependent pathways. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 455-66.
- Willoughby, J. O. Jervois, P. M. Menadue, M. F. & Blessing, W. W. (1987) Noradrenaline, by activation of alpha-1-adrenoceptors in the region of the supraoptic nucleus, causes secretion of vasopressin in the unanaesthetized rat. *Neuroendocrinology*, **45**, 219-26.

- Wright, J. W. & Harding, J. W. (2004) The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog. Neurobiol.*, **72**, 263-93.
- Yamada, H. Saito, F. Fukuta-Ohi, H. Zhong, D. Hase, A. Arai, K. Okuyama, A. Maekawa, R. Shimizu, T. & Matsumura, K. (2001) Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1563-9.
- Yong, V. W. Power, C. Forsyth, P. & Edwards, D. R. (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 502-11.
- Zhong, D. Saito, F. Saito, Y. Nakamura, A. Shimizu, T. & Matsumura, K. (2006) Characterization of the protease activity that cleaves the extracellular domain of beta-dystroglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 867-71.

Legends

Figure 1:

Immunofluorescent detection of MMP-9 (A, B) and MMP-2 (C, D) in the SON from hypothalamus slices incubated for 4 h with 10^{-4} M NA. A and C: Control experiment. Incubation with NA increased levels of immunoreactivity for MMP-9 and MMP-2 (B, D).

Fluorescence micrographs of hypothalamus slices showing *in situ* zymography (E, F) in the SON, in control slices (E) and after incubation for 4 h with NA (F). NA treatment slightly increased the intensity of fluorescence, indicating an increase in gelatinolytic activity in the SON of NA-treated hypothalamic slices.

OC, optic chiasma, Scale bar= 20 μ m.

Figure 2:

Immunolabelled sections from the SON included in slices incubated in the presence of 10^{-4} M NA. Colocalization is shown in yellow on the merged projection (C, F, I). MMP9 was colocalized not only with OT-positive neurons (C, inset) and AVP-positive cells (F, inset), but also with some astrocytic processes (I, inset).

Insets show boxed areas. OC: optic chiasma, Scale bar= 20 μ m.

Figure 3:

Immunolabelled sections from the SON included in slices incubated in the presence of 10^{-4} M NA. Colocalization is shown in yellow on the merged projection (C, F, I). MMP2 was colocalized not only with OT-positive neurons (C, inset) and AVP-positive cells (F, inset), but also with some astrocytic processes (I, inset).

Insets show boxed areas. OC: optic chiasma, Scale bar= 20 μ m.

Figure 4:

Immunohistochemical detection of OT (A, B, C) and AVP (D, E, F) in the SON included in slices incubated in the presence of 1mM phenanthroline (B, E) or 1mM phenanthroline plus 10^{-4} M NA

(C, F). Phenanthroline or phenanthroline plus NA treatment decreased the numbers of OT- and AVP-containing neurons (B, C and E, F respectively) compared with control (A, D), but the intensity of the fluorescent signal was more important in the phenanthroline plus NA-incubated SON (C, F) than in the phenanthroline-incubated SON (B, E).

OC: optic chiasma, Scale bar= 20 μ m.

Receiving editor: J. Garthwaite (B. Lancaster)

**Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are involved in noradrenaline-induced
chemical plasticity in the mouse neuroendocrine hypothalamus**

N. Maolood, H. Hardin-Pouzet V. Grange-Messent*

NSI, CNRS UMR 7101, Université Pierre et Marie Curie-Paris, France

*: corresponding author

Correspondence to: Valerie Grange-Messent, CNRS UMR 7101, Université Pierre et Marie Curie, case courrier 002, 7 quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France.

E-mail: valerie.messent@sny.jussieu.fr

Fax: 0033 144272508

Running title: MMPs and noradrenaline-induced plasticity

Total number of pages: 17

Number of figures: 4

Total number of words in the whole manuscript: 4670

Number of words in the abstract: 218

Number of words in the introduction: 408

Abstract

Magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic nuclei (SON) are involved in the synthesis and release of two major neuropeptides: oxytocin (OT) and arginine-vasopressin (AVP). Neurochemical plasticity in this system is induced by physiological conditions such as lactation, parturition, and dehydration, and may be accompanied by reversible structural plasticity affecting neurons, astrocytes and the extracellular matrix (ECM). The noradrenergic system plays a critical role in triggering this chemical plasticity associated with structural plasticity. Matrix metalloproteinases (MMPs) are good candidates for involvement in the ECM remodelling observed in structural plasticity. We investigated the possible involvement of two gelatinases, MMP2 and MMP9, in noradrenaline-induced chemical plasticity in the mouse neuroendocrine hypothalamus. We investigated the presence, location and activity of MMP2 and MMP9 in the mouse SON, using an *ex vivo* experimental model of mouse hypothalamic slices incubated for 4 hours with 10^{-4} M noradrenaline. We showed that: 1) immunoreactivity for MMP2 and MMP9 was detected in AVP-positive and OT-positive magnocellular neurons, but also in astrocyte processes in control and noradrenaline-treated slices, 2) MMP2 and MMP9 levels increased after incubation with noradrenaline, 3) MMP2 and MMP9 displayed markedly higher levels of gelatinolytic activity after noradrenaline treatment. These results suggest that both MMP2 and MMP9 are regulated by noradrenaline during chemical plasticity and may therefore also be involved in structural plasticity within the SON.

Introduction

Arginine-vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) are neuropeptides synthesised by the magnocellular neurons of the hypothalamo-neurohypophysial system. AVP is involved in regulating water-mineral metabolism, whereas OT is involved in regulating parturition and the ejection of milk (Sofroniew, 1985). Variations in the production and release of AVP and OT occurring during these physiological conditions are described as neurochemical plasticity.

We have described an increase in OT and AVP expression in the mouse hypothalamus in response to noradrenaline (NA) *in vivo* (Vacher *et al.*, 2002), consistent with published electrophysiological and pharmacological data (Willoughby *et al.*, 1987; Shioda & Nakai, 1992; Shioda *et al.*, 1997; Onaka *et al.*, 1995; Bealer & Crowley, 1998).

Neurochemical plasticity in the SON is accompanied by reversible structural plasticity affecting astrocytes, cell adhesion molecules and the extracellular matrix (ECM) (Miyata *et al.*, 1994; Modney & Hatton, 1989; Hawrylak *et al.*, 1998; Piet *et al.*, 2004). Interactions between neural cells and the ECM are affected by changes in both neural cell surface receptors and the molecules constituting the ECM. Thus, the release of proteases inducing the proteolysis of ECM proteins may facilitate the remodelling of synaptic connections by neuronal processes (Pittman *et al.*, 1989; Benson *et al.*, 2000; Shiosaka & Yoshida, 2000; Dityatev & Schachner, 2003). These molecules are considered to be good candidates for involvement in the induction of structural plasticity in the neuroendocrine hypothalamus (Miyata *et al.*, 2005; Theodosis *et al.*, 2004).

Members of the matrix metalloproteinase (MMP) family have been considered as candidates for involvement in ECM remodelling. MMPs are zinc-dependent endopeptidases that degrade all kinds of extracellular matrix proteins (reviewed by Murphy *et al.*, 1999; Seiki, 1999). Several studies have focused attention on the potential role of MMPs in the neuroplasticity and neuropathology of the brain (reviewed by Mun-Bryce & Rosenberg, 1998; Rivera & Khrestchatsky, 1999; Yong *et al.*, 2001, Wright & Harding, 2004). Two members of the gelatinase subgroup of MMPs, MMP2 and MMP9, are activated in cerebrovascular diseases (Fatar *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). However, little is known about the role of MMP2 and MMP9 in neural plasticity (Szklarczyk *et al.*, 2002). A recent study by Nagy *et al.* (2006) demonstrated the fundamental importance of MMP9 function for modulating rat hippocampal synaptic

plasticity during learning and memory. MMP2 and MMP9 have also been detected in the mouse hypothalamus (Khuth *et al.*, 2001). These data suggested a possible role for MMP2 and MMP9 in noradrenaline-induced chemical plasticity in the hypothalamic SON.

Materials and methods

Animals

We used six-week-old, adult male C3H/HeJ mice (Janvier, Saint-Berthevin, France) weighing 20 to 25g. These mice were housed under controlled conditions, with 12 h of light and 12 h of darkness and a temperature of $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. The mice had free access to food and water. They were anaesthetised and killed in accordance with French and European legal requirements (Decree 87-848, 86/609/ECC).

Slice preparation

Mice were placed under deep anaesthesia with pentobarbital (25 mg/kg) and decapitated. Their brains were quickly removed and immersed in cooled artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 2.5 mM $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM glucose. Coronal hypothalamic slices (400 μm) were cut on a vibrating microtome. For each brain, slices including the SON were selected and transferred to a brain slice chamber system, in which they were allowed to equilibrate for 1 h in aCSF before exposure to pharmacological conditions. After incubation with drugs, slices were processed for immunohistochemistry and histoenzymology.

Drug application

At the end of the one-hour equilibration period, brain slices were incubated with noradrenaline (NA) (Sigma, St. Louis, MO) at a final concentration of 10^{-4} M (Daftary *et al.*, 1998) for 4 h. Some slices were incubated with the broad-spectrum metalloproteinase inhibitor phenanthroline monohydrate (1 mM, Sigma, Rivera *et al.*, 2002) or with NA plus phenanthroline (1 mM, 10^{-4} M respectively) for 4 h. All drugs were dissolved in 0.01% ascorbic acid in aCSF.

Control slices obtained from other mice were incubated similarly, for 5 h, with 0.01% ascorbic acid in aCSF only.

Immunohistochemistry

At the end of pharmacological treatment, slices were fixed by incubation overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). They were then cryoprotected by incubation in 20% sucrose for 48 h and frozen. Serial coronal sections (20 µm) were cut from the frozen tissue, and successive sections including the SON were mounted on gelatin-coated slides. Sections from experimental and control groups were processed under the same conditions.

Simple immunohistochemistry:

- Detection of MMP-2 and MMP-9

Sections were rinsed for one hour at room temperature (RT) with 0.05M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.3% Triton X-100. Sections were incubated overnight at RT with rabbit antiserum against MMP-2 or MMP-9 (1:100, 1:1000 respectively, TEBU, Santa Cruz, USA), in a humid chamber. They were then rinsed three times, for 10 min each, with PBS/ BSA, and incubated for 2 h at RT with biotinylated anti-rabbit IgG antibody (1:250 in PBS/BSA) (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Sections were washed three times, for 10 min each, with 0.05 M PBS, and incubated for 2 h at RT with streptavidin-CY3 conjugate (1:250; Sigma). They were then washed for 10 min with 0.05 M PBS and mounted in Mowiol (Calbiochem- Novabiochem Corporation, La Jolla, CA). Sections were examined under a Zeiss epifluorescence microscope (Axiovert 200M, AxioCam RMm).

- Detection of OT and AVP

Non-specific binding sites were blocked by incubating the sections for 1 h with 0.05 M PBS pH 7.4 supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100. Sections were incubated overnight with rabbit antiserum against AVP or OT (1:5000, 1:2000 respectively, a gift from Dr. G. Alonso; Alonso, 1998). They were washed three times in 0.05 M PBS, and immune complexes were detected by incubation with biotinylated anti-rabbit IgG antibody (1:250 in PBS/BSA) followed by streptavidin-Cy3 conjugate (1:250; Sigma), for 2 h. Sections were examined under a Zeiss epifluorescence microscope (Axiovert 200M, AxioCam MRm).

Double immunohistochemistry

Other sections were reserved for double-labelling experiments with polyclonal antibodies against OT, AVP or GFAP. Double immunohistochemical staining for OT, AVP or GFAP was carried out as follows. Sections were first subjected to simple immunohistochemical staining for MMP-2 or MMP-9, these molecules being detected by incubation with biotinylated anti-rabbit IgG antibody followed by streptavidin-CY3 conjugate, as described above. They were then postfixed by incubation for 30 minutes in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). The sections were rinsed and incubated overnight at RT with rabbit IgG anti-OT (1:5000) or anti-AVP, (1:2000) (gift from Dr. G. Alonso, Alonso, 1998) or anti-GFAP (1:500; Dako, Carpinteria, CA) antibody. Sections were washed in PBS and the bound primary antibodies were detected by incubation for 1 h at RT with FITC-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies. We checked the specificity of the double-immunofluorescence staining using two polyclonal primary antibodies, by carrying out experiments in which one of the two primary antibodies — anti-MMP2 or anti-AVP, anti-MMP2 or anti-OT, anti-MMP9 or anti-AVP and anti-MMP9 or anti-OT — was omitted. Fluorescent cells were identified with a Zeiss epifluorescence microscope (Axiovert 200M, AxioCam MRm).

In situ zymography

In situ zymography was carried out on sections for the detection of gelatinase proteolytic activity in cells, as described by Oh *et al.* (1999). This procedure was modified so as to make it possible to use it on our *ex vivo* acute model of mouse hypothalamus slices. Fresh, unfixed SON-containing slices were rapidly frozen and cut into 20 µm sections, which were mounted on aminoalkylsilane-treated slides. Control and treated fresh sections were incubated for 4 h, at 37°C with reaction buffer at pH 7.6 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM CaCl₂, and 0.03% sodium azide) supplemented with 50 µg/ml quenched fluorescein-labelled DQ gelatin (EnzCheck gelatinase/collagenase assay, Molecular Probes) and 0.2% agarose, in a moist dark chamber. The sections were washed with 0.05M PBS, pH 7.4 and distilled water, mounted in Mowiol and covered with a coverslip. A fluorescent signal appeared only after enzymatic cleavage of DQ gelatin, revealing local

net gelatinase activity on the sections. The specificity of the reaction was demonstrated, using the broad-spectrum metalloproteinase inhibitor, phenanthroline monohydrate (100 to 500 µg/ml).

Results

Immunoreactivity for MMP9 and MMP2 was stronger in the SON of noradrenaline-treated hypothalamic slices

Immunoreactivity for both MMP-9 and MMP-2 was observed in many cells of the SON (fig. 1A to D). In control slices, a weak fluorescent signal was detected for MMP9 (fig. 1A), restricted to the perinuclear area. In contrast, MMP-2 immunoreactivity (fig. 1C) was more intense in control slices, encompassing the entire perikaryon. After the incubation of slices for 4 h with NA, MMP-9-positive (fig. 1B) and MMP-2-positive (fig.1D) perikarya were more numerous than in the control slices (fig.1A, C). The entire SON was labelled.

Identification of cells containing MMP9 or MMP2 in the SON

We identified MMP-containing cells in the SON, by carrying out double immunohistochemical staining with OT, AVP and GFAP antibodies. As previously reported for the mouse SON (Maaloud, Grange-Messent *et al.*, 2007, *in press*), immunoreactivity for OT (fig. 2B) and AVP (fig. 2E) was found to have increased after 4 h of incubation with NA (control data not shown).

The OT-immunoreactive cell bodies were located primarily in the dorsal part of the SON (fig. 2B), whereas AVP-immunoreactive neurons were located primarily in the ventral portion of the SON (fig. 2E). MMP-9 was detected in OT-positive neurons (fig.2C). The few OT-negative cells labelled for MMP-9 also contained AVP, and AVP-immunoreactive cells also contained MMP-9 (fig. 2F). MMP-9 immunoreactivity was also detected in the GFAP-positive astrocytic processes of the glial limitans (fig.2I). MMP-2 immunoreactivity was observed in both OT-positive (fig. 3C) and AVP-positive neurons (fig. 3F), and was also detected in the external glial limitans and in some astrocytic processes (fig. 3I).

The gelatinolytic activity of MMP-9 and MMP-2 was enhanced in the SON of noradrenaline-treated hypothalamic slices

We determined the histological distribution of the gelatinolytic activity of MMP9 and MMP2 and assessed possible modifications to this activity during noradrenaline-induced chemical plasticity in the mouse SON, using *in situ* zymography on *ex vivo* brain slices. Slices of the hypothalamus were incubated with gelatin substrate, which is efficiently digested by MMPs. The observed fluorescence was proportional to MMP proteolytic activity. In control and treated slices, gelatinolytic activity was observed mostly in the dorsal and ventral parts of the SON. No other cells in the parenchyma displayed fluorescence. A weak fluorescent signal was detected in control slices (fig. 1E), and the number of fluorescent cells and the intensity of their fluorescence were clearly greater in slices treated with NA for 4 h (fig. 1F).

The distribution of these fluorescent cells corresponded to that of AVP and OT magnocellular neurons and astrocytes. Fluorescence was abolished by incubation with phenanthroline (data not shown).

Inhibition of the activity of MMP-2 and MMP-9 affects immunoreactivity for AVP and OT

We assessed the involvement of MMP-2 and MMP-9 in the increase in AVP and OT levels reflecting chemical plasticity, by carrying out experiments on sections treated with 1mM phenanthroline (MMP inhibitor) or with a mixture of phenanthroline and NA (1 mM and 10^{-4} M, respectively) for 4 h.

OT-immunoreactive cell bodies occupied the dorsal portion of the SON in control slices (fig. 4A), whereas vasopressin immunoreactivity was observed in numerous cells located in the ventral and lateral parts of the SON (fig. 4D).

Incubation with phenanthroline or phenanthroline plus NA decreased the numbers of OT- and AVP-containing neurons (fig. 4B, 4C and 4E, 4F, respectively), but the intensity of the fluorescent signal was more important in the phenanthroline plus NA-incubated NSO than in the phenanthroline-incubated NSO (fig. 4B, 4C and 4E, 4F).

Discussion

Chemical plasticity, as revealed by changes in AVP and OT expression in endocrine magnocellular neurons, has been established in the Tg8 transgenic mouse model (Vacher *et al.*, 2002), raising questions about the possible involvement of noradrenaline, the main monoaminergic input in the SON. We have also confirmed the involvement of noradrenaline in the regulation of AVP and OT expression in an *ex vivo* experimental

model of mouse hypothalamic slices (Maaloud, Grange-Messent *et al.*, 2007, *in press*). In the study reported here, we investigated the possible contribution of the gelatinases MMP2 and MMP9 to the structural plasticity observed during NA-induced chemical plasticity in the SON. We used our *ex vivo* model of hypothalamic slices incubated with 10^{-4} M NA for 4 h. This concentration was chosen based on previous studies carried out on brain slices, in which incubation in a bath of 10^{-4} M NA induced an optimal magnocellular neuron response (Daftary *et al.*, 1998; Grange-Messent *et al.*, 2004). We also tried incubating the slices with NA for 1 h, but no significant change in immunoreactivity or enzymatic activity was observed for the MMPs tested. We therefore present here only the significant results obtained after incubation with NA for 4 h. We focused on the SON, because these nuclei are known to display marked structural plasticity under chronic physiological stimulation, such as dehydration and lactation (Hawrylak *et al.*, 1998; Langle *et al.*, 2002, Oliet, 2002; Theodosios *et al.*, 2006). They also have a highly homogeneous cellular structure, being composed exclusively of magnocellular neurons and glial cells, whereas the paraventricular nucleus also includes parvocellular neurons.

We demonstrated that MMP-9 and MMP-2 were present in magnocellular neurons and astrocytes of the mouse SON, and that the activity of these enzymes was regulated by NA.

Immunohistochemistry demonstrated the presence of both MMP-9 and MMP-2 in the mouse SON under normal conditions (in the absence of NA treatment). These MMPs were distributed within magnocellular neurons and astrocytes. Double-labelling experiments showed that MMP-9 and MMP-2 colocalised with OT and AVP magnocellular neurons and, to a lesser degree, with astrocytes identified on the basis of the presence of the specific astrocytic intermediate filament protein, GFAP. This result is consistent with the findings of a previous study describing the distribution and expression of MMP-2 and MMP-9 in neurons and astrocytes of the rat hippocampus (Szklarczyk *et al.*, 2002). Neuronal MMP-9 appeared to be concentrated in the perinuclear compartment of neuronal cell bodies, whereas MMP-2 was distributed throughout the perikaryon.

Four hours of NA treatment increased MMP-9 and MMP-2 levels. This increase in immunoreactivity coincided with an increase in gelatinolytic activity. The effect of NA was abolished in the presence of the broad-spectrum MMP inhibitor, phenanthroline. Our results suggest that both MMP-9 and MMP-2 may be involved in triggering structural plasticity during noradrenaline-induced chemical plasticity in the mouse

neuroendocrine hypothalamus. These endopeptidases may be activated and regulated directly or indirectly by NA, triggering the proteolysis of some of the ECM molecules present in the surroundings of magnocellular neurons.

Our observations recall those of Briest *et al.*, (2003), who described the role of MMPs, and MMP-2 in particular, in the noradrenaline-induced remodelling of the ECM of rat hearts. In rat hearts, NA induces left ventricle hypertrophy (Barth *et al.*, 2000), which is accompanied by ECM remodelling, with high levels of collagen I and III mRNA, and high levels of MMP-2 activity (Briest *et al.*, 2001). However, the brain ECM is markedly different from that in other organs. The extracellular space between neurons in adult brains has no basal lamina and does not seem to contain such classical MMP-sensitive ECM proteins as laminins and collagens (Sugita *et al.*, 2001). However, MMP targets are available in the brain and may be involved in neuronal plasticity. Dystroglycan is a particularly interesting potential physiological target molecule for MMP activity (probably MMP-2 or MMP-9, see Yamada *et al.*, 2001). Indeed, Kaczmarek *et al.* (2002) showed that β -dystroglycan is also broken down proteolytically in the rat hippocampus in response to kainate, in a temporal pattern paralleling the increase in MMP activity, with β -dystroglycan playing an important role in LTP, serving as a model of neuronal plasticity (Moore *et al.*, 2002). Zhong *et al.* (2006) showed that both MMP2 and MMP9 could degrade the extracellular domain of β -dystroglycan in a rat schwannoma cell line culture. β -dystroglycan associates with α -dystroglycan in the dystroglycan complex, linking the ECM and the cortical cellular cytoskeleton. The intracellular domain of β -dystroglycan binds to the cytoplasmic protein dystrophin, which mediates signalling by binding to α -dystrobrevin and syntrophin, which in turn anchor signalling molecules, such as neuronal nitric oxide synthase (nNOS) to the dystroglycan complex (Grady *et al.*, 1999). As nNOS is present in the SON of mice and rats (Vacher *et al.*, 2003; Grange-Messent *et al.*, 2004) and is upregulated in the rat SON by NA (Grange-Messent *et al.*, 2004), the activation of MMP2 and MMP9 by NA may be mediated by NO, thus identifying an NA signalling pathway involved in the structural plasticity associated with chemical plasticity in the hypothalamo-neurohypophyseal system.

References

- Alonso, G. (1998) Effects of colchicine on the intraneuronal transport of secretory material prior to the axon: a morphofunctional study in hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. *Brain Res.*, **453**, 191-203.
- Barth, W. Deten, A. Bauer, M. Reinohs, M. Leicht, M. & Zimmer, HG. (2000) Differential remodeling of the left and right heart after norepinephrine treatment in rats: studies on cytokines and collagen. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **32**, 273-84.
- Bealer, S. L. & Crowley, W.R. (1998) Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats. *Am. J. Physiol.*, **274**, 453-8.
- Benson, D. L. Schnapp, L. M. Shapiro, L. & Huntley, G. W. (2000) Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol.*, **10**, 473-82.
- Briest, W. Holzl, A. Rassler, B. Deten, A. Baba, H. A. & Zimmer, H. G. (2003) Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts. *Cardiovasc. Res.*, **57**, 379-87.
- Briest, W. Holzl, A. Rassler, B. Deten, A. Leicht, M. Baba, H. A. & Zimmer, H. G. (2001) Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc. Res.*, **52**, 265-73.
- Daftary, S. S. Boudaba, C. Szabo, K. & Tasker, J. G. (1998) Noradrenergic excitation of magnocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus via intranuclear glutamatergic circuits. *J. Neurosci.*, **24**, 10619-28.
- Dityatev, A. & Schachner, M. (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 456-68.
- Fatar, M. Stroick, M. Griebel, M. & Hennerici, M. (2005) Matrix metalloproteinases in cerebrovascular diseases. *Cerebrovascular Diseases*, **20**, 141-51.
- Grady, R. M. Grange, R. W. Lau, K. S. Maimone, M. M. Nichol, M. C. Stull, J. T. & Sanes, J. R. (1999) Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 215-20.
- Grange-Messent, V. Raison, D. Dugas, B. & Calas, A. (2004) Noradrenaline up-regulates the neuronal and the inducible nitric oxide synthase isoforms in magnocellular neurons of rat brain slices. *J. Neurosci. Res.*, **78**, 683-90.

- Hawrylak, N. Fleming, J. C. & Salm, A. K. (1998) Dehydration and rehydration selectively and reversibly alter glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus and subjacent glial limitans. *Glia.*, **22**, 260-71.
- Kaczmarek, L. Lapinska-Dzwonek, J. & Szymczak, S. (2002) Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J.*, **21**, 6643-8.
- Khuth, S. T. Akaoka, H. Pagenstecher, A. Verlaeten, O. Belin, M. F. Giraudon, P. & Bernard, A. (2001) Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. *J. Virol.*, **75**, 8268-82.
- Langle, S. L. Poulain, D. A. & Theodosis, D. T. (2002) Neuronal-glia remodeling: a structural basis for neuronal-glia interactions in the adult hypothalamus. *J. Physiol. Paris*, **96**, 69-75.
- Liu, Y. X. Gao, F. Wei, P. Chen, X. L. Gao, H. J. Zou, R. J. Siao, L. J. Xu, F. H. Feng, Q. Liu, K. & Hu, Z. Y. (2005) Involvement of molecules related to angiogenesis, proteolysis and apoptosis in implantation in rhesus monkey and mouse. *Contraception*, **71**, 249-62.
- Maolood, N. Grange-Messent, V. Raison, D. & Hardin-Pouzet, H. (2007) Noradrenergic regulation in mice SON involves a nitric oxide pathway only to regulate AVP expression and not OT expression. *J. Neurosci. Res.*, (*in press*).
- Miyata, S. Nakashima, T. & Kiyohara, T. (1994) Structural dynamics of neural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus during dehydration and rehydration. *Brain Res. Bull.*, **34**, 169-75.
- Miyata, S. Nakatani, Y. Hayashi, N. & Nakashima, T. (2005) Matrix-degrading enzymes tissue plasminogen activator and matrix metalloprotease-3 in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res.*, **1058**, 1-9.
- Modney, B. K. & Hatton, G. I. (1989) Multiple synapse formation: a possible compensatory mechanism for increased cell size in rat supraoptic nucleus, *J. Neuroendocrinology*, **1**, 21-27.
- Moore, S. A. Saito, F. Chen, J. Michele, D. E. Henry, M. D. Messing, A. Cohn, R. D. Ross-Barta, S. E. Westra, S. Williamson, R. A. Hoshi, T. & Campbell, K. P. (2002) Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature*, **418**, 376-7.

- Mun-Bryce, S. & Rosenberg, G. A. (1998) Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **18**, 1163-72.
- Murphy, G. Stanton, H. Cowell, S. Butler, G. Knauper, V. Atkinson, S. & Gavrilovic, J. (1999) Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS*, **107**, 38-44.
- Nagy, V. Bozdagi, O. Matynia, A. Balcerzyk, M. Okulski, P. Dzwonek, J. Costa, R. M. Silva, A. J. Kaczmarek, L. & Huntley, G. W. (2006) Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J. Neurosci.*, **26**, 1923-34.
- Oh, L. H. Larsen, P. H. Krekoski, C. A. Edwards, D. R. Donovan, F. Werb, Z. & Yong V. W. (1999) Matrix metalloproteinase-9/ gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J. Neurosci.*, **19**, 8464-8475.
- Oliet, S. H. (2002) Functional consequences of morphological neuroglial changes in the magnocellular nuclei of the hypothalamus. *J. Neuroendocrinology*, **14**, 241-6
- Onaka, T. Luckman, S. M. Antonijevic, I. Palmer, J. R. & Leng, G. (1995) Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarii to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat. *Neuroscience*, **66**, 403-12.
- Piet, R. Vargova, L. Sykova, E. Poulain, D. A. & Oliet, S. H. (2004) Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2151-5.
- Pittman, R. N. & Buettner, H. M. (1989) Degradation of extracellular matrix by neuronal proteases. *Dev. Neurosci.*, **11**, 361-75.
- Rivera, S. & Khrestchatisky, M. (1999) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuronal plasticity and pathology. In Baudry, M., Thomsom, R. F. & Davis, J.L. (eds), *Advances in Synaptic plasticity*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 53-86.
- Rivera, S. Ogier, C. Jourquin, J. Timsit, S. Szklarczyk, A. W. Miller, K. Gearing, A. J. Kaczmarek, L. & Khrestchatisky, M. (2002) Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 19-32.
- Seiki, M. (1999) Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS.*, **107**, 137-43.

- Shioda, S. Yada, T. Muroya, S. Takigawa, M. & Nakai, Y. (1997) Noradrenaline activates vasopressin neurons via alpha1-receptor-mediated Ca²⁺ signaling pathway. *Neurosci. Lett.*, **226**, 210-2.
- Shioda, S. & Nakai, Y. (1992) Noradrenergic innervation of vasopressin-containing neurons in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *Neurosci. Lett.*, **140**, 215-8.
- Shiosaka, S. & Yoshida, S. (2000) Synaptic microenvironments--structural plasticity, adhesion molecules, proteases and their inhibitors. *Neurosci. Res.*, **37**, 85-9.
- Sofroniew, M. V. (1985) Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins. In Bjorklund, A, Hokfelt, T. (eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam Elsevier. P. 93-152.
- Sugita, S. Saito, F. Tang, J. Satz, J. Campbell, K. & Sudhof, T. C. (2001) A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *J. Cell Biol.*, **154**, 435-45.
- Szklarczyk, A. Lapinska, J. Rylski, M. McKay, R. D. & Kaczmarek, L. (2002) Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J. Neurosci.*, **22**, 920-30.
- Theodosis, D. T. Piet, R. Poulain, D. A. & Oliet, S. H. (2004) Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochem. Int.*, **45**, 491-501.
- Theodosis, D. T. Trailin, A. & Poulain, D. A. (2006) Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **290**, 1175-82.
- Vacher, C. M. Fretier, P. Creminon, C. Calas, A. & Hardin-Pouzet, H. (2002) Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J. Neurosci.*, **22**, 1513-22.
- Vacher, C. M. Hardin-Pouzet, H. Steinbusch, H. W. Calas, A. & De Vente, J. (2003) The effects of nitric oxide on magnocellular neurons could involve multiple indirect cyclic GMP-dependent pathways. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 455-66.
- Willoughby, J. O. Jervois, P. M. Menadue, M. F. & Blessing, W. W. (1987) Noradrenaline, by activation of alpha-1-adrenoceptors in the region of the supraoptic nucleus, causes secretion of vasopressin in the unanaesthetized rat. *Neuroendocrinology*, **45**, 219-26.

- Wright, J. W. & Harding, J. W. (2004) The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog. Neurobiol.*, **72**, 263-93.
- Yamada, H. Saito, F. Fukuta-Ohi, H. Zhong, D. Hase, A. Arai, K. Okuyama, A. Maekawa, R. Shimizu, T. & Matsumura, K. (2001) Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1563-9.
- Yong, V. W. Power, C. Forsyth, P. & Edwards, D. R. (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 502-11.
- Zhong, D. Saito, F. Saito, Y. Nakamura, A. Shimizu, T. & Matsumura, K. (2006) Characterization of the protease activity that cleaves the extracellular domain of beta-dystroglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 867-71.

Legends

Figure 1:

Immunofluorescent detection of MMP-9 (A, B) and MMP-2 (C, D) in the SON from hypothalamus slices incubated for 4 h with 10^{-4} M NA. A and C: Control experiment. Incubation with NA increased levels of immunoreactivity for MMP-9 and MMP-2 (B, D).

Fluorescence micrographs of hypothalamus slices showing *in situ* zymography (E, F) in the SON, in control slices (E) and after incubation for 4 h with NA (F). NA treatment slightly increased the intensity of fluorescence, indicating an increase in gelatinolytic activity in the SON of NA-treated hypothalamic slices.

OC, optic chiasma, Scale bar= 20 μ m.

Figure 2:

Immunolabelled sections from the SON included in slices incubated in the presence of 10^{-4} M NA. Colocalization is shown in yellow on the merged projection (C, F, I). MMP9 was colocalized not only with OT-positive neurons (C, inset) and AVP-positive cells (F, inset), but also with some astrocytic processes (I, inset).

Insets show boxed areas. OC: optic chiasma, Scale bar= 20 μ m.

Figure 3:

Immunolabelled sections from the SON included in slices incubated in the presence of 10^{-4} M NA. Colocalization is shown in yellow on the merged projection (C, F, I). MMP2 was colocalized not only with OT-positive neurons (C, inset) and AVP-positive cells (F, inset), but also with some astrocytic processes (I, inset).

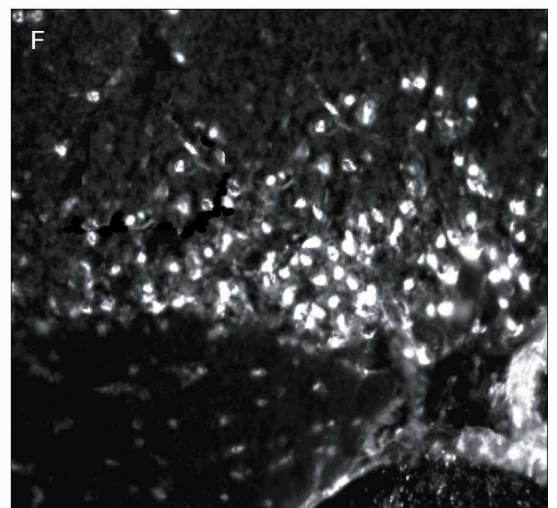
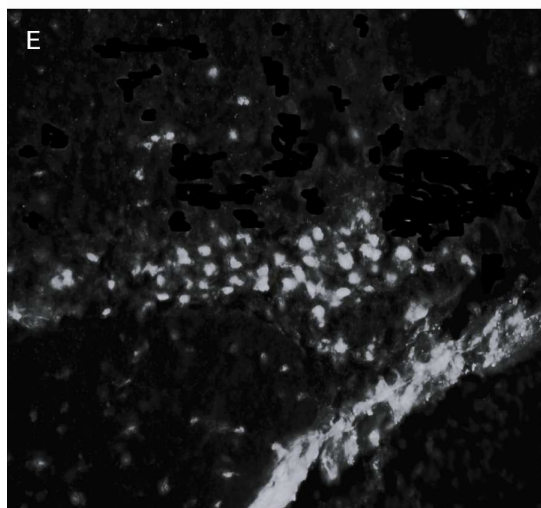
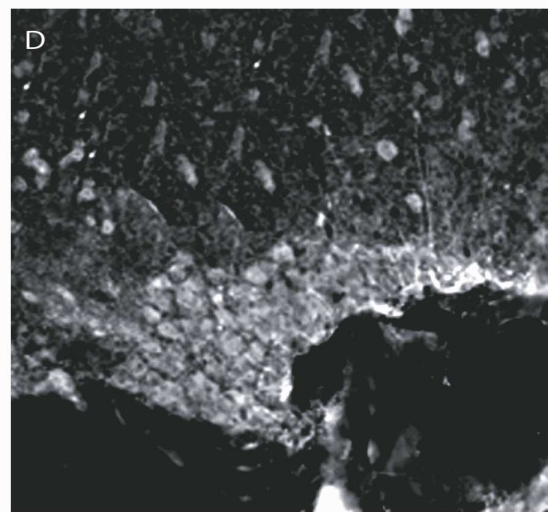
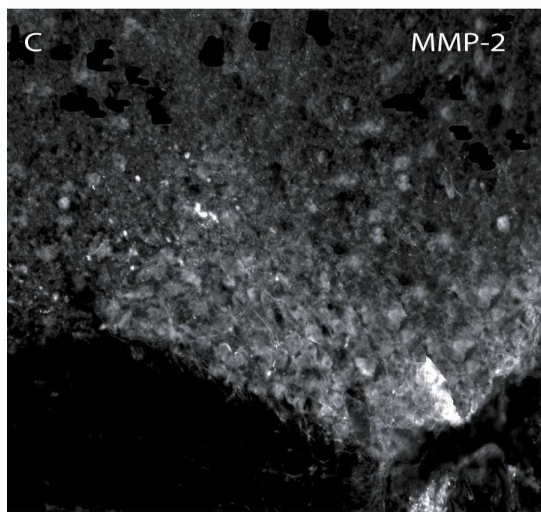
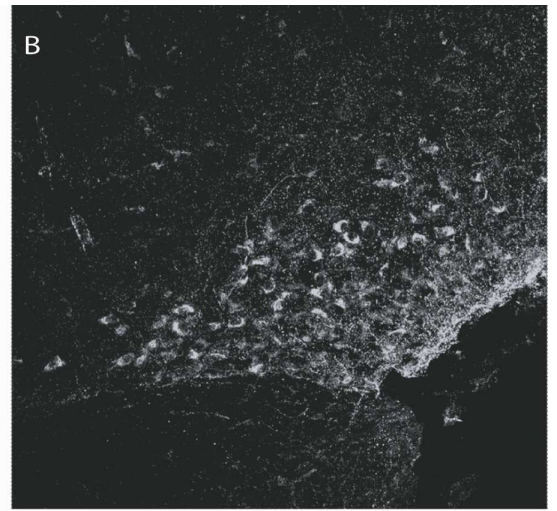
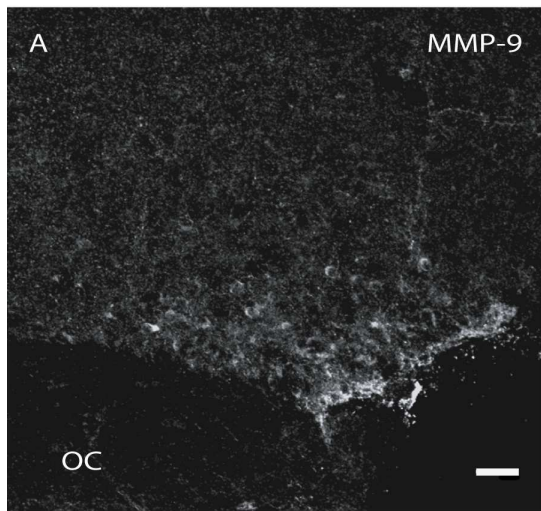
Insets show boxed areas. OC: optic chiasma, Scale bar= 20 μ m.

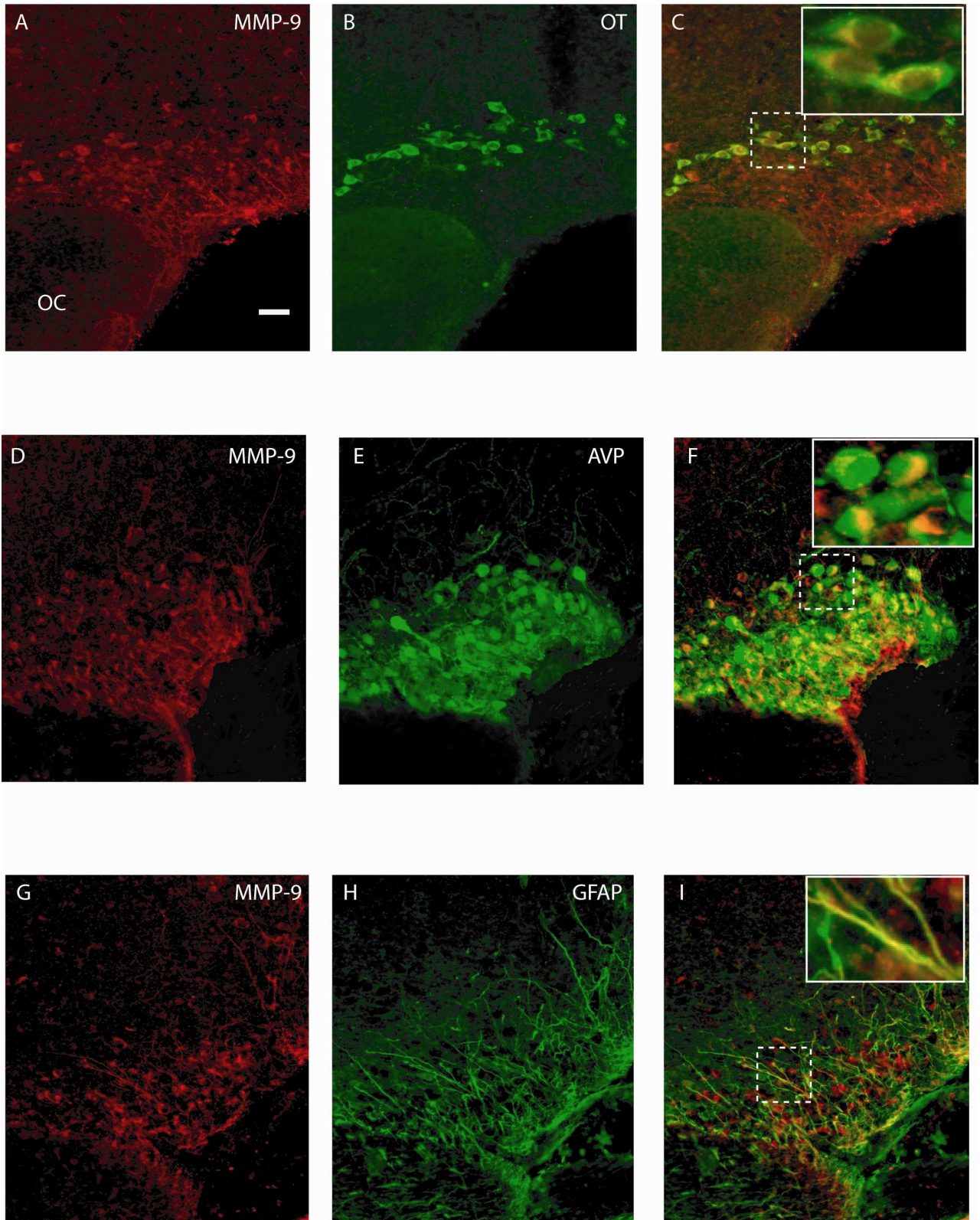
Figure 4:

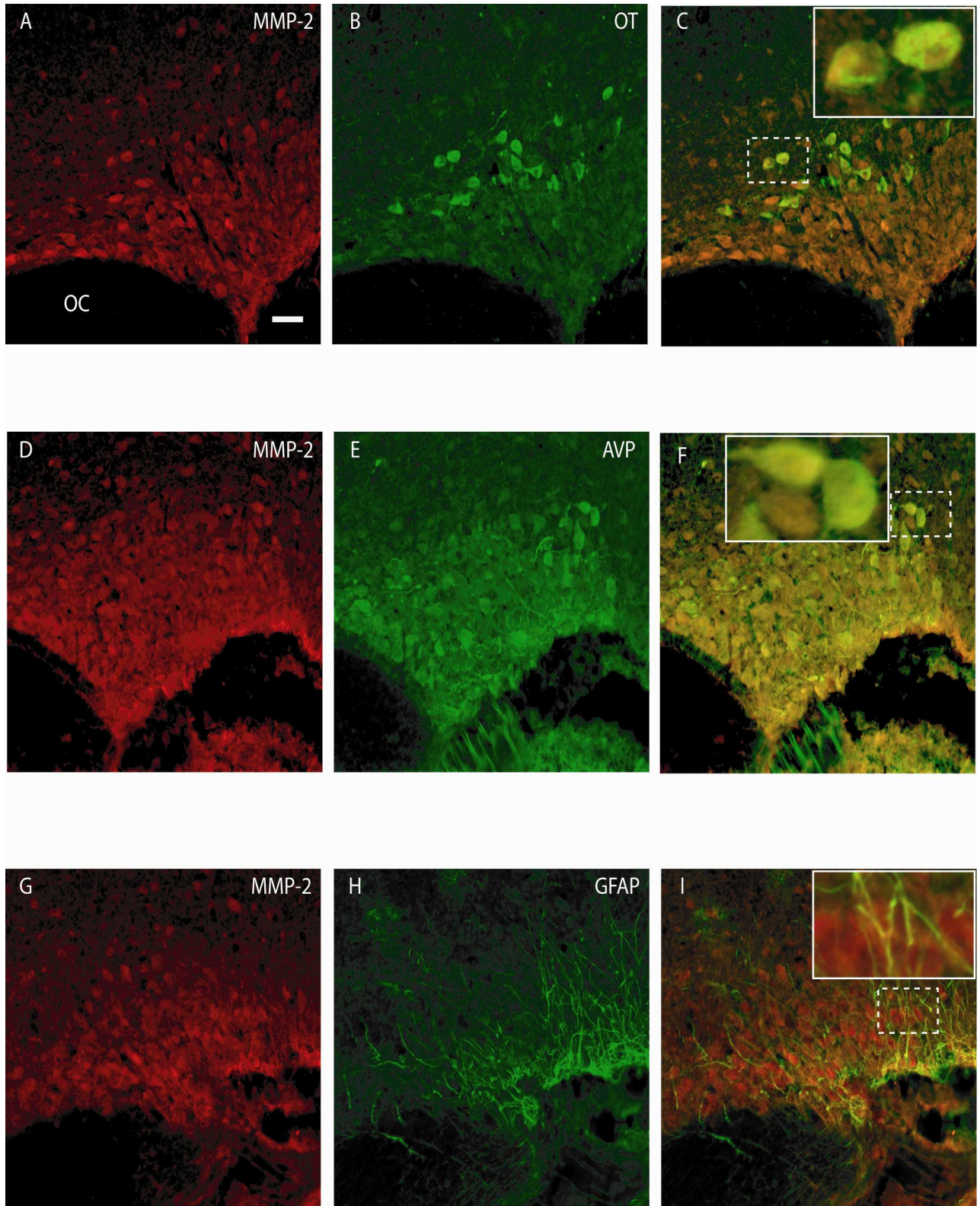
Immunohistochemical detection of OT (A, B, C) and AVP (D, E, F) in the SON included in slices incubated in the presence of 1mM phenanthroline (B, E) or 1mM phenanthroline plus 10^{-4} M NA

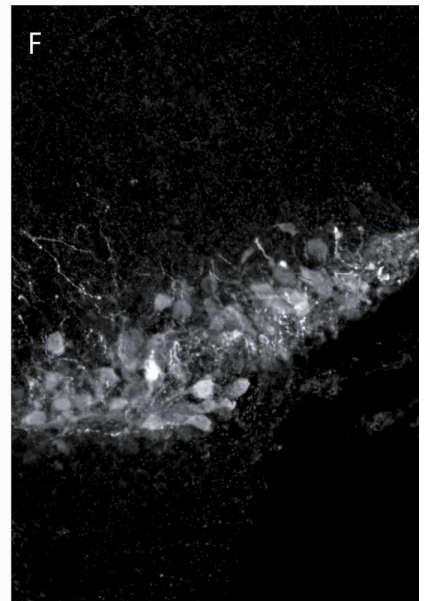
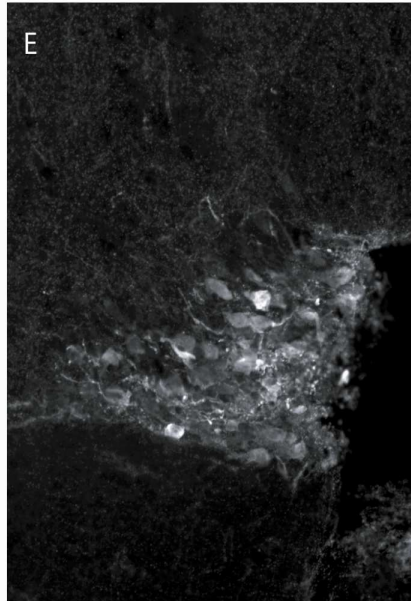
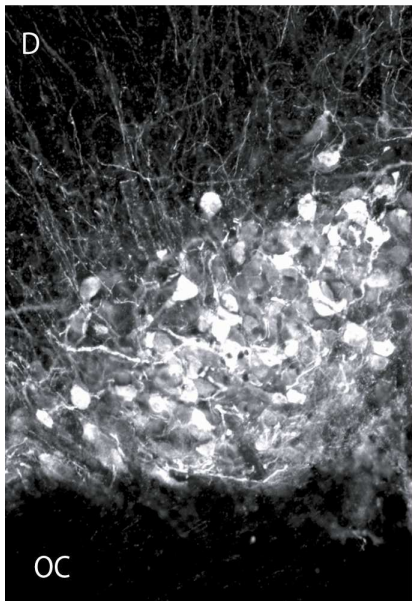
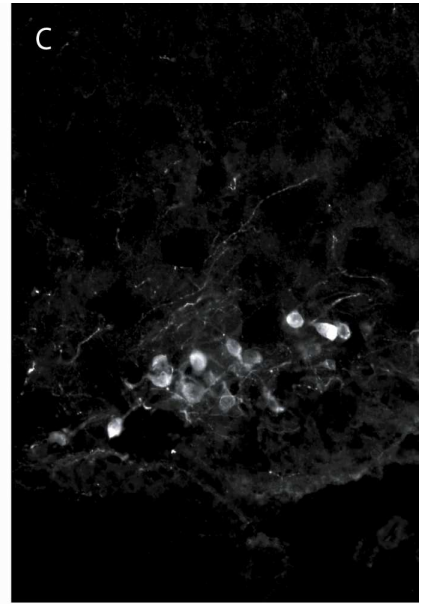
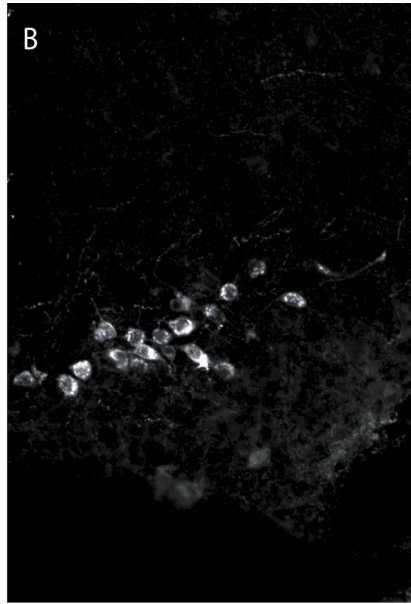
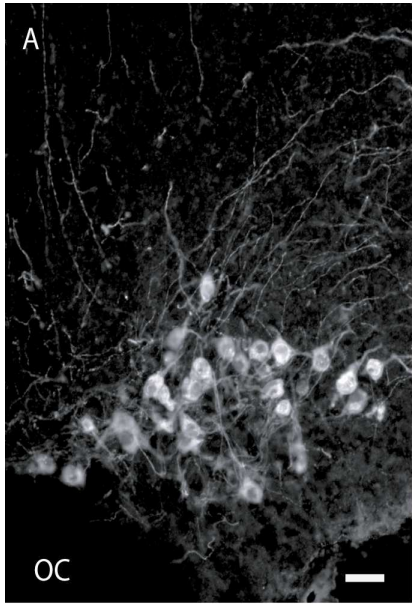
(C, F). Phenanthroline or phenanthroline plus NA treatment decreased the numbers of OT- and AVP-containing neurons (B, C and E, F respectively) compared with control (A, D), but the intensity of the fluorescent signal was more important in the phenanthroline plus NA-incubated SON (C, F) than in the phenanthroline-incubated SON (B, E).

OC: optic chiasma, Scale bar= 20 μ m.









Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Des travaux précédents de notre équipe (Vacher et al., 2002) nous ont permis de proposer deux voies de régulation de l'AVP et de l'OT par la NA, une voie directe *via* des récepteurs spécifiques aux deux hormones présents sur les neurones magnocellulaires, et une voie indirecte où la NA exerce son effet par l'intermédiaire d'interneurones glutamatergique ou GABAnergiques (Wang et al., 1998 ; Theodosios, 2002). Ainsi, plusieurs facteurs cellulaires ou moléculaires pourraient être impliqués dans cette régulation, notamment le NO, les molécules de la MEC ou les astrocytes. Cependant, jusqu'à présent, les mécanismes précis de cette régulation ne sont pas élucidés.

Ce travail que nous avons entrepris dans la continuité de ces observations, avait pour but de déterminer les facteurs qui seraient impliqués dans la voie indirecte de régulation de l'AVP et de l'OT par la NA. Nous avons ici démontré que le NO est un des facteurs impliqué dans la régulation de l'expression l'AVP mais pas dans celle de l'OT.

La deuxième partie de ce travail montre que les enzymes réglant la composition de la MEC pourraient également être impliquées dans les mécanismes de la régulation exercée par la NA.

II. Régulation de l'expression de l'AVP et de l'OT par la NA dans le NSO

Le système hypothalamo-neurohypophysaire est un modèle bien adapté pour étudier la plasticité physiologique aussi bien au niveau neurochimique que structural. D'une part, au niveau anatomique, les neurones magnocellulaires du NSO sont facilement identifiables grâce à leur grande taille, et d'autre part, ils sont localisés près du chiasma optique. Enfin, les seuls corps cellulaires présents dans le NSO sont ceux des neurones magnocellulaires. Par ailleurs, lors de stimulations physiologiques telles que la déshydratation, la parturition ou l'allaitement, la plasticité de ce noyau ne se limite pas à des aspects neurochimiques de modification de l'expression des neurotransmetteurs mais s'accompagne d'un remodelage structural, mettant en jeu à la fois les cellules gliales, la MEC et les molécules d'adhésion.

Le NSO est une structure richement innervée par les afférences noradrénergiques. Ces données anatomiques ont d'abord été mises en évidence chez le rat (Swanson et al., 1981 ; Alonso et Assenmacher, 1984 ; Shioda et Nakai, 1992) puis ont été confirmées chez la souris par Vacher et al., (2002). Des études électrophysiologiques et pharmacologiques ont démontré que la NA exerce

Discussion et perspectives

un effet stimulateur non seulement sur l'activité des neurones magnocellulaires vasopressinergiques ou ocytocinergiques (Willoughby et al., 1987; Kim et al., 1989 ; Faull et al., 1993; Bealer et Crowley 1998) mais aussi sur la synthèse des neuropeptides (Armstrong et al., 1986 ; Shioda et al., 1997 ; Vacher et al., 2002). Dans notre modèle *ex-vivo* sur tranches de souris C3H, le traitement par la NA induit une augmentation de l'expression de l'AVP et de l'OT ainsi qu'une augmentation des contenus cellulaires en neuropeptides dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques et ocytocinergiques. Ces résultats confirment ceux obtenus *in-vivo* où l'augmentation des niveaux d'AVP ou d'OT ainsi que de leurs ARNm sont parallèles à celle de la NA dans le NSO (Vacher et al., 2002). L'augmentation de l'expression d'AVP et OT par la NA pourrait être due à une stimulation de la synthèse de ces neuropeptides ou d'une diminution de leur libération.

Bien que plusieurs travaux aient montré que la NA en général exerce un effet stimulateur sur les neurones vasopressinergiques *via* des récepteurs α -1 adrénergiques, elle peut également inhiber la libération du peptide *via* des récepteurs α -2 et β dans le cas de grandes concentrations en NA (Armstrong et al., 1986 ; Yamashita et al., 1987; Willoughby et al., 1987; Leibowitz, 1990 ; Khanna et al., 1993 ; Shioda et al., 1997). En ce qui concerne l'OT, sa modulation par la NA dans le NSO est globalement similaire à celle de l'AVP. De nombreuses études ont montré l'implication de la NA dans le contrôle de l'activité des neurones ocytocinergiques et de la sécrétion du peptide durant le réflexe de tétée et de la parturition (Bealer et Crowley, 1999 ; Song et al., 1988 ; Theodosios et al., 2004). La NA peut exercer un effet stimulateur ou inhibiteur sur la sécrétion de l'OT selon le type de récepteur de la NA (Song et al., 1988). En effet, la NA pourrait dépolariser les neurones ocytocinergiques et de ce fait, augmenter la décharge des neurones par les récepteurs α -adrénergiques (Yamashita et al., 1987). De plus, un effet stimulateur par la NA a été mis en évidence en montrant que le blocage du système noradrénergique inhibe la réponse de l'OT à des stimuli tels que la lactation, le stress, le traitement par des opiacés ou par la cholecystokinine (Crowley et al., 1992; Brown, 1995; Onaka, 1996). Enfin, le traitement par l' α -MPT, un inhibiteur de synthèse des catécholamines, est associée à une diminution des contenus en AVP et OT ainsi qu'en ARNm-AVP et ARNm-OT dans le NSO (Vacher et al., 2002).

II. Implication du NO à la chaîne de traduction du signal de la NA dans le NSO

Les afférences noradrénergiques contactent les neurones peptidergiques du NSO non seulement de façon directe (Armstrong et al., 1986) mais aussi de manière indirecte via des neurones ou interneurones glutamatergiques et GABAergiques. Ainsi, dans le NSO, un quart des terminaisons faisant synapses sur les neurones vasopressinergiques ou ocytocynergiques sont glutamatergiques (Theodosis, 2002) et presque la moitié des synapses proviennent d'interneurones GABAergiques (Oliet et Piet, 2004). Plusieurs études ont suggéré que l'effet de la NA pourrait s'exercer à la fois directement mais aussi indirectement sur les neurones magnocellulaires. Par exemple, il existe un parallélisme entre l'élévation des taux glutamate, de NA et le déclenchement de la parturition (Herbison et al., 1997). De même, les concentrations de GABA diminuent dans le NSO lors d'une hypertension artérielle déclenchée par un agoniste α -adrénergique (Voisin et al., 1994). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au **monoxyde d'azote** dont la voie d'activation est stimulée par le glutamate, modulée par le GABA et capable d'inhiber les neurones magnocellulaires (Srisawat et al. 2000). En effet, plusieurs travaux ont montré que les neurones peptidergiques du NSO et du NPV produisent du NO (Bredt et al., 1991 ; Vacher et al., 2003 ; Grange-Messent et al., 2004 ; Xiao et al., 2005 ; Gonzalez-Hernandez et al., 2006), notamment sous l'influence du glutamate et du GABA environnant. En plus, il a été démontré que le NO représente au même titre que la NA, un modulateur important de l'activité des neurones magnocellulaires dans le NSO et NPV (Kadowaki et al., 1994 ; Srisawat et al., 2000 ; Kadekaro, 2004). Ainsi, la question que nous nous sommes posée était de savoir si la NA pouvait réguler l'expression de la nNOS et de la iNOS dans les neurones magnocellulaires du NSO.

1. Effet de la NA sur l'expression de la nNOS et de la iNOS dans le NSO

Les résultats obtenus suite à l'application de NA sur des tranches d'hypothalamus contenant le NSO nous ont permis de mettre en évidence l'effet de la NA sur l'expression de la nNOS et de la iNOS. En effet, l'application par la NA conduit dès la première heure d'application à une augmentation de l'expression de nNOS et iNOS dans les cellules magnocellulaires ainsi qu'une augmentation de l'activité NADPH-diaphorase, enzyme responsable du recyclage du NADPH et

Discussion et perspectives

dont l'activité varie de façon similaire à celle de la nNOS dans le NSO. L'immunodétection de la eNOS a montré que cette isoforme n'est pas présente dans le NSO.

Une telle stimulation par la NA sur l'expression de nNOS et iNOS a été déjà rapportée chez le rat (Grange-Messent et al., 2004). D'autre part, Vacher et al., (2003) ont montré que la NA induit la production de NO. Cette production s'accompagne d'une augmentation de la production de GMPc, indiquant une activation de la voie NOS dans les neurones magnocellulaires sous l'effet d'afférences noradrénergiques. La NA pourrait agir sur l'expression de nNOS et iNOS via des récepteurs α -1 qui induisent une augmentation intracellulaire des concentrations du calcium, qui à son tour induit avec la calmoduline une activation des NOS (Canteros et al., 1996). En outre, une activation de la NOS par le glutamate *via* des récepteurs NMDA a été mise en évidence dans le cervelet du rat (Bredt et Snyder 1989; Garthwaite et al., 1989).

2. Identification des cellules exprimant la nNOS et l'iNOS dans le NSO

Par une double détection immunohistochimique de la nNOS ou de la iNOS avec des marqueurs cellulaires tels qu'OT, AVP, et GFAP, nous avons montré que les neurones exprimant la nNOS et la iNOS correspondent strictement à des neurones magnocellulaires et non à des astrocytes et que le traitement par la NA induit une augmentation du nombre des neurones OT exprimant la nNOS ou la iNOS, et des neurones à AVP exprimant la iNOS.

En effet, nos résultats montrent que les neurones exprimant la nNOS sont exclusivement de nature ocytocinergique et pas vasopressinergique. Ils sont en accord avec ceux obtenus par Vacher et al., (2003). Or, les données de la littérature rapportent une localisation partagée entre les neurones ocytocinergiques et vasopressinergiques pour la forme neuronale de la NOS dans le NSO et le NPV chez le rat (Grange-Messent et al., 2004; Xiao et al., 2005; Gonzalez-Hernandez et al., 2006; Yuan et al., 2006). Il semble donc que cette distribution soit différente chez la souris. De telles différences entre espèces ont été montrées chez le hamster sibérien et le rat : dans le noyau suprachiasmatique, seul un dense faisceau de fibres et de rares corps cellulaires immunopositifs pour la nNOS ont été détectés (Reuss et al., 1995), alors que chez la souris, de nombreux corps cellulaires nNOS-immunoréactifs ont été détectés (Wang et Morris, 1996). Chez la souris, Vacher et al., (2003) ont montré que l'activité NADPH-diaphorase ainsi que l'immunoréactivité de la

Discussion et perspectives

nNOS du NSC est principalement localisée dans un dense faisceau de fibres. Ce résultat est en accord avec le résultat obtenu chez la souris par Wang et Morris (1996) et chez le rat par Chen et al., (1997).

En ce qui concerne la iNOS, nos résultats montrent que la iNOS est exclusivement exprimée dans les neurones magnocellulaires ocytocinergiques et vasopressinergiques. Ce résultat est en accord avec le marquage iNOS-immunoréactif chez le rat (Grange-Messent et al., 2004). Ces résultats montrent que la iNOS pourrait être exprimé de façon constitutive sous l'influence de signaux non immunitaires et non-inflammatoires. En effet, une étude menée par Nathan et Xie (1994) laisse supposer que l'expression de la iNOS pourrait être induite à la fois par une voie calcium-dépendante ou calcium-indépendante, mais l'implication de cette double voie reste à confirmer.

L'effet positif de la NA sur l'expression et l'activation de la NOS dans le NSO nous a conduit à rechercher si le NO pourrait représenter un facteur de dans la voie de régulation d'AVP et d'OT par la NA.

3. Le NO participe à la chaîne de transduction du signal dans la régulation de l'expression d'AVP mais pas celle d'OT par la NA

Afin de déterminer si le NO intervient dans la voie de signalisation de la NA dans la régulation de l'AVP et de l'OT, nous avons traité des tranches d'hypothalamus de souris C3H maintenues en survie par un inhibiteur de NOS, le L-NAME seul ou combiné avec la NA, et un donneur de NO, le SNP. Nos résultats montrent que l'application de L-NAME seul n'a aucun effet sur les contenus des NSO en AVP. En revanche, l'application de L-NAME combinée avec celle de la NA supprime l'effet stimulateur de la NA, ce qui suggère l'implication du NO dans l'action de la NA sur l'AVP. Par ailleurs, l'application de SNP induit une augmentation du contenu des NSO en AVP, vérifiant ainsi que le NO stimule l'expression d'AVP. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études montrant un effet modulateur de NO sur la sécrétion d'AVP. Yamaguchi et Hama (2003) ont montré que l'application du SNP dans la région antéroventrale du 3^{ème} ventricule (AV3V) facilite la sécrétion basale d'AVP. D'autre part, Ventura et al. (2005) ont montré que le NO a un effet stimulateur sur l'AVP en réponse à l'hypernatrémie. De plus, le NO agit comme un facteur stimulateur dans la sécrétion d'AVP induite par l'hypotension (Cao et al., 1996). Par

Discussion et perspectives

ailleurs, il été rapporté que le NO stimule la libération des neurotransmetteurs impliqués dans la sécrétion d'AVP tels que les catécholamines et le glutamate (Yamaguchi et Hama, 2003). Notre étude suggère que le NO produit par les neurones magnocellulaires diffuse dans l'espace extracellulaire et agit sur l'expression d'AVP par un mécanisme paracrine ou autocrine indépendamment du signal GMPc puisque aucune détection de GMPc dans les neurones vasopressinergiques n'a été mise en évidence (Vacher et al., 2003). Le NO pourrait exercer son effet sur les neurones vasopressinergiques via la nitrosylation de protéines (Terrell, 2003), mécanisme que nous exposerons dans le paragraphe suivant.

En ce qui concerne l'OT, le NO ne semble pas intervenir dans la voie de régulation de ce peptide par la NA puisque l'addition de L-NAME dans le milieu d'incubation ne supprime pas l'effet stimulateur de la NA sur le contenu de l'OT. De plus, l'application de SNP n'affecte pas non plus le contenu en OT, ce qui suggère que l'expression d'OT est indépendante du NO. Nos résultats sont en accord avec le travail de Nomura et al. (2005) qui a montré qu'aucune variation de l'expression d'OT n'était observée chez des souris knock-out pour la nNOs et la iNOS.

4. L'effet du NO est indépendant du GMPc dans la voie de régulation de l'AVP par la NA

Le NO est un gaz qui possède à la fois des propriétés de messager inter- et intra-cellulaires (Bredt et Snyder, 1992). Il est produit à partir de L-arginine par les NO synthases (NOS), en présence de NADPH-diaphorase.

En général le NO atteint ses cibles cellulaires en diffusant dans l'environnement proche (quelques centaines de microns). La plupart des fonctions physiologiques du NO proviennent de l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs) et par conséquent, de l'augmentation des taux de GMPc dans les cellules cibles (Murphy, 2000).

Dans notre travail, l'effet du NO ne s'exerce vraisemblablement pas *via* le GMPc puisqu'il a été déjà rapporté chez la souris que les neurones à AVP et à OT produisent du NO et qu'aucune détection du GMPc n'a été observée dans ces neurones (Vacher et al., 2003), contrairement à ce qui se produit chez le rat où les neurones vasopressinergiques et ocytocinergiques expriment des

Discussion et perspectives

niveaux élevés de GMPc (Stren and Zhong, 2005). Il faut donc supposer que le NO exerce son effet par un mécanisme alternatif.

Des cibles potentielles pour le NO autres que l'activation de GCs ont été décrites. Tel est le cas de l'ADP ribosyltransférase et la modulation des canaux ioniques de certains neurones centraux tels que le canal BK (Ca^{2+} -activated K^+ channel), (Ahern et al., 1999 ; Terrell et al., 2003 ; Kadakaro et al., 2006). Ahern et ses collègues ont rapporté que le NO induit une activation du canal BK dans terminaisons axonales du lobe postérieur de l'hypophyse *via* un mécanisme GMPc-indépendant. Dans les neurones, le canal BK participe à la repolarisation et à la hyperpolarisation du potentiel d'action, ce qui affecte la sécrétion des neurotransmetteurs (Kaczorowski et al., 1996) et de ce fait, l'excitabilité des neurones. Ainsi, l'activation de ce canal par le NO dans les terminaisons des neurones magnocellulaires dans le lobe postérieur de l'hypophyse induit une diminution de l'excitabilité des terminaisons.

Un des mécanismes par lesquels les effets de NO sont médiés, est la réaction de NO avec des résidus de cystéine des protéines (le NO réagit avec le groupe thiol de la cystéine), un processus connu sous le nom de nitrosylation. La nitrosylation est une modification post-traductionnelle qui affecte différentes protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires. C'est un phénomène réversible similaire à la phosphorylation ou à l'acétylation pour réguler des processus physiologiques (Stamler et al., 1997 ; Stamler et al., 2001). Ainsi, l'activité biologique du récepteur de NMDA est régulée par la S-nitrosylation déclenchée par le NO. C'est cette première découverte qui a permis l'identification de plusieurs cascades dans la voie du NO expliquant son aspect spatiotemporel (Stamler et al., 2001).

La conséquence fonctionnelle de la nitrosylation de la protéine dépend de la protéine affectée. En effet, pour certaines protéines telle que la caspase, la nitrosylation induit une diminution de l'activité de l'enzyme, tandis que pour d'autres protéines, telles que les métalloprotéinases, la nitrosylation induit l'activation de ces enzymes (Benhar et Stamlar 2005; Gu et al., 2002 ; Liu et Rosenberg, 2005).

Discussion et perspectives

5. Le NO impliqué dans la voie de signalisation de la NA dans la régulation d'AVP provient de l'activité de la nNSO et de la iNOS

Le NO est synthétisé par l'activation d'une famille d'enzymes, les NOS, constituée principalement de trois isoformes, la nNOS, la eNOS et la iNOS. Dans notre étude nos résultats montrent que le NO impliqué dans la voie de la signalisation de l'AVP provient de l'activité à la fois de la nNOS et de la iNOS. En effet, l'application d'un chélateur du Ca^{+2} , l'EGTA en présence de NA, induit une diminution de moitié du contenu de l'AVP par rapport à l'application de NA seule dans le NSO, indiquant que les formes constitutives et inductible sont à l'origine du NO produit dans le NSO. Les formes constitutives de la NOS sont la nNOS et la eNOS. Etant donné que nous avons montré par immunohistochimie l'absence de la eNOS dans le NSO, notre résultat suggère que la source du NO impliqué dans la régulation d'AVP est produite essentiellement par la nNOS et la iNOS.

III. Modification de la matrice extracellulaire au cours de la plasticité neurochimique du NSO

Les changements morphologiques des noyaux magnocellulaires survenant lors des stimulations physiologiques ne se restreignent pas aux astrocytes et aux neurones mais affectent également la matrice extracellulaire, les cellules gliales et les molécules d'adhésion pour permettre les réarrangements des cellules entre elles. De tels phénomènes se produisent dans le SNC au cours du développement. Dans le système hypothalamo-neurohypophysaire, à l'âge adulte, les neurones et les cellules gliales continuent à exprimer des molécules à caractère juvénile, permettant cette plasticité originale.

Les neurones magnocellulaires subissent une plasticité structurale remarquable en réponse à des stimulations physiologiques chroniques telles que la lactation et la déshydratation (Theodosis et al., 2004 ; Theodosis et al., 2006). Cette plasticité se manifeste par la rétraction des cellules gliales de leur position habituelle entre les cellules adjacentes ou les dendrites voisins, ce qui entraîne une apposition directe des membranes (Theodosis, 2002 ; Oliet et al., 2006). Dans les conditions basales de neurosecrétion, les terminaisons axonales des neurones magnocellulaires sont

Discussion et perspectives

également entourées par des pieds astrocytaires (les pituicytes). Lors d'une stimulation chronique, le contact direct des terminaisons neuronales avec la lame basale des capillaires se renforce par la rétraction des pieds pituicytaires ce qui facilite une libération intense des peptides (Miyata et Hatton, 2002). Plusieurs types de molécules d'adhésion cellulaire telles que la NCAM, la glycoprotéine F3 et des molécules de la MEC telles que la ténascine-C et le phosphocan ont été mis en évidence dans l'axe hypothalamo-neurohypophysaire. Ces molécules sont considérées comme des candidats potentiels dans la plasticité structurale de ce système (Langle et al., 2002 ; Theodosios et al., 2004).

Les premiers travaux réalisés dans notre équipe sur des souris transgénique Tg8, (lignée des souris knock-out pour la MAO-A, principale enzyme de dégradation des monoamines) ont montré au niveau du NSO et NPV, une importante augmentation de l'expression de ténascine-C dans les astrocytes et de sa sécrétion dans le compartiment extracellulaire, indiquant par là que les monoamines sont impliquées dans le contrôle de la plasticité structurale.

Les métalloprotéinases (MMP) sont considérées comme des facteurs importants qui contribuent à différents processus liés à la fois au développement et aux pathologies du SNC incluant la mort cellulaire et le remodelage tissulaire (Coussens et al., 2001). Récemment, les neurobiologistes se sont intéressés à l'implication potentielle des MMPs et des TIMP dans la neuroplasticité et les neuropathologies (Yong et al., 2001). En effet, il a été montré que les MMPs en particulier la MMP2 et la MMP9 sont surexprimées après ischémie cérébrale et qu'elles sont la cause de la destruction de la barrière hématoencéphalique et de la réponse neuroinflammatoire (Planas et al., 2000). Dans le cerveau, les MMPs participent à la réponse inflammatoire ainsi qu'aux interactions neurones/cellules gliales, en contrôlant l'activité des cytokines, des molécules d'adhérence cellulaires (CAM) et des chimiokines (Rivera et al., 2004). D'autre part, l'activité non contrôlée des MMPs déstabilise la MEC et altère les interactions cellule-matrice et CAM-cytosquelette pour induire la mort neuronale. Inversement, l'inactivation par protéolyse d'un facteur d'apoptose comme FasL (ligand de Fas) a des effets neuroprotecteurs (Ethel et al., 2002).

Dans le système nerveux intact, la matrice extracellulaire n'exerce pas seulement un rôle morphologique mais aussi un rôle fonctionnel. Par exemple, les MMPs, régulent l'activité biologique des molécules de la matrice et peuvent dégrader des neuropeptides, notamment la galanine (Jureus et al., 1998) et d'autre part, elles interagissent avec des facteurs trophiques indispensables à la survie neuronale ou à la morphogénèse.

Discussion et perspectives

1. Expression de la MMP2 et la MMP9 et leur régulation par la NA dans le NSO

La distribution et la localisation cellulaire et subcellulaire de la MMP2 et la MMP9 sont largement illustrées dans l'hippocampe et le cervelet (Vaillant et al., 1999 ; Szklarczyk et al., 2002). Dans notre étude, nous avons montré que ces deux molécules sont également présentes dans les noyaux magnocellulaires. Comme nous l'avons déjà souligné, les noyaux magnocellulaires sont richement innervés par les afférences noradrénergiques et la NA exerce une action modulatrice aussi bien sur l'activité des neurones magnocellulaires que sur la synthèse du peptide (Vacher et al., 2002). Notre travail indique que la NA exerce aussi une activité régulatrice sur la structure du noyau lui-même puisque nous avons observé sur des tranches traitées par la NA pendant 4h une augmentation de l'expression de la MMP2 et la MMP9 dans les neurones magnocellulaires du NSO. En effet, les MMPs pourraient être impliquées dans la plasticité structurale en dégradant la MEC entourant les neurones magnocellulaires. D'autre part l'augmentation de l'expression de la MMP2 et la MMP9 par la NA fournit un nouvel élément, indiquant que le rôle des MMPs ne se limite pas à des aspects pathologiques.

Dans notre modèle *ex-vivo*, les effets exercés par la NA sur l'expression de la MMP2 et la MMP9 dans le NSO sont activateurs. Un tel contrôle de la NA sur l'expression de la MMP2 ou la MMP9 n'a jamais été mis en évidence auparavant dans le SNC. Cependant, cela a déjà été démontré dans les tissus périphériques, en particulier dans des cas de pathologies telles que des cellules cancéreuses. Une étude récente menée par Yang et al., (2006) a montré un effet stimulateur par la NA sur l'expression de la MMP2 et la MMP9 dans des cellules tumorales de carcinome nasopharyngé. Par ailleurs, Briest et al. (2003) ont montré que l'infusion de la NA dans les ventricules cardiaques induit une augmentation de l'expression de la MMP2.

La NA pourrait agir sur l'expression de la MMP2 et la MMP9 d'une part, par l'intermédiaire de ses récepteurs présents dans les noyaux magnocellulaires : il a été démontré que la stimulation de récepteur β -adrénergique induit une augmentation de l'expression d'ARNm de MMP2 et l'expression de la protéine dans les myocytes chez le rat (Menon et al., 2005). D'autre part, la NA pourrait agir indirectement *via* le NO puisqu'on a déjà montré que la NA stimule la production du NO dans le NSO (article 1). Plusieurs travaux ont montré l'implication du NO dans

Discussion et perspectives

l'activation des MMPs et cette activation pourrait passer par la voie du GMPc ou la S-nitrosylation (Gu et al., 2002 ; Manabe et al., 2005). De ce fait il est possible que la NA induite l'expression de la MMP2 et la MMP9 par le NO. Il serait nécessaire de réaliser des études supplémentaires pour mieux préciser les mécanismes de régulation des MMPs par la NA.

2. Co-expression de la MMP2 et la MMP9 avec l'AVP, l'OT et la GFAP dans le NSO

La distribution cellulaire de la MMP2 et la MMP9 dans le NSO montre que ces MMP sont exprimées par les neurones vasopressinergiques, les neurones ocytocinergiques et les astrocytes. La signification ou l'importance de la présence de la MMP2 et la MMP9 dans les neurones magnocellulaires n'est pas connue. Cependant il est probable qu'elles participent à la plasticité structurale du système hypothalamo-neurohypophysaire, réarrangements neurone-neurone et neurone-cellules gliales en réponse à des stimulations physiologiques chroniques (Theodosis et al., 2004 ; Mueller et al., 2005 ; Monlezun et al., 2005 ; Catheline et al., 2006). Ces changements sont accompagnés par la formation de synapses multiples, des appositions directes des neurones et la rétraction des pieds astrocytaires. Pour expliquer ces réarrangements neuronaux, nous suggérons que la MMP2 et la MMP9 dégradent la MEC et de ce fait, facilitent le réarrangement structural. Il a été montré la présence de la chondroïtine sulfate proteoglycan (CSPG), et du phosphocane beta dans le NSO sous forme d'un réseau péri-neuronal autour des corps cellulaires d'AVP. Après une semaine de déshydratation le niveau de cette molécule est diminuée (Miyata et al., 2004). D'autre part, il a été montré que les MMP sont capables de digérer la phosphocane (Muir et al., 1994). Enfin, il a été rapporté que la dégradation de CSPG de la MEC permet une interaction libre entre les neurones et d'autre part, permet la croissance des axones et des dendrites dans l'espace extracellulaire (Pizzorusso et al., 2002 ; Fox et Katerson, 2002).

Dans plusieurs tissus, y compris le cerveau, les MMPs jouent un rôle critique dans la régulation fonctionnelle et dans le remodelage structural au cours de certaines pathologies (Yong et al., 2001). Les conséquences du clivage protéolytique des molécules cibles des MMPs sont variées. En effet, il pourrait entraîner des changements dans les contraintes physiques de l'environnement pericellulaire aussi que dans la signalisation en libérant des molécules séquestrées telles que des facteurs de croissance et des fragments bioactifs (Nagase et Woessner 1999).

3. La NA augmente l'activité enzymatique de la MMP2 et la MMP9 dans le NSO

Afin de déterminer la localisation histologique de l'activité enzymatique de la MMP2 et la MMP9 et si cette activité a été modifiée ou non durant la plasticité neurochimique induite par la NA, nous avons utilisé la technique de zymographie in situ. Cette technique consiste à appliquer sur des coupes non fixées de la gélatine (substrat des gélatinases endogènes) couplée à la fluorescéine piégée. Lorsque les MMP des cellules clivent ce substrat, la fluorescence est émise proportionnellement à l'activité protéolytique. La MMP2 et la MMP9 sont actives dans des conditions normales, et l'application de la NA pendant 4h induit une augmentation de l'activité protéolytique de ces gélatinases. De nombreux travaux ont déjà démontré que les MMP sont fonctionnelles dans le cerveau adulte et que leur activité peut être contrôlée par les neurotransmetteurs. Ainsi il a été montré que l'application de kainate induit une augmentation de l'activité enzymatique de la MMP9 (Szkarczyk et al., 2002).

4. L'inhibition pharmacologique de l'activité MMP2 et MMP9 modifie l'expression de l'AVP et de l'OT dans le NSO

Les résultats obtenus suite à l'application d'un inhibiteur des MMPs, la phénanthroline, nous ont permis de mettre en évidence une implication de la MMP2 et la MMP9 dans la plasticité neurochimique induit par la NA dans le NSO. En effet, l'application de la phénanthroline conduit à une diminution de contenu en AVP et en OT dans les neurones magnocellulaires. Ces résultats indiquent que l'effet de la NA sur l'AVP et l'OT pourrait être médié par la MMP2 et la MMP9.

La diminution de l'expression de l'AVP et l'OT pourrait être induite soit par l'augmentation de la libération de ces neuropeptides ou par une diminution de la synthèse. Il serait donc nécessaire de réaliser l'étude d'hybridation in situ afin de confirmer cette hypothèse.

Discussion et perspectives

Nous avons donc démontré que la MMP2 et la MMP9 sont indispensables dans la voie de la régulation de l'AVP et l'OT par la NA. Le monoxyde d'azote est également indispensable dans cette régulation pour les neurones AVP (article 1).

En conclusion nos résultats montrent que la plasticité neurochimique pourrait impliquer des molécules qui sont capables d'induire la plasticité structurale dans le NSO, autrement dit une voie commune de régulation entre la plasticité neurochimique et la plasticité structurale.

IV. La présence de la MMP2 et la MMP9 dans le NSO a-t-elle un effet spécifique?

En dehors du système nerveux, le système MMP/TIMP est très étudié, et il n'a suscité l'intérêt des neurobiologistes que depuis une dizaine d'années. En effet, ce système joue un rôle majeur dans différents aspects de la biologie et de la pathologie du système nerveux. Les MMP pourraient constituer de nouvelles cibles non seulement thérapeutiques dans différentes neuropathies mais aussi dans la compréhension de la physiologie du système nerveux intact. Dans le cerveau, une plasticité structurale et fonctionnelle par des synapses ne se limite pas aux aspects pathologiques mais elle se produit également dans des conditions physiologiques.

Récemment, Zhong et ses collaborateurs (2006) ont montré que les MMP2 et MMP9 dégradent le domaine extracellulaire du β -dystroglycan, dans des cellules Schwann chez le rat. Ce phénomène a été également démontré dans l'hippocampe en réponse au kainate (Kaczmarek et al., 2002). De plus, la présence du β -dystroglycan a été mise en évidence dans l'hypothalamus (Zaccaria et al., 2001). Il serait donc intéressant d'étudier ce phénomène dans le NSO. D'autre part, Nagy et al. (2006) ont rapporté l'implication de la MMP9 dans l'apprentissage associatif dépendant de l'hippocampe, et ils ont montré que les souris knock-out pour la MMP9 présentent un déficit de LTP. Les phénomènes LTP et LTD ont été récemment mis en évidence dans les terminaisons glutamatergiques du NSO (Panatier et al., 2006), il est donc possible que la MMP2 et la MMP9 soient impliquées dans ce phénomène au niveau du NSO.

Enfin, afin de mieux comprendre la régulation et le rôle de ces MMPs dans le NSO, il serait intéressant d'étudier les inhibiteurs de la MMP2 et la MMP9, les TIMP en utilisant le même

Discussion et perspectives

modèle animal et sous les mêmes conditions expérimentales. Ce travail pourrait ensuite être replacé dans un contexte physiologique tel que la déshydratation afin de mieux comprendre la place des MMP, des TIMP et de la MEC dans la plasticité du NSO.

Conclusion

Conclusion

L'ensemble des données obtenues au cours de ce travail nous a permis de mettre en évidence, d'une part, que l'effet de la NA sur l'expression des neuropeptides magnocellulaires hypothalamique peut s'exercer de façon indirecte par des interactions cellulaires complexes. D'autre part, nos résultats révèlent une voie de régulation commune entre la plasticité neurochimique et la plasticité structurale.

Dans notre modèle *ex-vivo*, la NA exerce un effet stimulateur sur l'expression de l'AVP et de l'OT dans le NSO, une structure fortement innervée par les afférences noradrénergiques. La NA conduit dès la première heure à une augmentation de l'expression de nNOS et iNOS dans les cellules magnocellulaires ainsi qu'à une augmentation de l'activité NADPH-diaphorase enzyme responsable du recyclage du NADPH et dont l'activité varie de façon similaire à celle de la nNOS dans le NSO. Les neurones exprimant la nNOS et l'iNOS correspondent strictement à des neurones magnocellulaires et non à des astrocytes. Ainsi, les neurones exprimant la nNOS sont exclusivement de nature ocytocinergique, tandis que les neurones exprimant la iNOS correspondent à neurones vasopressinergiques et ocytocinergiques. En revanche, aucune détection de la eNOS n'a été observée dans le NSO. Le NO participe à la chaîne de traduction du signal dans la régulation de l'expression d'AVP mais pas dans celle de l'OT par la NA, et ce NO provient à la fois de l'activité de la nNSO et de la iNOS.

Une modification de la matrice extracellulaire apparaît au cours de la plasticité neurochimique induite par la NA dans le NSO. Les effets exercés par la NA sur l'expression de la MMP2 et la MMP9 dans le NSO sont activateurs. De plus, ces MMPs sont exprimées dans les neurones vasopressinergiques, ocytocinergiques et dans les astrocytes. Le blocage de l'activité de ces MMP supprime l'effet stimulateur de la NA sur l'expression de l'AVP et l'OT, suggérant l'implication de ces MMPs dans la plasticité neurochimique induite par la NA.

En conclusion, notre étude a permis de mettre en évidence l'existence de boucles de régulation neurochimiques et structurales complexes entre les afférences noradrénergiques et les neurones magnocellulaires du NSO. Ces mécanismes mettent en jeu l'ensemble des facteurs de l'environnement, notamment, les cellules gliales et la MEC, dans le but de réguler des fonctions physiologiques contrôlées par l'AVP et l'OT. Au-delà de ces phénomènes, l'étude de la plasticité du système hypothalamo-neurohypophysaire peut permettre de comprendre les mécanismes de plasticité mis en jeu dans d'autres structures cérébrales au cours d'autres régulations physiologiques. Egaleme nt, notre modèle de plasticité peut servir de point de comparaison pour

Conclusion

des situations où la plasticité se manifeste après des atteintes du système nerveux et ainsi permettre de mieux comprendre les processus de régénération et de réparation du système nerveux central. Enfin, il peut permettre d'imaginer comment des « dérapages » de ces mécanismes de plasticité peuvent conduire à développer des pathologies cérébrales.

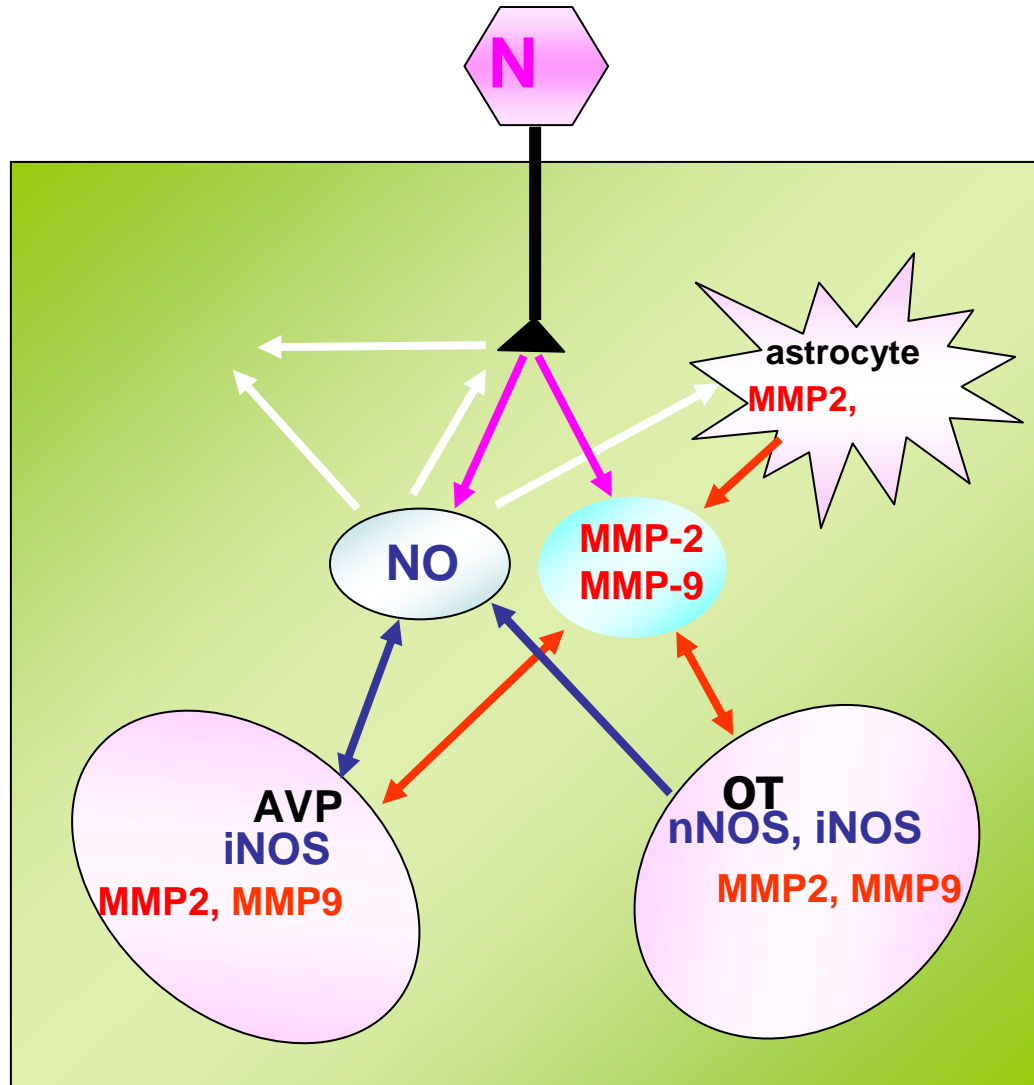


Figure 8: Schéma de principe du mode d'action de la NA dans le NSO.

Dans le NSO, la noradréline (NA) active l'expression d'AVP et d'OT. Cette régulation est directe ou indirecte via les neurones glutamatergiques ou GABAergiques ou les astrocytes. La NA active la production de NO par les neurones magnocellulaires. En retour, le NO pourrait moduler la libération de NA, de glutamate et de GABA, ainsi que l'activité des astrocytes. Le NO est impliqué dans la voie de régulation de la NA pour l'AVP mais pas dans celle de l'OT. D'autre part, la NA stimule l'expression et l'activité de la MMP2 et de la MMP9 et ces MMPs sont impliquées dans la voie de régulation de la NA pour l'AVP et l'OT.

Références bibliographiques

A

- Aguilera G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol.* 1994 Dec;15(4):321-50.
- Ahern GP, Hsu SF, Jackson MB. Direct actions of nitric oxide on rat neurohypophysial K⁺ channels. *Physiol.* 1999 Oct 1;520 Pt 1:165-76.
- Al-Ghoul WM, Meeker RB, Greenwood RS. Amygdala kindling alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA expression in the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience.* 1997 Apr;77(4):985-92.
- Alonso G, Assenmacher I. Radioautographic studies on the neurohypophysial projections of the supraoptic and paraventricular nuclei in the rat. *Cell Tissue Res.* 1981;219(3):525-34.
- Alonso G, Assenmacher I. Ultrastructural analysis of the noradrenergic innervation of rat supraoptic nucleus. *Neurosci Lett.* 1984 Aug 24;49(1-2):45-50.
- Antoni FA. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front neuroendocrinol.* 1993 Apr; 14(2): 76-122.
- Antonijevic IA, Douglas AJ, Dye S, Bicknell RJ, Leng G, Russell JA. Oxytocin antagonists delay the initiation of parturition and prolong its active phase in rats. *J Endocrinol.* 1995 Apr;145(1):97-103.
- Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):169-208.
- Arevalo R, Sanchez F, Alonso JR, Carretero J, Vazquez R, Aijon J. NADPH-diaphorase activity in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat. *Brain Res Bull.* 1992 Apr;28(4):599-603.
- Argiolas A, Collu M, Gessa GL, Melis MR, Serra G. The oxytocin antagonist d(CH₂)⁵Tyr(Me)-Orn⁸-vasotocin inhibits male copulatory behaviour in rats. *Eur J Pharmacol.* 1988 May 10;149(3):389-92.
- Argiolas A, Melis MR. The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. *Physiol Behav.* 2004 Nov 15;83(2):309-17.
- Armstrong WE, Gallagher MJ, Sladek CD. Noradrenergic stimulation of supraoptic neuronal activity and vasopressin release in vitro: mediation by an alpha 1-receptor. *Brain Res.* 1986 Feb 12;365(1):192-7.
- Armstrong WE, Sladek CD, Sladek JR Jr. Characterization of noradrenergic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology.* 1982 Jul;111(1):273-9.
- Armstrong WE, Stern JE. Electrophysiological and morphological characteristics of neurons in perinuclear zone of supraoptic nucleus. *J Neurophysiol.* 1997 Nov;78(5):2427-37.

B

Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tokes ZA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci*. 1996 Dec 15;16(24):7910-9.

Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol*. 1998 Feb;156(2):223-9.

Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol*. 1998 Feb;156(2):223-9.

Bealer SL, Crowley WR. Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3 Pt 1):E453-8.

Bealer SL, Crowley WR. Stimulation of central and systemic oxytocin release by histamine in the paraventricular hypothalamic nucleus: evidence for an interaction with norepinephrine. *Endocrinology*. 1999 Mar;140(3):1158-64.

Belenky MA, Pickard GE. Subcellular distribution of 5-HT(1B) and 5-HT(7) receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol*. 2001 Apr 9;432(3):371-88.

Belin V, Moos F. Paired recordings from supraoptic and paraventricular oxytocin cells in suckled rats: recruitment and synchronization. *J Physiol*. 1986 Aug;377:369-90.

Benhar M, Stamler JS. A central role for S-nitrosylation in apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2005 Jul;7(7):645-6.

Berghorn KA, Knapp LT, Hoffman GE, Sherman TG. Induction of glucocorticoid receptor expression in hypothalamic magnocellular vasopressin neurons during chronic hypoosmolality. *Endocrinology*. 1995 Feb;136(2):804-7.

Beverly JL, De Vries MG, Bouman SD, Arseneau LM. Noradrenergic and GABAergic systems in the medial hypothalamus are activated during hypoglycemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Feb;280(2):R563-9.

Bishop A, Anderson JE. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*. 2005 Mar 15;208(2):193-205.

Bisset GW, Chowdrey HS. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol*. 1988 Nov;73(6):811-72.

Boersma CJ, Van Leeuwen FW. Neuron-glia interactions in the release of oxytocin and vasopressin from the rat neural lobe: the role of opioids, other neuropeptides and their receptors. *Neuroscience*. 1994 Oct;62(4):1003-20.

Bondy CA, Gainer H, Russell JT. Dynorphin A inhibits and naloxone increases the electrically stimulated release of oxytocin but not vasopressin from the terminals of the neural lobe. *Endocrinology*. 1988 Apr;122(4):1321-7.

Références

- Bondy CA, Jensen RT, Brady LS, Gainer H. Cholecystokinin evokes secretion of oxytocin and vasopressin from rat neural lobe independent of external calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(13):5198-201.
- Boudaba C, Di S, Tasker JG. Presynaptic noradrenergic regulation of glutamate inputs to hypothalamic magnocellular neurones. *J Neuroendocrinol*. 2003 Aug;15(8):803-10.
- Bourque CW, Chakfe Y. Does a stretch-inactivated cation channel integrate osmotic and peptidergic signals? *Nat Neurosci*. 2000 Sep;3(9):847-8.
- Bourque CW, Voisin DL, Chakfe Y. Stretch-inactivated cation channels: cellular targets for modulation of osmosensitivity in supraoptic neurons. *Prog Brain Res*. 2002;139:85-94.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*. 1991 Oct;7(4):615-24.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. 1992 Jan;8(1):3-11.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990 Oct 25;347(6295):768-70.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(22):9030-3.
- Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1995 Sep 8;82(5):743-52.
- Breton C, Neculcea J, Zingg HH. Renal oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization and regulation during pregnancy and in response to ovarian steroid treatment. *Endocrinology*. 1996 Jul;137(7):2711-7.
- Bridges TE, Hillhouse EW, Jones MT. The effect of dopamine on neurohypophysial hormone release in vivo and from the rat neural lobe and hypothalamus in vitro. *J Physiol*. 1976 Sep;260(3):647-66.
- Briest W, Holzl A, Rassler B, Deten A, Baba HA, Zimmer HG. Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2003 Feb;57(2):379-87.
- Briley EM, Lolait SJ, Axelrod J, Felder CC. The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. *Neuropeptides*. 1994 Jul;27(1):63-74.
- Brooks DP, Share L, Crofton JT. Central adrenergic mechanisms in hemorrhage-induced vasopressin secretion. *Am J Physiol*. 1986 Dec;251(6 Pt 2):H1158-62.
- Brown CH, Murphy NP, Leng G, Russell JA. Importance of noradrenergic input in morphine withdrawal excitation of supraoptic oxytocin neurones in urethane-anaesthetised rats. *Adv Exp Med Biol*. 1995;395:203-4.

Références

Brownstein MJ, Mezey E. Multiple chemical messengers in hypothalamic magnocellular neurons. *Prog Brain Res.* 1986;68:161-8.

Buijs RM. The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res.* 1996; 111: 229-40

Buller KM, Day TA. Involvement of medullary catecholamine cells in neuroendocrine responses to systemic cholecystokinin. *J Neuroendocrinol.* 1996 Nov;8(11):819-24.

Burbach JP, De Hoop MJ, Schmale H, Richter D, De Kloet ER, Ten Haaf JA, De Wied D. Differential responses to osmotic stress of vasopressin-neurophysin mRNA in hypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology.* 1984 Dec;39(6):582-4.

Burbach JP, Luckman SM, Murphy D, Gainer H. Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. *Physiol Rev.* 2001 Jul;81(3):1197-267.

C

Calas A, Landry M, Roche D, Trembleau A. A model of phenotypic plasticity: the hypothalamo-posthypophysial neurons. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1994;188(3):187-206.

Campbell IL, Pagenstecher A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the nervous system: the good, the bad and the enigmatic. *Trends Neurosci.* 1999 Jul;22(7):285-7.

Canteras G, Rettori V, Genaro A, Suburo A, Gimeno M, McCann SM. Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: increase by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 30;93(9):4246-50.

Cao L, Sun X, Shen E. Nitric oxide stimulates both the basal and reflex release of vasopressin in anesthetized rats. *Neurosci Lett.* 1996 Dec 27;221(1):49-52.

Card JP, Fitzpatrick-McElligott S, Gozes I, Baldino F Jr. Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.* 1988 May;252(2):307-15.

Card JP, Moore RY. The suprachiasmatic nucleus of the golden hamster: immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. *Neuroscience.* 1984 Oct;13(2):415-31.

Carrazana EJ, Pasiaka KB, Majzoub JA. The vasopressin mRNA poly(A) tract is unusually long and increases during stimulation of vasopressin gene expression in vivo. *Mol Cell Biol.* 1988 Jun;8(6):2267-74.

Carter DA, Murphy D. Independent regulation of neuropeptide mRNA level and poly(A) tail length. *J Biol Chem.* 1989 Apr 25;264(12):6601-3.

Carter DA, Murphy D. Rapid changes in poly (A) tail length of vasopressin and oxytocin mRNAs form a common early component of neurohypophysial peptide gene activation following physiological stimulation. *Neuroendocrinology.* 1991 Jan;53(1):1-6.

Références

- Carter DA, Murphy D. Vasopressin mRNA in parvocellular neurons of the rat suprachiasmatic nucleus exhibits increased poly (A) tail length following water deprivation. *Neurosci Lett*. 1990 Feb 5;109(1-2):180-5.
- Castel M, Gainer H, Dellmann HD. Neuronal secretory systems. *Int Rev Cytol*. 1984;88:303-459.
- Catheline G, Touquet B, Lombard MC, Poulain DA, Theodosis DT. A study of the role of neuroglial remodeling in the oxytocin system at lactation. *Neuroscience*. 2006;137(1):309-16.
- Chandrashekhar Y, Prahash AJ, Sen S, Gupta S, Roy S, Anand IS. The role of arginine vasopressin and its receptors in the normal and failing rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 May;35(5):495-504.
- Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*. 2001 Nov;11(11):S37-43.
- Chen D, Hurst WJ, Ding JM, Faiman LE, Mayer B, Gillette MU. Localization and characterization of nitric oxide synthase in the rat suprachiasmatic nucleus: evidence for a nitrergic plexus in the biological clock. *J Neurochem*. 1997 Feb;68(2):855-61.
- Choleris E, Gustafsson JA, Korach KS, Muglia LJ, Pfaff DW, Ogawa A. An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor- α and - β knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):6192-7.
- Christopherson KS, Brecht DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest*. 1997 Nov 15;100(10):2424-9.
- Ciosek J. Vasopressin and oxytocin release as influenced by thyrotropin-releasing hormone in euhydrated and dehydrated rats. *J Physiol Pharmacol*. 2002 Sep;53(3):423-37.
- Cisowska-Maciejewska A, Ciosek J. Galanin influences vasopressin and oxytocin release from the hypothalamo-neurohypophysial system of salt loaded rats. *J Physiol Pharmacol*. 2005 Dec;56(4):673-88.
- Clarke G, Fall CH, Lincoln DW, Merrick LP. Effects of cholinergic antagonists on the suckling-induced and experimentally evoked release of oxytocin. *Br J Pharmacol*. 1978 Jul;63(3):519-27.
- Coussens LM, Shapiro SD, Soloway PD, Werb Z. Models for gain-of-function and loss-of-function of MMPs. Transgenic and gene targeted mice. *Methods Mol Biol*. 2001;151:149-79.
- Crocker SJ, Pagenstecher A, Campbell IL. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 2004 Jan 1;75(1):1-11.
- Crowley RS, Insel TR, O'Keefe JA, Amico JA. Cytoplasmic oxytocin and vasopressin gene transcripts decline postpartum in the hypothalamus of the lactating rat. *Endocrinology*. 1993 Dec;133(6):2704-10.
- Crowley WR, Parker SL, Armstrong WE, Spinolo LH, Grosvenor CE. Neurotransmitter and neurohormonal regulation of oxytocin secretion in lactation. *Ann NY Acad Sci* 1992 Jun 12; 652: 286-302.

Références

Cui LN, Jolley CJ, Dyball RE. Electrophysiological evidence for retinal projections to the hypothalamic supraoptic nucleus and its perinuclear zone. *J Neuroendocrinol.* 1997 May;9(5):347-53.

Cunningham ET Jr, Sawchenko PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1988 Aug 1;274(1):60-76.

D

Davis LG, Arentzen R, Reid JM, Manning RW, Wolfson B, Lawrence KL, Baldino F Jr. Glucocorticoid sensitivity of vasopressin mRNA levels in the paraventricular nucleus of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Feb;83(4):1145-9.

Day TA, Randle JC, Renaud LP. Opposing alpha- and beta-adrenergic mechanisms mediate dose-dependent actions of noradrenaline on supraoptic vasopressin neurones in vivo. *Brain Res.* 1985 Dec 9;358(1-2):171-9.

Day TA, Sibbald JR. A1 cell group mediates solitary nucleus excitation of supraoptic vasopressin cells. *Am J Physiol.* 1989 Nov;257(5 Pt 2):R1020-6.

De Vente J, Hopkins DA, Markerink-Van Ittersum M, Emson PC, Schmidt HH, Steinbusch HW. Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience.* 1998 Nov;87(1):207-41.

Debiec J. Peptides of love and fear: vasopressin and oxytocin modulate the integration of information in the amygdala. *Bioessays.* 2005 Sep;27(9):869-73.

Den Ouden DT, Meinders AE. Vasopressin: physiology and clinical use in patients with vasodilatory shock: *Neth J Med.* 2005 Jan;63(1):4-13.

Di S, Tasker JG. Dehydration-induced synaptic plasticity in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic nucleus. *Endocrinology.* 2004 Nov;145(11):5141-9.

Dierickx K, Vandesande F, de Mey J. Identification, in the external region of the rat median eminence, of separate neurophysin-vasopressin and neurophysin-oxytocin containing nerve fibres. *Cell Tissue Res.* 1976 May 6;168(2):141-51.

Douglas AJ, Dye S, Leng G, Russell JA, Bicknell RJ. Endogenous opioid regulation of oxytocin secretion through pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol.* 1993 Jun;5(3):307-14.

Douglas AJ, Scullion S, Antonievic IA, Brown D, Russell J,A, Leng G. Uterine contractile activity stimulates supraoptic neurons in term pregnant rats via a noradrenergic pathway. *Endocrinolo.* 2001, 142; 633-644.

Duchossoy Y, Horvat JC, Stettler O. MMP-related gelatinase activity is strongly induced in scar tissue of injured adult spinal cord and forms pathways for ingrowing neurites. *Mol Cell Neurosci.* 2001 Jun;17(6):945-56.

Duncan MJ, Crafton CJ, Wheeler DL. Aging regulates 5-HT(1B) receptors and serotonin reuptake sites in the SCN. *Brain Res.* 2000 Feb 21;856(1-2):213-9.

Du Vigneaud V, Lawler HC, Popenoe EA. Enzymatic cleavage of glycinamide from vasopressin and a proposed structure for this pressor-antidiuretic hormone of posterior pituitary. 1953a J. AM. Chm. Soc., 75: 4881-5880.

Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. J Biol Chem. 1953b Dec;205(2):949-57.

E

Edwards D. R. in *Metalloproteinase inhibitors in cancer therapy* (eds Clendennin, N. J. & Appelt. K.) 67-84 (Humana press, Inc., Totawa, New Jersey) 2000.

El Majdoubi M, Poulain DA, Theodosis DT. Activity-dependent morphological synaptic plasticity in an adult neurosecretory system: magnocellular oxytocin neurons of the hypothalamus. Biochem Cell Biol. 2000;78(3):317-27.

El Majdoubi M, Poulain DA, Theodosis DT. Lactation-induced plasticity in the supraoptic nucleus augments axodendritic and axosomatic GABAergic and glutamatergic synapses: an ultrastructural analysis using the disector method. Neuroscience. 1997 Oct;80(4):1137-47.

El Majdoubi M, Poulain DA, Theodosis DT. The glutamatergic innervation of oxytocin- and vasopressin-secreting neurons in the rat supraoptic nucleus and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. Eur J Neurosci. 1996 Jul;8(7):1377-89.

Ennis BW, Matrisian LM. Matrix degrading metalloproteinases. J Neurooncol. 1994;18(2):105-9.

Ethell DW, Kinloch R, Green DR. Metalloproteinase shedding of Fas ligand regulates beta-amyloid neurotoxicity. Curr Biol. 2002 Sep 17;12(18):1595-600.

Evans JJ. Oxytocin in the human--regulation of derivations and destinations. Eur J Endocrinol. 1997 Dec;137(6):559-71.

F

Falke N. Modulation of oxytocin and vasopressin release from rat neurosecretosomes: the roles of VIP oxytocin and GABA. Neuropeptides. 1991 Mar;18(3):143-7.

Fang W, Li H, Kong L, Niu G, Gao Q, Zhou K, Zheng J, Wu B. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in tumor invasion and metastasis: Beijing Da Xue Xue Bao. 2003 Aug;35(4):441-3.

Fatar M, Stroick M, Griebel M, Hennerici M. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular diseases. Cerebrovasc Dis. 2005;20(3):141-51.

Faull CM, Charlton JA, Butler TJ, Baylis PH. The effect of acute pharmacological manipulation of central serotonin neurotransmission on osmoregulated secretion of arginine vasopressin in the rat. J Endocrinol. 1993 Oct;139(1):77-87.

Fenelon VS, Sieghart W, Herbison AE. Cellular localization and differential distribution of GABAA receptor subunit proteins and messenger RNAs within hypothalamic magnocellular neurons. Neuroscience. 1995 Feb;64(4):1129-43.

Fields RD, Itoh K. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 1996 Nov;19(11):473-80.

Fields RL, House SB, Gainer H. Regulatory domains in the intergenic region of the oxytocin and vasopressin genes that control their hypothalamus-specific expression in vitro. *J Neurosci.* 2003 Aug 27;23(21):7801-9.

Fox K, Caterson B. Neuroscience. Freeing the brain from the perineuronal net. *Science.* 2002 Nov 8;298(5596):1187-9.

Furuyama T, Inagaki S, Takagi H. Localizations of alpha 1 and beta 1 subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993 Dec;20(4):335-44.

G

Gainer H, Pant HC, Cohen RS. Squid optic lobe synaptosomes: what can they tell us about presynaptic protein synthesis? *J Neurochem.* 1994 Jul;63(1):387-9.

Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol.* 1989 Oct 17;172(4-5):413-6.

Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):629-83.

Ginsberg SD, Hof PR, Young WG, Morrison JH. Noradrenergic innervation of vasopressin- and oxytocin-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the macaque monkey: quantitative analysis using double-label immunohistochemistry and confocal laser microscopy. *J Comp Neurol.* 1994 Mar 22;341(4):476-91.

Giuliano F, Rampin O. Central control of erection and its pharmacological modification. *Curr Opin Urol.* 2000 Nov;10(6):629-33.

Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC. ECM-mediated glioma cell invasion. *Microsc Res Tech.* 1998 Nov 1;43(3):250-7.

Goldsmith SR, Gheorghiuade M. Vasopressin antagonism in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Nov 15;46(10):1785-91.

Gonzalez-Hernandez T, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Barroso-Chinea P, Abreu P, del Mar Perez-Delgado M, Rancel-Torres N, del Carmen Gonzalez M. Interleukin-6 and nitric oxide synthase expression in the vasopressin and corticotrophin-releasing factor systems of the rat hypothalamus. *J Histochem Cytochem.* 2006 Apr;54(4):427-41.

Gotti S, Sica M, Viglietti-Panzica C, Panzica G. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microsc Res Tech.* 2005 Sep;68(1):13-35.

Gottschall PE, Deb S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation.* 1996 Mar-Jun;3(2-3):69-75.

Références

Grange-Messent V, Raison D, Dugas B, Calas A. Noradrenaline up-regulates the neuronal and the inducible nitric oxide synthase isoforms in magnocellular neurons of rat brain slices. *J Neurosci Res.* 2004 Dec 1;78(5):683-90.

Gribkoff VK. Electrophysiological evidence for N-methyl-D-aspartate excitatory amino acid receptors in the rat supraoptic nucleus in vitro. *Neurosci Lett.* 1991 Oct 14;131(2):260-2.

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002 Aug 16;297(5584):1186-90.

Gundlach AL, Burazin TC, Larm JA. Distribution, regulation and role of hypothalamic galanin systems: renewed interest in a pleiotropic peptide family. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001 Jan-Feb;28(1-2):100-5.

H

Hatakeyama S, Kawai Y, Ueyama T, Senba E. Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express Fos following stress stimuli. *J Chem Neuroanat.* 1996 Oct;11(4):243-56.

Hatton GI, Ho YW, Mason WT. Synaptic activation of phasic bursting in rat supraoptic nucleus neurones recorded in hypothalamic slices. *J Physiol.* 1983 Dec;345:297-317.

Hatton GI. Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. *Prog Neurobiol.* 1990;34(6):437-504.

Hatton GI. Function-related plasticity in hypothalamus. *Annu Rev Neurosci.* 1997;20:375-97.

Hattori Y, Shibuya I, Tanaka K, Kabashima N, Ueta Y, Yamashita H. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor agonist-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in isolated rat supraoptic neurons. *J Neuroendocrinol.* 1998 May;10(5):383-9.

Helmreich DL, Itoi K, Lopez-Figueroa MO, Akil H, Watson SJ. Norepinephrine-induced CRH and AVP gene transcription within the hypothalamus: differential regulation by corticosterone. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Mar 31;88(1-2):62-73.

Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:365-400.

Herbison AE, Voisin DL, Douglas AJ, Chapman C. Profile of monoamine and excitatory amino acid release in rat supraoptic nucleus over parturition. *Endocrinology.* 1997 Jan;138(1):33-40.

Hernando F, Schoots O, Lolait SJ, Burbach JP. Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology.* 2001 Apr;142(4):1659-68.

Hirasawa A, Hashimoto K, Tsujimoto G. Distribution and developmental change of vasopressin V1A and V2 receptor mRNA in rats. *Eur J Pharmacol.* 1994 Mar 15;267(1):71-5.

Références

Hirsch AT, Majzoub JA, Ren CJ, Scales KM, Creager MA. Contribution of vasopressin to blood pressure regulation during hypovolemic hypotension in humans. *J Appl Physiol.* 1993 Nov;75(5):1984-8.

Hurbin A, Boissin-Agasse L, Orcel H, Rabie A, Joux N, Desarmenien MG, Richard P, Moos FC. The V1a and V1b, but not V2, vasopressin receptor genes are expressed in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus, and the transcripts are essentially colocalized in the vasopressinergic magnocellular neurons. *Endocrinology.* 1998 Nov;139(11):4701-7.

Hussy N, Bres V, Rochette M, Duvoid A, Alonso G, Dayanithi G, Moos FC. Osmoregulation of vasopressin secretion via activation of neurohypophysial nerve terminals glycine receptors by glial taurine. *J Neurosci.* 2001 Sep 15;21(18):7110-6.

Hussy N, Deleuze C, Desarmenien MG, Moos FC. Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol.* 2000 Oct;62(2):113-34.

Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarmenien MG, Moos F. Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J Physiol.* 1997 Aug 1;502 (Pt 3):609-21.

Hussy N. Glial cells in the hypothalamo-neurohypophysial system: key elements of the regulation of neuronal electrical and secretory activity. *Prog Brain Res.* 2002;139:95-112.
hypertension. *Brain Res.* 1988 Dec;464(4):303-11.

I

Ibrahim N, Shibuya I, Kabashima N, Setiadji VS, Ueta Y, Yamashita H. GABAB receptor-mediated inhibition of spontaneous action potential discharge in rat supraoptic neurons in vitro. *Brain Res.* 1998 Nov 30;813(1):88-96.

Iijima K, Ogawa T. An HRP study on the distribution of all nuclei innervating the supraoptic nucleus in the rat brain. *Acta Histochem.* 1981;69(2):274-95.

Ingram CD, Snowball RK, Mihai R. Circadian rhythm of neuronal activity in suprachiasmatic nucleus slices from the vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Neuroscience.* 1996 Nov;75(2):635-41.

Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2004 Apr;16(4):348-55.

J

Jaworski DM. Differential regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA expression in response to intracranial injury. *Glia.* 2000 Apr;30(2):199-208.

Références

Jhamandas JH, Raby W, Rogers J, Buijs RM, Renaud LP. Diagonal band projection towards the hypothalamic supraoptic nucleus: light and electron microscopic observations in the rat. *J Comp Neurol*. 1989 Apr 1;282(1):15-23.

Jureus A, Lindgren M, Langel U, Bartfai T. Purification of a galanin degrading 70 kDa metallo-peptidase from bovine spinal cord. *Neuropeptides*. 1998 Oct;32(5):453-60.

K

Kaczmarek L, Lapinska-Dzwonek J, Szymczak S. Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J*. 2002 Dec 16;21(24):6643-8.

Kaczorowski GJ, Knaus HG, Leonard RJ, McManus OB, Garcia ML. High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg Biomembr*. 1996 Jun;28(3):255-67.

Kadekaro M. Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Apr;37(4):441-50.

Kadekaro M, Su G, Chu R, Lei Y, Li J, Fang L. Nitric oxide up-regulates the expression of calcium-dependent potassium channels in the supraoptic nuclei and neural lobe of rats following dehydration. *Neurosci Lett*. 2006 Aug 14;404(1-2):50-5.

Kadowaki K, Kishimoto J, Leng G, Emson PC. Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophysial system after chronic salt loading: evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology*. 1994 Mar;134(3):1011-7.

Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*. 1997 Oct;6(5):199-213.

Kai HS, Butler GS, Morrison CJ, King AE, Pelman GR, Overall CM. Utilization of a novel recombinant myoglobin fusion protein expression system to characterize the tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-4 and TIMP-2 C-terminal domain and tails by mutagenesis. The importance of acidic residues in binding the MMP-2 hemopexin C-domain. *J Biol Chem*. 2002 Dec 13;277(50):48696-707.

Kakiya S, Arima H, Yokoi H, Murase T, Yambe Y, Oiso Y. Effects of acute hypotensive stimuli on arginine vasopressin gene transcription in the rat hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Oct;279(4):E886-92.

Khanna S, Sibbald JR, Day TA. Alpha 2-adrenoceptor modulation of A1 noradrenergic neuron input to supraoptic vasopressin cells. *Brain Res*. 1993 Jun 4;613(1):164-7.

Khuth ST, Akaoka H, Pagenstecher A, Verlaeten O, Belin MF, Giraudon P, Bernard A. Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. *J Virol*. 2001 Sep;75(17):8268-82.

Références

- Kilbourn RG, Belloni P. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J Natl Cancer Inst.* 1990 May 2;82(9):772-6.
- Kim YI, Dudley CA, Moss RL. Re-evaluation of the effects of norepinephrine on the single-unit activity of paraventricular neurosecretory neurons. *Neurosci Lett.* 1989 Feb 13;97(1-2):103-10.
- Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature.* 1992 Apr 9;356(6369):526-9.
- Kiss A, Mikkelsen JD. Oxytocin--anatomy and functional assignments: a minireview. *Endocr Regul.* 2005 Sep;39(3):97-105.
- Kita I, Yoshida Y, Nishino S. An activation of parvocellular oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus in oxytocin-induced yawning and penile erection. *Neurosci Res.* 2006 Apr;54(4):269-75. Epub 2006 Jan 19.
- Kiyama H. & Emson PC. Evidence for coexpression of oxytocin and vasopressin messenger ribonucleic acids in magnocellular neurosecretory cell: simultaneous demonstration of two neurophysin messenger ribonucleic acids by hybridization histochemistry. *J. neuroendocrinol.* 2: 257-259, 1990
- Kjaer A, Knigge U, Rouleau A, Garbarg M, Warberg J. Dehydration-induced release of vasopressin involves activation of hypothalamic histaminergic neurons. *Endocrinology.* 1994a Aug;135(2):675-81.
- Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U, Moller M, Warberg J. Histamine stimulates c-fos expression in hypothalamic vasopressin-, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone-containing neurons. *Endocrinology.* 1994b Jan;134(1):482-91.
- Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U, Warberg J. Dehydration stimulates hypothalamic gene expression of histamine synthesis enzyme: importance for neuroendocrine regulation of vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology.* 1995 May;136(5):2189-97.
- Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U, Warberg J. Histaminergic activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology.* 1994c Sep;135(3):1171-7.
- Knigge U, Willems E, Kjaer A, Jorgensen H, Warberg J. Histaminergic and catecholaminergic interactions in the central regulation of vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology.* 1999 Aug;140(8):3713-9.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994 Mar 1;298 (Pt 2):249-58.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):5159-62.
- Koesling D, Friebe A. Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999;135:41-65.

Koesling D, Russwurm M, Mergia E, Mullershausen F, Friebe A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochem Int.* 2004 Nov;45(6):813-9.

Kombian SB, Zidichouski JA, Pittman QJ. GABAB receptors presynaptically modulate excitatory synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus in vitro. *J Neurophysiol.* 1996 Aug;76(2):1166-79.

Kondo N, Arima H, Banno R, Kuwahara S, Sato I, Oiso Y. Osmoregulation of vasopressin release and gene transcription under acute and chronic hypovolemia in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Mar;286(3):E337-46. Epub 2003 Nov 12.

Kupfermann I. Functional studies of cotransmission. *Physiol Rev.* 1991 Jul;71(3):683-732.

L

Landgraf R, Neumann I, Schwarzberg H. Central and peripheral release of vasopressin and oxytocin in the conscious rat after osmotic stimulation. *Brain Res.* 1988 Aug 9;457(2):219-25.

Landry M, Roche D, Angelova E, Calas A. Expression of galanin in hypothalamic magnocellular neurones of lactating rats: co-existence with vasopressin and oxytocin. *J Endocrinol.* 1997 Dec;155(3):467-81.

Landry M, Roche D, Calas A. Short-term effects of centrally administered galanin on the hyperosmotically stimulated expression of vasopressin in the rat hypothalamus. An in situ hybridization and immunohistochemistry study. *Neuroendocrinology.* 1995 Apr;61(4):393-404.

Langle SL, Poulain DA, Theodosis DT. Neuronal-glia remodeling: a structural basis for neuronal-glia interactions in the adult hypothalamus. *J Physiol Paris.* 2002 Apr-Jun;96(3-4):169-75.

Larsen PJ, Hay-Schmidt A, Vrang N, Mikkelsen JD. Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. *Neuroscience.* 1996 Feb;70(4):963-88.

Laszlo FA, Varga C, Pavo I, Gardi J, Vecsernyes M, Galfi M, Morschl E, Laszlo F, Makara GB. Vasopressin pressor receptor-mediated activation of HPA axis by acute ethanol stress in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 Feb;280(2):R458-65.

Lederis K, neurosecretion and functional structure of neurohypophysis. In *Handbook of physiology, section 7. neuroendocrinology. Vol. IV part I. the pituitary gland and its neuroendocrine control, prt 1*, American physiological society, Washington DC: 81-102 1974.

Le Douarin NM. The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature.* 1980 Aug 14;286(5774):663-9.

Leibowitz SF, Eidelman D, Suh JS, Diaz S, Sladek CD. Mapping study of noradrenergic stimulation of vasopressin release. *Exp Neurol.* 1990 Dec;110(3):298-305.

Leng G, Caquineau C, Sabatier N. Regulation of oxytocin secretion. *Vitam Horm.* 2005;71:27-58.

Références

- Leng G, Brown CH, Russell JA. Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Prog Neurobiol.* 1999 Apr;57(6):625-55.
- Leng G, Yamashita H, Dyball RE, Bunting R. Electrophysiological evidence for a projection from the arcuate nucleus to the supraoptic nucleus. *Neurosci Lett.* 1988 Jun 29;89(2):146-51.
- Lightman SL, Young WS 3rd. Vasopressin, oxytocin, dynorphin, enkephalin and corticotrophin-releasing factor mRNA stimulation in the rat. *J Physiol.* 1987 Dec;394:23-39.
- Lim GP, Russell MJ, Cullen MJ, Tokes ZA. Matrix metalloproteinases in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics. *J Neurochem.* 1997 Apr;68(4):1606-11.
- Lincoln DW, Wakerley JB. Neurosecretory activation in the rat: correlation of the suckling stimulus with the pulsatile release of oxytocin. *J Physiol.* 1975 Feb;245(2):42P-43P.
- Lindvall O, Bjorklund A, Skagerberg G. Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res.* 1984 Jul 23;306(1-2):19-30.
- Lipschitz DL, Crowley WR, Armstrong WE, Bealer SL. Neurochemical bases of plasticity in the magnocellular oxytocin system during gestation. *Exp Neurol.* 2005 Dec;196(2):210-23.
- Liu YX, Gao F, Wei P, Chen XL, Gao HJ, Zou RJ, Siao LJ, Xu FH, Feng Q, Liu K, Hu ZY. Involvement of molecules related to angiogenesis, proteolysis and apoptosis in implantation in rhesus monkey and mouse. *Contraception.* 2005 Apr;71(4):249-62.
- Liu JK, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jul 1;39(1):71-80. Epub 2005 Apr 14.
- Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res.* 2002 Jul 1;69(1):1-9.
- Lohmeier TE. Neurohypophysial hormones. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Oct;285(4):R715-7.
- Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Konig M, Morel A, Brownstein MJ. Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature.* 1992 May 28;357(6376):336-9.
- Lolait SJ, O'Carroll AM, Brownstein MJ. Molecular biology of vasopressin receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Dec 29;771:273-92.
- Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell.* 1992 Sep 4;70(5):705-7.
- Luckman SM, Larsen PJ. Evidence for the involvement of histaminergic neurones in the regulation of the rat oxytocinergic system during pregnancy and parturition. *J Physiol.* 1997 Jun 15;501 (Pt 3):649-55.
- Luckman SM. Fos expression within regions of the preoptic area, hypothalamus and brainstem during pregnancy and parturition. *Brain Res.* 1995 Jan 9;669(1):115-24.

Références

Ludwig M, Williams K, Callahan MF, Morris M. Salt loading abolishes osmotically stimulated vasopressin release within the supraoptic nucleus. *Neurosci Lett*. 1996 Aug 30;215(1):1-4.

Ludwig M. Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J Neuroendocrinol*. 1998 Dec;10(12):881-95.

Lundberg JM. Peptide and classical transmitter mechanisms in the autonomic nervous system. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1990 Jan-Feb;303:9-19.

M

Mahata SK, Mahata M, Steiner HJ, Fischer-Colbrie R, Winkler H. In situ hybridization: mRNA levels of secretogranin II, neuropeptides and carboxypeptidase H in brains of salt-loaded and Brattleboro rats. *Neuroscience*. 1992;48(3):669-80.

Manabe S, Gu Z, Lipton SA. Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Dec;46(12):4747-53.

Marc S, Leiber D, Harbon S. Carbachol and oxytocin stimulate the generation of inositol phosphates in the guinea pig myometrium. *FEBS Lett*. 1986 May 26;201(1):9-14.

Marsais F, Calas A. Ectopic expression of non-catecholaminergic tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience*. 1999;94(1):151-61.

Marsais F, Parmentier C, Terao E, Taxi J, Calas A. Expression of tyrosine hydroxylase and vasopressin in magnocellular neurons of salt-loaded aged rats. *Microsc Res Tech*. 2002 Jan 15;56(2):81-91.

Martin KH, Slack JK, Boerner SA, Martin CC, Parsons JT. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1652-3.

Marzban F, Tweedle CD, Hatton GI. Reevaluation of the plasticity in the rat supraoptic nucleus after chronic dehydration using immunogold for oxytocin and vasopressin at the ultrastructural level. *Brain Res Bull*. 1992 May;28(5):757-66.

Mason WT, Ho YW, Hatton GI. Axon collaterals of supraoptic neurones: anatomical and electrophysiological evidence for their existence in the lateral hypothalamus. *Neuroscience*. 1984 Jan;11(1):169-82.

Mason WT. Excitation by dopamine of putative oxytocinergic neurones in the rat supraoptic nucleus in vitro: evidence for two classes of continuously firing neurones. *Brain Res*. 1983 May 9;267(1):113-21.

McCarthy MM, McDonald CH, Brooks PJ, Goldman D. An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. *Physiol Behav*. 1996 Nov;60(5):1209-15.

McKinney C, Ginns EI. Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *J Neuroendocrinol*. 1996 Nov;8(11):847-53.

Références

- McNeill TH, Sladek JR Jr. Simultaneous monoamine histofluorescence and neuropeptide immunocytochemistry: II. Correlative distribution of catecholamine varicosities and magnocellular neurosecretory neurons in the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *J Comp Neurol*. 1980 Oct 15;193(4):1023-33.
- Meeker RB, Greenwood RS, Hayward JN. Glutamate is the major excitatory transmitter in the supraoptic nuclei. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Jul 22;689:636-9.
- Meeker RB, McGinnis S, Greenwood RS, Hayward JN. Increased hypothalamic glutamate receptors induced by water deprivation. *Neuroendocrinology*. 1994 Nov;60 (5):477-85.
- Meeker RB, Swanson DJ, Hayward JN. Light and electron microscopic localization of glutamate immunoreactivity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroscience*. 1989;33 (1):157-67.
- Meister B, Cortes R, Villar MJ, Schalling M, Hokfelt T. Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res*. 1990 May;260 (2):279-97.
- Meister B. Gene expression and chemical diversity in hypothalamic neurosecretory neurons. *Mol Neurobiol*. 1993 Summer;7(2):87-110.
- Menon B, Singh M, Singh K. Matrix metalloproteinases mediate beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Jul;289(1):C168-76.
- Mezey E, Kiss JZ. Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. *Endocrinology*. 1991 Oct;129(4):1814-20.
- Michaloudi HC, el Majdoubi M, Poulain DA, Papadopoulos GC, Theodosis DT. The noradrenergic innervation of identified hypothalamic magnocellular somata and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. *J Neuroendocrinol*. 1997 Jan;9(1):17-23.
- Minc-Golomb D, Schwartz JP. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci*. 1993 Aug;16(8):323-8.
- Miyagawa A, Okamura H, Ibata Y. Coexistence of oxytocin and NADPH-diaphorase in magnocellular neurons of the paraventricular and the supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*. 1994 Apr 25;171(1-2):13-6.
- Miyata S, Nakashima T, Kiyohara T. Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations. *Neurosci Lett*. 1994 Jul 4;175(1-2):63-6.
- Miyata S, Hatton GI. Activity-related, dynamic neuron-glia interactions in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Microsc Res Tech*. 2002 Jan 15;56(2):143-57.
- Miyata S, Nakatani Y, Hayashi N, Nakashima T. Matrix-degrading enzymes tissue plasminogen activator and matrix metalloprotease-3 in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res*. 2005 Oct 5;1058(1-2):1-9.

Références

- Miyata S, Akagi A, Hayashi N, Watanabe K, Oohira A. Activity-dependent regulation of a chondroitin sulfate proteoglycan 6B4 phosphacan/RPTPbeta in the hypothalamic supraoptic nucleus. *Brain Res.* 2004 Aug 13;1017(1-2):163-71.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun;43(2):109-42.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993 Dec 30;329(27):2002-12.
- Monlezun S, Ouali S, Poulain DA, Theodosis DT. Polysialic acid is required for active phases of morphological plasticity of neurosecretory axons and their glia. *Mol Cell Neurosci.* 2005 Aug;29(4):516-24.
- Moos FC. GABA-induced facilitation of the periodic bursting activity of oxytocin neurones in suckled rats. *J Physiol.* 1995 Oct 1;488 (Pt 1):103-14.
- Moro MA, Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium.* 2004 Sep-Oct;36(3-4):265-75.
- Mueller NK, Di S, Paden CM, Herman JP. Activity-dependent modulation of neurotransmitter innervation to vasopressin neurons of the supraoptic nucleus. *Endocrinology.* 2005 Jan;146(1):348-54.
- Muir EM, Adcock KH, Morgenstern DA, Clayton R, von Stillfried N, Rhodes K, Ellis C, Fawcett JW, Rogers JH. Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002 Apr 30;100(1-2):103-17.
- Muir D. Metalloproteinase-dependent neurite outgrowth within a synthetic extracellular matrix is induced by nerve growth factor. *Exp Cell Res.* 1994 Feb;210(2):243-52.
- Murad F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol.* 1994;26:19-33.
- Murphy D, Levy A, Lightman S, Carter D. Vasopressin RNA in the neural lobe of the pituitary: dramatic accumulation in response to salt loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Nov;86(22):9002-5.
- Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS.* 1999 Jan;107(1):38-44.
- Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Minc-Golomb D, Schwartz JP. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* 1993 Aug;16(8):323-8.
- Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia.* 2000 Jan 1;29(1):1-13.
- N**
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

Références

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 1997 Mar-Apr;378(3-4):151-60.

Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, Balcerzyk M, Okulski P, Dzwonek J, Costa RM, Silva AJ, Kaczmarek L, Huntley GW. Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci.* 2006 Feb 15;26(7):1923-34.

Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest.* 1997 Nov 15;100(10):2417-23.

Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994 May 13;269(19):13725-8.

Nomura M, Tsutsui M, Shimokawa H, Fujimoto N, Ueta Y, Morishita T, Yanagihara N, Matsumoto T. Effects of nitric oxide synthase isoform deletion on oxytocin and vasopressin messenger RNA in mouse hypothalamus. *Neuroreport.* 2005 Mar 15;16(4):413-7.

O

Oelkers W. Hyponatremia and inappropriate secretion of vasopressin (antidiuretic hormone) in patients with hypopituitarism. *N Engl J Med.* 1989 Aug 24;321(8):492-6.

Ogier R, Tribollet E, Suarez P, Raggenbass M. Identified motoneurons involved in sexual and eliminative functions in the rat are powerfully excited by vasopressin and tachykinins. *J Neurosci.* 2006 Oct 18;26(42):10717-26.

Olchovsky D, Ezra D, Vered I, Hadani M, Shimon I. Symptomatic hyponatremia as a presenting sign of hypothalamic-pituitary disease: a syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH)-like glucocorticosteroid responsive condition. *J Endocrinol Invest.* 2005 Feb;28(2):151-6.

Oldfield BJ, Hou-Yu A, Silverman AJ. A combined electron microscopic HRP and immunocytochemical study of the limbic projections to rat hypothalamic nuclei containing vasopressin and oxytocin neurons. *J Comp Neurol.* 1985 Jan 8;231(2):221-31.

Oliet SH, Piet R, Poulain DA, Theodosis DT. Glial modulation of synaptic transmission: Insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Glia.* 2004 Aug 15;47(3):258-67.

Oliet SH, Piet R, Poulain DA. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science.* 2001 May 4;292(5518):923-6.

Oliet SH, Piet R. Anatomical remodelling of the supraoptic nucleus: changes in synaptic and extrasynaptic transmission. *J Neuroendocrinol.* 2004 Apr;16(4):303-7.

Oliet SH. Functional consequences of morphological neuroglial changes in the magnocellular nuclei of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2002 Mar;14(3):241-6

Oliet SH, Panatier A, Piet R. Functional neuronal-glia anatomical remodelling in the hypothalamus. *Novartis Found Symp.* 2006;276:238-48; discussion 248-52, 275-81.

Références

Oliver KR, Kinsey AM, Wainwright A, Sirinathsinghji DJ. Localization of 5-HT (5A) receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* 2000 Jun 9;867(1-2):131-42.

Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem.* 2000 Feb;74(2):785-91.

Onaka T, Luckman SM, Antonijevic I, Palmer JR, Leng G. Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarius to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat. *Neuroscience.* 1995 May;66(2):403-12.

Onaka T, Palmer JR, Yagi K. A selective role of brainstem noradrenergic neurons in oxytocin release from the neurohypophysis following noxious stimuli in the rat. *Neurosci Res.* 1996 May;25(1):67-75.

Orloff J, Handler J. The role of adenosine 3',5'-phosphate in the action of antidiuretic hormone. *Am J Med.* 1967 May;42(5):757-68.

Ostrowski NL, Lolait SJ, Bradley DJ, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Young WS 3rd. Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology.* 1992 Jul;131(1):533-5.

Ostrowski NL, Lolait SJ. Oxytocin receptor gene expression in female rat kidney. The effect of estrogen. *Adv Exp Med Biol.* 1995;395:329-40.

Ostrowski NL, Young WS 3rd, Knepper MA, Lolait SJ. Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing, and adult rats. *Endocrinology.* 1993 Oct;133(4):1849-59.

Ostrowski NL, Young WS 3rd, Lolait SJ. Estrogen increases renal oxytocin receptor gene expression. *Endocrinology.* 1995 Apr;136(4):1801-4.

Ozaki Y, Nomura M, Saito J, Luedke CE, Muglia LJ, Matsumoto T, Ogawa S, Ueta Y, Pfaff DW. Expression of the arginine vasopressin gene in response to salt loading in oxytocin gene knockout mice. *J Neuroendocrinol.* 2004 Jan;16(1):39-44.

P

Panatier A, Gentles SJ, Bourque CW, Oliet SH. Activity-dependent synaptic plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *J Physiol.* 2006 Jun 15;573(Pt 3):711-21.

Panula P, Yang HY, Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Apr;81(8):2572-6.

Parker SL, Crowley WR. Stimulation of oxytocin release in the lactating rat by a central interaction of alpha 1-adrenergic and alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid-sensitive excitatory amino acid mechanisms. *Endocrinology.* 1993 Dec;133(6):2855-60.

Pfeilschifter J. Signalling pathways of nitric oxide. *Kidney Blood Press Res.* 2000;23(3-5):159-61.

Références

Pickard GE, Smith BN, Belenky M, Rea MA, Dudek FE, Sollars PJ. 5-HT_{1B} receptor-mediated presynaptic inhibition of retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*. 1999 May 15;19(10):4034-45.

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. *Neurochem Int*. 2004 Oct;45(5):597-607.

Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 2002 Nov 8;298(5596):1248-51.

Planas AM, Sole S, Justicia C, Farre ER. Estimation of gelatinase content in rat brain: effect of focal ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Nov 30;278(3):803-7.

Poulain DA, Wakerley JB. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience*. 1982 Apr;7(4):773-808.

Poulain D, & Jard S. Peptides neurohypophysaires: vasopressine et ocytocine. Dans : *Neuropeptides et neuromédiateurs*. Epelbaum J., Paris, Eds INSERM, p. 229-338, 1995.

Pow DV, Morris JF. Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis. *Neuroscience*. 1989;32(2):435-9.

Q

Quaranta V. Cell migration through extracellular matrix: membrane-type metalloproteinases make the way. *J Cell Biol*. 2000 Jun 12;149(6):1167-70.

R

Raby WN, Renaud LP. Dorsomedial medulla stimulation activates rat supraoptic oxytocin and vasopressin neurones through different pathways. *J Physiol*. 1989 Oct;417:279-94.

Raff H. Interactions between neurohypophysial hormones and the ACTH-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Jul 22;689:411-25.

Randle JC, Day TA, Jhamandas JH, Bourque CW, Renaud LP. Neuropharmacology of supraoptic nucleus neurons: norepinephrine and gamma-aminobutyric acid receptors. *Fed Proc*. 1986 Aug;45(9):2312-7.

Reichardt LF, Tomaselli KJ. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci*. 1991;14:531-70.

Renaud LP, Bourque CW. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol*. 1991;36(2):131-69.

Renaud LP, Cunningham JT, Nissen R, Yang CR. Electrophysiology of central pathways controlling release of neurohypophysial hormones. Focus on the lamina terminalis and diagonal band inputs to the supraoptic nucleus. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Jul 22;689:122-32.

Références

- Reuss S, Decker K, Rosseler L, Layes E, Schollmayer A, Spessert R. Nitric oxide synthase in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: evidence from histochemistry, immunohistochemistry and western blot; and colocalization with VIP. *Brain Res.* 1995 Oct 16;695(2):257-62.
- Richard P, Moos F, Freund-Mercier MJ. Central effects of oxytocin. *Physiol Rev.* 1991 Apr;71(2):331-70.
- Rinaman L, Hoffman GE, Dohanics J, Le WW, Stricker EM, Verbalis JG. Cholecystokinin activates catecholaminergic neurons in the caudal medulla that innervate the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *J Comp Neurol.* 1995 Sep 18;360(2):246-56.
- Ring RH. The central vasopressinergic system: examining the opportunities for psychiatric drug development. *Curr Pharm Des.* 2005;11(2):205-25.
- Rivera S, Jourquin J, Ogier C, Bernard A, Charton G, Tremblay E, Khrestchatsky M. The MMP/TIMP system in the nervous system. *Med Sci (Paris).* 2004 Jan;20(1):55-60.
- Robert J, Clauser ER. Vasopressin receptors: structure/function relationships and signal transduction in target cells. *J Soc Biol.* 2005;199(4):351-9.
- Robinson LJ, Martin TF. Docking and fusion in neurosecretion. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Aug;10(4):483-92.
- Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist.* 2002 Dec;8(6):586-95.
- Rozen F, Russo C, Banville D, Zingg HH. Structure, characterization, and expression of the rat oxytocin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jan 3;92(1):200-4.
- Russell JA, Leng G, Douglas AJ. The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy. *Front Neuroendocrinol.* 2003 Jan;24(1):27-61.
- S**
- Salm AK. Mechanisms of glial retraction in the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *Exp Physiol.* 2000 Mar;85 Spec No:197S-202S.
- Samson WK, Lumpkin MD, McCann SM. Evidence for a physiological role for oxytocin in the control of prolactin secretion. *Endocrinology.* 1986 Aug;119(2):554-60.
- Saphier D, Feldman S. Electrophysiology of supraoptico-paraventricular nucleus connections in the rat. *Exp Brain Res.* 1987;69(1):60-6.
- Sausville E, Carney D, Battey J. The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *J Biol Chem.* 1985 Aug 25;260(18):10236-41.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Steinbusch HW, Verhofstad AA. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res.* 1983 Oct 31;277(2):355-60.

Références

- Sawchenko PE, Swanson LW. Localization, colocalization, and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain. *Fed Proc.* 1985 Jan;44(1 Pt 2):221-7.
- Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol.* 1983 Aug 1;218(2):121-44.
- Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res.* 1982 Nov;257(3):275-325.
- Saydoff JA, Rittenhouse PA, van de Kar LD, Brownfield MS. Enhanced serotonergic transmission stimulates oxytocin secretion in conscious male rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991 Apr;257(1):95-9.
- Scantamburlo G, Anseau M, Legros JJ. Role of the neurohypophysis in psychological stress. *Encephale.* 2001 May-Jun;27(3):245-59.
- Schagen FH, Knigge U, Kjaer A, Larsen PJ, Warberg J. Involvement of histamine in suckling-induced release of oxytocin, prolactin and adrenocorticotropin in lactating rats. *Neuroendocrinology.* 1996 Jun;63(6):550-8.
- Scharrer B, and Scharrer E. Acomparaison between intracerebralis cardiacum allatum system of the insect and hypothalamo hypophyseal system of vertebrates. *Neurosecretion. VI.* 1944 *Biol. Bull.* 87, 242-251.
- Schilling K, Schmale H, Oeding P, Pilgrim C. Regulation of vasopressin expression in cultured diencephalic neurons by glucocorticoids. *Neuroendocrinology.* 1991 May;53(5):528-35.
- Schrier R. W. *Dans: Vasopressin.* New york : Raven, 1985.
- Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:153-83.
- Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS.* 1999 Jan;107(1):137-43.
- Sherman TG, Civelli O, Douglass J, Herbert E, Watson SJ Coordinate expression of hypothalamic pro-dynorphin and pro-vasopressin mRNAs with osmotic stimulation. *Neuroendocrinology.* 1986;44(2):222-8.
- Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature.* 1991 Jan 24;349(6307):326-8.
- Shioda S, Nakai Y. Noradrenergic innervation of vasopressin-containing neurons in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *Neurosci Lett.* 1992 Jun 22;140(2):215-8.
- Shioda S, Yada T, Muroya S, Takigawa M, Nakai Y. Noradrenaline activates vasopressin neurons via alpha1-receptor-mediated Ca²⁺ signaling pathway. *Neurosci Lett.* 1997 May 2;226(3):210-2.
- Sklar AH, Schrier RW. Central nervous system mediators of vasopressin release. *Physiol Rev.* 1983 Oct;63(4):1243-80.

Références

- Sladek CD, Knigge KM. Cholinergic stimulation of vasopressin release from the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology*. 1977 Aug;101(2):411-20.
- Smith MS, Phalin CM. & Hoffman GE. Use of c-Fos expression to map the neuroanatomical pathway activated by sucking stimulus: brainstem and hypothalamic activation. *Soc. Neurosci. Abstr*: 20 862, 1994.
- Smithson KG, Weiss ML, Hatton GI. Supraoptic nucleus afferents from the main olfactory bulb--I. Anatomical evidence from anterograde and retrograde tracers in rat. *Neuroscience*. 1989;31(2):277-87.
- Sobel RA. The extracellular matrix in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998 Mar;57(3):205-17.
- Song SL, Crowley WR, Grosvenor CE. Evidence for involvement of an adrenal catecholamine in the beta-adrenergic inhibition of oxytocin release in lactating rats. *Brain Res*. 1988 Aug 9;457(2):303-9.
- Srisawat R, Ludwig M, Bull PM, Douglas AJ, Russell JA, Leng G. Nitric oxide and the oxytocin system in pregnancy. *J Neurosci*. 2000 Sep 1;20(17):6721-7.
- Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*. 1997 May;18(5):691-6.
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001 Sep 21;106(6):675-83.
- Steinbusch HW. Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience*. 1998 Nov;87(1):207-41.
- Stern JE, Hestrin S, Armstrong WE. Enhanced neurotransmitter release at glutamatergic synapses on oxytocin neurones during lactation in the rat. *J Physiol*. 2000 Jul 1;526 Pt 1:109-14.
- Stern JE, Zhang W. Cellular sources, targets and actions of constitutive nitric oxide in the magnocellular neurosecretory system of the rat. *J Physiol*. 2005 Feb 1;562(Pt 3):725-44.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
- Stupack DG, Cheresh DA. ECM remodeling regulates angiogenesis: endothelial integrins look for new ligands. *Sci STKE*. 2002 Feb 12;2002(119):PE7.
- Svane PC, Thorn NA, Richter D, Mohr E. Effect of hypoosmolality on the abundance, poly(A) tail length and axonal targeting of arginine vasopressin and oxytocin mRNAs in rat hypothalamic magnocellular neurons. *FEBS Lett*. 1995 Oct 2;373(1):35-8.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*. 2005 May;4(2):141-94.
- Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci*. 6: 296-324, 1983.

Références

Swanson LW, Sawchenko PE, Berod A, Hartman BK, Helle KB, Vanorden DE. An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1981 Feb 20;196(2):271-85.

Swanson LW, Sawchenko PE, Wiegand SJ, Price JL. Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Res.* 1980 Sep 29;198(1):190-5.

Szabo C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 1996;41(3):131-41.

Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci.* 2002 Feb 1;22(3):920-30.

Szot P, Bale TL, Dorsa DM. Distribution of messenger RNA for the vasopressin V1a receptor in the CNS of male and female rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994 Jul;24(1-4):1-10.

T

Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y. Cholinergic input to the supraoptic nucleus increases Fos expression and body temperature in rats. *Pflugers Arch.* 2001a Jun;442(3):451-8.

Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y. Hypothalamic cholinergic and noradrenergic neurons in hyperglycemia induced by 2-deoxyglucose. *Brain Res.* 1994 Nov 28;665(1):13-7.

Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y. Hypothalamic cholinergic activity and 2-deoxyglucose-induced hyperglycemia. *Brain Res Bull.* 1997;43(1):65-8.

Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y. Hypothalamic cholinergic activity associated with 2-deoxyglucose-induced hyperglycemia. *Brain Res.* 1996 Sep 23;734(1-2):116-22.

Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y. Opposite regulation of body temperature by cholinergic input to the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus in rats. *Brain Res.* 2001b Aug 3;909(1-2):102-11.

Tappaz ML, Oertel WH, Wassef M, Mugnaini E. Central GABAergic neuroendocrine regulations: pharmacological and morphological evidence. *Prog Brain Res.* 1982;55:77-96.

Tasker JG, Di S, Boudaba C. Functional synaptic plasticity in hypothalamic magnocellular neurons. *Prog Brain Res.* 2002;139:113-9.

Terrell ML, Salas N, Bui V, Summy-Long JY, Kadekaro M. NO inhibition of the magnocellular neuroendocrine system in rats is independent of cGMP signaling pathway. *Exp Neurol.* 2003 Dec;184(2):846-56.

Références

Theulier D, Moos F, Richard P, Stoeckel ME. Evidence for connections between a discrete hypothalamic dorsochiasmatic area and the supraoptic and paraventricular nuclei. *Brain Res Bull.* 1994;34(3):261-74.

Theodosis DT, el Majdoubi M, Gies U, Poulain DA. Physiologically-linked structural plasticity of inhibitory and excitatory synaptic inputs to oxytocin neurons. *Adv Exp Med Biol.* 1995;395:155-71.

Theodosis DT, Montagnese C, Rodriguez F, Vincent JD, Poulain DA. Oxytocin induces morphological plasticity in the adult hypothalamo-neurohypophysial system. *Nature.* 1986 Aug 21-27;322(6081):738-40.

Theodosis DT, Piet R, Poulain DA, Oliet SH. Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochem Int.* 2004 Sep;45(4):491-501.

Theodosis DT, Poulain DA. Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience.* 1993 Dec;57(3):501-35.

Theodosis DT, Trailin A, Poulain DA. Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 May;290(5):R1175-82.

Theodosis DT. Oxytocin-secreting neurons: A physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* 2002 Jan;23(1):101-35.

Thibonnier M. & Clauser E. Vasopressin: neurohypophyse, Coeur et vaisseaux. Dans : *Hormone, cœur et vaisseaux.* Hittinger L, Berthezène A., Castagne et al., Eds INSERM, pp. 1-26, 1996.

U

Ueta Y, Levy A, Chowdrey HS, Lightman SL. Water deprivation in the rat induces nitric oxide synthase (NOS) gene expression in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neurosci Res.* 1995 Oct;23(3):317-9.

Uhl GR, Zingg HH, Habener JF. Vasopressin mRNA in situ hybridization: localization and regulation studied with oligonucleotide cDNA probes in normal and Brattleboro rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Aug;82(16):5555-9.

V

Vaccari C, Lolait SJ, Ostrowski NL. Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. *Endocrinology.* 1998 Dec;139(12):5015-33.

Vacher CM, Fretier P, Creminon C, Calas A, Hardin-Pouzet H. Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J Neurosci.* 2002 Mar 1;22(5):1513-22.

Références

- Vacher CM, Hardin-Pouzet H, Steinbusch HW, Calas A, De Vente J. The effects of nitric oxide on magnocellular neurons could involve multiple indirect cyclic GMP-dependent pathways. *Eur J Neurosci.* 2003 Feb;17(3):455-66.
- Vaillant C, Didier-Bazes M, Hutter A, Belin MF, Thomasset N. Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci.* 1999 Jun 15;19(12):4994-5004.
- Van den Pol AN, Wuarin JP, Dudek FE. Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science.* 1990 Nov 30;250(4985):1276-8.
- Van den Pol AN. Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *J Neurosci.* 1991 Jul;11(7):2087-101.
- Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Oct 3;1528(2-3):61-73.
- Van Leeuwen F, Caffè R. Vasopressin-immunoreactive cell bodies in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Cell Tissue Res.* 1983;228(3):525-34
- Van Tol HH, van den Buuse M, de Jong W, Burbach JP. Vasopressin and oxytocin gene expression in the supraoptic and paraventricular nucleus of the spontaneously hypertensive rat (SHR) during development of hypertension. *Brain Res.* 1988 Dec;464(4):303-11.
- Vandesande F, Dierickx K, De Mey J. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibres of the external region of the median eminence of the rat hypophysis. *Cell Tissue Res.* 1977 Jun 13;180(4):443-52.
- Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, Yong VW. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res.* 2000 Jul 15;61(2):212-24.
- Ventura RR, Giusti-Paiva A, Gomes DA, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. *Neurosci Lett.* 2005 May 6;379(2):75-80.
- Verbalis JG, Mangione MP, Stricker EM. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology.* 1991 Mar;128(3):1317-22.
- Villar MJ, Ceccatelli S, Ronnqvist M, Hokfelt T. Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Res.* 1994 May 2;644(2):273-81.
- Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 1992;46(4):755-84.
- Voisin DL, Chapman C, Poulain DA, Herbison AE. Extracellular GABA concentrations in rat supraoptic nucleus during lactation and following haemodynamic changes: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience.* 1994 Nov;63(2):547-58.

Références

Voisin DL, Herbison AE, Poulain DA. Central inhibitory effects of muscimol and bicuculline on the milk ejection reflex in the anaesthetized rat. *J Physiol.* 1995 Feb 15;483 (Pt 1):211-24.

Vos CM, van Haastert ES, de Groot CJ, van der Valk P, de Vries HE. Matrix metalloproteinase-12 is expressed in phagocytotic macrophages in active multiple sclerosis lesions. *Neuroimmunol.* 2003 May;138(1-2):106-14.

Vrang N, Mikkelsen JD, Larsen PJ. Direct link from the suprachiasmatic nucleus to hypothalamic neurons projecting to the spinal cord: a combined tracing study using cholera toxin subunit B and Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *Brain Res Bull.* 1997;44(6):671-80.

W

Wang YF, Shibuya I, Kabashima N, Setiadji VS, Isse T, Ueta Y, Yamashita H. Inhibition of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSC) by noradrenaline in rat supraoptic neurons through presynaptic alpha2-adrenoceptors. *Brain Res.* 1998 Oct 5;807(1-2):61-9.

Wang H, Morris JF. Presence of neuronal nitric oxide synthase in the suprachiasmatic nuclei of mouse and rat. *Neuroscience.* 1996 Oct;74(4):1059-68.

Woessner JF, Nagasse H. *Matrix Metalloproteinases and TIMP* (Oxford Univ. Press) 2000.

Watkins WB, Choy VJ. Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophysial system. III. Localization of oxytocin- and vasopressin-containing neurons in the pig hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 1977 Jun 13;180(4):491-503.

Whitnall MH, Gainer H, Cox BM, Molineaux CJ. Dynorphin-A-(1-8) is contained within vasopressin neurosecretory vesicles in rat pituitary. *Science.* 1983 Dec 9;222(4628):1137-9.

Whitnall MH, Key S, Gainer H. Vasopressin-containing and vasopressin-deficient subpopulations of corticotropin-releasing factor axons are differentially affected by adrenalectomy. *Endocrinology.* 1987 May;120(5):2180-2.

Wiegand SJ, Price JL. Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. *J Comp Neurol.* 1980 Jul 1;192(1):1-19.

Willems E, Knigge U, Jorgensen H, Kjaer A, Warberg J. Effect of selective blockade of catecholaminergic alpha and beta receptors on histamine-induced release of corticotropin and prolactin. *Neuroendocrinology.* 1999 May;69(5):309-15.

Willoughby JO, Jervois PM, Menadue MF, Blessing WW. Noradrenaline, by activation of alpha-1-adrenoceptors in the region of the supraoptic nucleus, causes secretion of vasopressin in the unanaesthetized rat. *Neuroendocrinology.* 1987 Mar;45(3):219-26.

Windle RJ, Luckman SM, Stoughton RP, Forsling ML. The effect of pinealectomy on osmotically stimulated vasopressin and oxytocin release and Fos protein production within the hypothalamus of the rat. *J Neuroendocrinol.* 1996 Oct;8(10):747-53.

Wright JW, Harding JW. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog Neurobiol.* 2004 Mar;72(4):263-93.

Références

Wright JW, Reichert JR, Davis CJ, Harding JW. Neural plasticity and the brain renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002 Aug;26(5):529-52.

X

Xiao M, Ding J, Wu L, Han Q, Wang H, Zuo G, Hu G. The distribution of neural nitric oxide synthase-positive cerebrospinal fluid-contacting neurons in the third ventricular wall of male rats and coexistence with vasopressin or oxytocin. *Brain Res.* 2005 Mar 21;1038(2):150-62.

Y

Yamashita H, Inenaga K, Kannan H. Depolarizing effect of noradrenaline on neurons of the rat supraoptic nucleus in vitro. *Brain Res.* 1987 Mar 10;405(2):348-52.

Yamaguchi K, Hama H. A study on the mechanism by which sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, applied to the anteroventral third ventricular region provokes facilitation of vasopressin secretion in conscious rats. *Brain Res.* 2003 Apr 4;968(1):35-43.

Yang QZ, Hatton GI. Nitric oxide via cGMP-dependent mechanisms increases dye coupling and excitability of rat supraoptic nucleus neurons. *J Neurosci.* 1999 Jun 1;19(11):4270-9.

Yang EV, Bane CM, MacCallum RC, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Glaser R. Stress-related modulation of matrix metalloproteinase expression. *J Neuroimmunol.* 2002 Dec;133(1-2):144-50.

Yang QZ, Hatton GI. Histamine mediates fast synaptic inhibition of rat supraoptic oxytocin neurons via chloride conductance activation. *Neuroscience.* 1994 Aug;61(4):955-64.

Yang EV, Sood AK, Chen M, Li Y, Eubank TD, Marsh CB, Jewell S, Flavahan NA, Morrison C, Yeh PE, Lemeshow S, Glaser R. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res.* 2006 Nov 1;66(21):10357-64.

Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci.* 1998 Feb;21(2):75-80.

Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Jul;2(7):502-11.

Yong VW. The potential use of MMP inhibitors to treat CNS diseases. *Expert Opin Investig Drugs.* 1999 Mar;8(3):255-68.

Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Araki T, Maeno H, Tanizawa O, Tohyama M. Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology.* 1993 Sep;133(3):1239-46.

Yoshiyama Y, Asahina M, Hattori T. Selective distribution of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol (Berl).* 2000 Feb;99(2):91-5.

Young WS 3rd, Shepard E, Amico J, Hennighausen L, Wagner KU, LaMarca ME, McKinney C, Ginns EI. Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *J Neuroendocrinol.* 1996 Nov;8(11):847-53.

Young WS 3rd, Warden M, Mezey E. Tyrosine hydroxylase mRNA is increased by hyperosmotic stimuli in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology*. 1987 Nov;46(5):439-44.

Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 2000 Oct 6;275(40):31226-32.

Yu KL, Tamada Y, Suwa F, Fang YR, Tang CS. Age-related changes in oxytocin-, arginine vasopressin- and nitric oxide synthase-expressing neurons in the supraoptic nucleus of the rat. *Life Sci*. 2006 Feb 2;78(10):1143-8.

Yuan Q, Scott DE, So KF, Wu W. Developmental changes of nitric oxide synthase expression in the rat hypothalamoneurohypophyseal system. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006 Jan;288(1):36-45.

Z

Zaccaria ML, Di Tommaso F, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC. Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study. *Neuroscience*. 2001;104(2):311-24.

Zeevi M, Nevins JR, Darnell JE Jr. Newly formed mRNA lacking polyadenylic acid enters the cytoplasm and the polyribosomes but has a shorter half-life in the absence of polyadenylic acid. *Mol Cell Biol*. 1982 May;2(5):517-25.

Zhang K, McQuibban GA, Silva C, Butler GS, Johnston JB, Holden J, Clark-Lewis I, Overall CM, Power C. HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2003 Oct;6(10):1064-71. Epub 2003 Sep 21.

Zhong, D. Saito, F. Saito, Y. Nakamura, A. Shimizu, T. Matsumura, K. Characterization of the protease activity that cleaves the extracellular domain of beta-dystroglycan. 2006. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345, 867-71.

Zingg HH, Lefebvre D, Almazan G. Regulation of vasopressin gene expression in rat hypothalamic neurons. Response to osmotic stimulation. *J Biol Chem*. 1986 Oct 5;261(28):12956-9.

Zingg HH, Lefebvre DL. Oxytocin and vasopressin gene expression during gestation and lactation. *Brain Res*. 1988 Aug;464(1):1-6.

Zingg HH, Lefebvre DL. Oxytocin mRNA: increase of polyadenylate tail size during pregnancy and lactation. *Mol Cell Endocrinol*. 1989 Aug;65(1-2):59-62.