



**HAL**  
open science

# Implication des angiotensines cérébrales dans la maturation postnatale du phénotype tyrosine hydroxylase dans les neurones noradrénergiques bulbo-pontiques chez le rat

Michaël Ogier

► **To cite this version:**

Michaël Ogier. Implication des angiotensines cérébrales dans la maturation postnatale du phénotype tyrosine hydroxylase dans les neurones noradrénergiques bulbo-pontiques chez le rat. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2004. Français. NNT: . tel-00012030

**HAL Id: tel-00012030**

**<https://theses.hal.science/tel-00012030>**

Submitted on 24 Mar 2006

**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.

THESE  
présentée  
devant L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1  
pour l'obtention  
du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 30 mars 1992)

présentée et soutenue publiquement le 15 septembre 2004

par  
Michaël OGIER

**IMPLICATION DES ANGIOTENSINES CEREBRALES DANS LA MATURATION  
POSTNATALE DU PHENOTYPE TYROSINE HYDROXYLASE DANS LES  
NEURONES NORADRENERGIQUES BULBO-PONTIQUES CHEZ LE RAT**

Directeur de Thèse :  
Giampiero BRICCA

Co-encadrant :  
Laurent BEZIN

JURY : M. le Professeur Jean-Marc PEQUIGNOT  
M. le Professeur André NIEOULLON  
M. le Docteur Jean CHAMPAGNAT  
M. le Docteur Giampiero BRICCA  
M. le Docteur Laurent BEZIN

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Examineur

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I

## **Président de l'université**

Vice-Président du Conseil Scientifique  
Vice-Président du Conseil d'Administration  
Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la  
Vie Universitaire  
Secrétaire Général

## **M. le Professeur D. DEBOUZIE**

M. le Professeur J.F. MORNEX  
M. le Professeur R. GARRONE

M. le Professeur G. ANNAT  
M. J.P. BONHOTAL

## SECTEUR SANTE

### Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec  
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche  
UFR de Médecine Lyon-Nord  
UFR de Médecine Lyon-Sud  
UFR d'Odontologie  
Institut des Sciences Pharmaceutiques et  
Biologiques  
Institut Techniques de Réadaptation  
Département de Formation et Centre de  
Recherche en Biologie Humaine  
Département de Formation à la Recherche et à  
L'Evaluation Pédagogiques

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. le Professeur J. DOURY

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : Mme le Professeur D. BOISSON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

Directeur : M. le Professeur M. LAVILLE

## SECTEUR SCIENCES

### Composantes

UFR de Physique  
UFR de Biologie  
UFR de Mécanique  
UFR de Génie Electrique et des Procédés  
UFR Sciences de la Terre  
UFR de Mathématiques  
UFR d'Informatique  
UFR de Chimie Biochimie  
UFR STAPS  
Observatoire de Lyon  
Institut des Sciences et des Techniques de  
L'Ingénieur de Lyon  
Département de 1<sup>er</sup> cycle Sciences  
IUT A  
IUT B  
Institut de Science Financières et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J.L. VIALLE

Directeur : M. le Professeur G. BOSQUET

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF

Directeur : M. P. THIRIET Maître de Conférences

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J.P. PUAUX

Directeur : M. J.C. DUPLAN Maître de Conférences

Directeur : M. le Professeur M. ODIN

Directeur : M. le Professeur G. MAREST

Directeur : M. le Professeur D. SERANT



**A ma famille,**

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

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier monsieur le Docteur Giampiero Bricca de m'avoir accueilli dans son équipe UCBL EA 3740 et de m'avoir fait confiance tout au long de ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier monsieur le Professeur Jean-Marc Pequignot et monsieur le Professeur Hervé Barré pour m'avoir accueilli à bras ouverts au sein du laboratoire CNRS-UCBL UMR 5123 et m'avoir permis de poursuivre ce travail dans les meilleures conditions expérimentales et scientifiques possibles. Je remercie également monsieur le Professeur Jean-Marc Pequignot pour avoir accepté avec autant d'enthousiasme d'être le directeur de mon jury de thèse.

Je remercie monsieur le Professeur André Nieoullon pour avoir consenti à être rapporteur de cette thèse. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour l'intérêt scientifique qu'il a porté à ce travail et pour les remarques pertinentes qui ont sans équivoques permis d'améliorer considérablement le présent manuscrit de thèse.

Je remercie monsieur le Docteur Jean Champagnat pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse sans aucune hésitation et pour avoir pris de son temps si précieux pour analyser avec autant de minutie le présent mémoire. Je le remercie pour l'intérêt scientifique évident qu'il a manifesté pour ce travail.

Parmi les membres du laboratoire CNRS-UCBL UMR 5123, je tenais à remercier tout particulièrement monsieur le Docteur Laurent Bezin sans qui cette thèse n'aurait pas eu de fondements. Je le remercie pour son soutien inconditionnel et son encadrement, autant scientifique que personnel, qui m'ont permis de prendre beaucoup de hauteur vis-à-vis de ce travail de thèse. Je le remercie très chaleureusement de m'avoir initié à la physiologie et de m'en avoir montré autant de facettes.

Je remercie madame le Docteur Laura Lambas-senas et monsieur le Docteur Jean-Louis Valatx pour leur gentillesse et leur disponibilité, et pour m'avoir permis d'aborder certains aspects comportementaux qui ont très sûrement contribué à augmenter l'intérêt scientifique global de ce travail de thèse.

Enfin, je remercie la région Rhône-Alpes qui a subventionné ce travail et m'a accordé une bourse dans le cadre du projet Emergence 1999.

Je remercie l'ensemble des membres de l'UMR 5123, et en particulier les futurs Docteurs Aël Laglaine, Fabrice Navarro, Jérémie Nadam, Caroline Romestaing et Christophe Soulage, ainsi que le Docteur David Perrin pour leur soutien moral et pour la bonne humeur qu'ils ont su apporter tout au long de ce travail de thèse. Je leur souhaite bonne chance pour l'avenir.

Je remercie les tout jeunes Docteurs Gwenaëlle Garin, Frédéric Aguilar et Mazen Kurdi, pour leur amitié dans les bons et les moins bons moments de ces 5 dernières années. J'espère qu'ils auront la carrière qu'ils méritent.

J'adresse mes plus vifs remerciements à toutes les personnes de mon entourage qui m'ont permis d'avancer constamment vers cet heureux dénouement. Je voulais ainsi remercier chaleureusement Gaël et Raphaël (mes amis d'enfance), Ben et Nath (les futurs monsieur et madame Petit), Marion, Michaël, Matilin et Maé (la petite famille Moreau), Stéphane, Marylène et Jean-Baptiste (la petite famille Rochet), Marie-France et tout particulièrement Emmanuelle.

Enfin, je souhaitais remercier mes plus fervents supporters : mes parents, Georges et Monique, mon frère et ma sœur, Eric et Muriel, et mes grands-parents, qui me manquent...





## LISTE DES PUBLICATIONS

**Ogier M**, Bezin L, Cottet-Emard JM, Bader M, Vincent M, Pequignot JM, McGregor J, Bricca G. Delayed maturation of catecholamine phenotype in nucleus tractus solitarius of rats with glial angiotensinogen depletion. *Hypertension* 2003,42:978-984.

**Ogier M**, Bricca G, Navarro F, Morales M, Bezin L. Tyrosine hydroxylase transport to dendrites may require phospho-MARCKS late in development. Soumission prévue dans *Nature*.

Bezin L, **Ogier M**, Ortemann C, Astier B, Renaud B, Lambas-Senas L. Enhanced tail pinch-induced activation of catecholamine metabolism in the pericerulean area of RU 24722-treated rats. En révision dans *Brain Research*.

## LISTE DES COMMUNICATIONS

### Communications Orales:

**Altered Nucleus tractus solitarii catecholaminergic neurons development in brain angiotensinogen depleted rats.**

*28<sup>ème</sup> rencontre de la société de pharmacologie Française 2002- RENNES*

### Communications par poster :

**Altérations du sommeil paradoxal chez le rat TGR(ASrAOGEN)680 déplété en angiotensinogène cérébral.**

Ogier M., Valatx J.L., Bezin L., Weissmann D., Bricca G.

*5<sup>ème</sup> congrès des Neurosciences Françaises 2001-TOULOUSE*

**Glial angiotensinogen controls the maturation and function of the nucleus of the solitary tract and the locus coeruleus noradrenergic neurons in rats.**

M. Ogier, L. Bezin, J.L. Valatx, J. Randon, D. Weissmann, G. Bricca.

*Congrès de la société Française de pharmacologie EPHAR 2001- LYON*

**Altered nucleus tractus solitarius catecholaminergic neurons ontogeny in cerebral angiotensinogen depleted rats.**

M. Ogier, L. Bezin, M. Vincent, G. Bricca

*Congrès de la société Européenne des Neurosciences FENS 2002- PARIS*



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b><u>CHAPITRE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>5</b>
<b>I- LE SYSTEME ANGIOTENSINERGIQUE CEREBRAL</b>	<b>5</b>
<i>I-1. Métabolisme et catabolisme des angiotensines cérébrales</i>	5
I-1.1. Biosynthèse des angiotensines cérébrales	5
I-1.1.1. Biosynthèse	5
I-1.1.2. Compartimentation cellulaire	6
I-1.1.3. Stockage et libération des angiotensines cérébrales	10
I-1.2. Clairance des angiotensines cérébrales	10
<i>I-2. L'angiotensinogène et les récepteurs aux angiotensines cérébrales</i>	10
I-2.1. L'angiotensinogène cérébral	11
I-2.1.1. Le gène de l'angiotensinogène	11
I-2.1.2. L'ARNm codant pour l'angiotensinogène	12
I-2.1.3. La protéine angiotensinogène	13
I-2.1.4. Ontogénèse de l'expression de l'angiotensinogène	13
I-2.2. Les récepteurs aux angiotensines	14
I-2.2.1. Les différents types de récepteurs aux angiotensines	14
I-2.2.2. Ontogénèse de l'expression des récepteurs au cours du développement	14
I-2.2.3. Couplage aux voies de seconds messagers	16
<i>I-3. Implication fonctionnelle du système angiotensinergique cérébral</i>	16
I-3.1. Régulation de la fonction cardiovasculaire	17
I-3.2. Régulation des fonctions cognitives	18
I-3.3. Le rat TGR(ASrAOGEN)680 : modèle d'étude des pathologies liées au dysfonctionnement du système angiotensinergique cérébral	19
<b>II- LA TYROSINE HYDROXYLASE</b>	<b>20</b>
<i>II-1. Le métabolisme des catécholamines</i>	20
II-1.1. Biosynthèse des catécholamines	20
II-1.2. Stockage et libération des catécholamines	22
II-1.3. Clairance des catécholamines	23
<i>II-2. Du gène à la protéine tyrosine hydroxylase active</i>	24
II-2.1. Le gène de la tyrosine hydroxylase	24
II-2.2. L'ARN messenger codant pour la tyrosine hydroxylase	25
II-2.3. La protéine tyrosine hydroxylase	26
<i>II-3. Régulations de la tyrosine hydroxylase</i>	28
II-3.1. Régulations phasiques	28
II-3.1.1. Régulation par les substrats et inhibition par les produits finaux	28
II-3.1.2. Régulation par changement de conformation allostérique	28
II-3.1.3. Régulation par la phosphorylation de l'enzyme	30
II-3.1.3.1. Protéines kinases impliquées et sites de phosphorylation	30
II-3.1.3.2. Mécanismes mis en jeu dans l'activation neuronale	30
II-3.1.3.3. Premiers messagers et mécanismes de transduction du signal	31
II-3.2. Régulations toniques	31
II-3.2.1. Régulation de l'activité spécifique de la tyrosine hydroxylase	31
II-3.2.2. Régulation de l'expression génique de la tyrosine hydroxylase	33
II-3.2.2.1. L'induction de la TH dans le SNC	33
II-3.2.2.2. Expression de la TH au cours du développement postnatal	34
II-3.2.2.3. Mécanismes moléculaires de l'induction génique	35
II-3.2.3. Régulation de la stabilité de l'ARN messenger de la tyrosine hydroxylase	36

III- LE LOCUS COERULEUS ET LE NOYAU DU FAISCEAU SOLITAIRE	37
III-1. Les corps cellulaires noradrénergiques et adrénérgiques centraux	37
III-2. Le locus coeruleus : la principale structure noradrénergique du SNC	38
III-2.1. Mise en place d'un noyau noradrénergique central	38
III-2.2. Organisation ultra-structurale des cellules du locus coeruleus	42
III-2.2.1. Les corps cellulaires des neurones du LC	42
III-2.2.1.1. Morphologie et répartition	42
III-2.2.1.2. Nature neurochimique des neurones coeruleus	43
III-2.2.2. Les prolongements des neurones du LC	44
III-2.2.2.1. Morphologie et répartition	44
III-2.2.2.2. L'APC : lieu de convergence des afférences au LC	44
III-2.2.3. Les cellules gliales	45
III-3. Locus coeruleus et fonctions	45
III-3.1. Activité spontanée des neurones du LC	46
III-3.2. Régulation coeruleus des cycles veille-sommeil	46
III-3.3. Régulation coeruleus de la fonction cardiovasculaire	47
III-3.4. Adaptation à des conditions stressantes	48
III-3.5. Régulation de l'activité des neurones du LC par les autorécepteurs	48
III-3.6. Pathologies liées au dysfonctionnement du système coeruleus	49
III-4. Le noyau du faisceau solitaire : premier relais central de l'arc baroréflexe	49
III-4.1. Etablissement d'un noyau noradrénergique et adrénérgique central	49
III-4.2. Les neurones du NTS	51
III-4.2.1. Les corps cellulaires et les prolongements	51
III-4.2.2. Nature biochimique des neurones du NTS	55
III-5. Fonctions du NTS	55
III-5.1. L'activité spontanée des neurones du NTS	57
III-5.2. Régulation de la fonction cardiovasculaire	58
III-5.3. Les dendrites des neurones du NTS : lieu de contact des afférences	58
III-5.4. Pathologies liées au dysfonctionnement du NTS	59
III-6. Implication fonctionnelle des dendrites des neurones du LC et du NTS	59
IV. MISE EN JEU DU SYSTEME ANGIOTENSINERGIQUE CEREBRAL DANS LA MODULATION DE LA NEUROTRANSMISSION NORADRENERGIQUE	61
IV-1. Le système angiotensinergique au niveau du noyau du faisceau solitaire et du locus coeruleus	62
IV-1.1. Le système angiotensinergique au niveau du noyau du faisceau solitaire	62
IV-1.2. Le système angiotensinergique au niveau du locus coeruleus	62
IV-2. Mécanismes intracellulaires mis en jeu dans les effets à court terme de l'angiotensine II	63
IV-3. Mécanismes intracellulaires mis en jeu dans les effets à long terme de l'angiotensine II	65
IV-3.1. Expression des protéines clés du métabolisme noradrénergique	67
IV-3.2. Transport neuritique des protéines clés du métabolisme noradrénergique	67
IV-4. Mécanismes intracellulaires mis en jeu dans les effets de l'angiotensine II sur les phénomènes d'apoptose et de différenciation neuronales	68
IV-5. MARCKS : modulateur du transport neuritique	69
IV-5.1. Structure et localisation de la protéine MARCKS	69
IV-5.2. Distribution de la protéine MARCKS dans les neurones noradrénergiques	69
IV-5.3. Phosphorylation de MARCKS et réorganisation du cytosquelette	71
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES</b>	<b>72</b>
I- ANIMAUX	72
I-1. Maintien des animaux avant le début des expérimentations	72
I-2. Traitement pharmacologique au NSD-1015	72
II- PREPARATION DES TISSUS	72
II-1. Prélèvement et préparation des tissus fixés	72

II-1.1. Fixation des tissus et prélèvement des cerveaux	73
II-1.2. Coupes des cerveaux perfusés	73
<i>II-2. Prélèvement et traitement des tissus frais</i>	73
II-2.1. Prélèvement des cerveaux et microdissection des structures d'intérêt	73
II-2.2. Préparation des homogénats de tissu frais	75
II-2.3. Préparation des échantillons avant les différents dosages	75
<b>III- PROCEDURES EXPERIMENTALES</b>	76
<i>III-1. Détections immunohistochimiques</i>	76
III-1.1. Coloration au crésyl violet	76
III-1.2. Détection immunohistochimique de la protéine TH	77
III-1.2.1. Détection simple sur coupes de cerveaux perfusés	77
III-1.2.2. Double détection immunohistochimique des protéines TH et phospho-MARCKS sur coupes de cerveaux perfusés	77
III-1.3. Détections immunohistochimiques de la GFAP et de MAP2	78
<i>III-2. Dosage neurochimique des catécholamines</i>	79
III-2.1. Principe de la technique de chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection électrochimique (HPLC-ED)	79
III-2.2. Etalonnage de la chaîne de chromatographie	79
III-2.3. Quantification de la noradrénaline	80
<i>III-3. Détection immunoautoradiographique de la protéine TH</i>	80
III-3.1. Etalonnage du marquage immunoautoradiographique	80
III-3.2. Immunoautoradiographie	81
<i>III-4. Quantification relative des ARN par RT conventionnelle et PCR en « point final »</i>	81
III-4.1. Purification des ARN totaux	82
III-4.2. Transcription inverse	82
III-4.3. Amplification des ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	82
III-4.3.1. Choix des amorces	82
III-4.3.2. Etalonnage de la réaction d'amplification par la méthode en « point final »	84
III-4.3.3. Amplification des ADN d'intérêts	84
<i>III-5. Détection des ARN par RT calibrée et PCR quantitative</i>	86
III-5.1. Transcription inverse calibrée	86
III-5.2. Amplification quantitative des ADN d'intérêt par la technique de PCR en « temps réel » (Lightcycler™)	87
III-5.2.1. Principe et avantages du Lightcycler	87
III-5.2.2. Choix des amorces	88
III-5.2.3. Etalonnage de la réaction d'amplification	88
III-5.2.4. Amplification des ADN d'intérêt	88
III-5.2.5. Identification de l'ADNc amplifié	90
<i>III-6. Mesure de la durée des cycles éveil-sommeil</i>	90
III-6.1. Principe	90
III-6.2. Enregistrement de l'activité cérébrale basale	91
III-6.3. Déprivation de sommeil	91
III-6.4. Enregistrement de l'activité cérébrale après déprivation de sommeil	91
<i>III-7. Test en open-field/actimétrie</i>	92
III-7.1. Principe	92
III-7.2. Réactivité à la nouveauté	93
III-7.3. Activité locomotrice spontanée	93
<b>IV- ANALYSE ET TRAITEMENT DES DONNEES</b>	93
<i>IV-1. Paramètres analysés</i>	93
IV-1.1. Analyse des coupes traitées en immunohistochimie	93
IV-1.2. Analyse des coupes traitées en double détection immunohistochimique	94
IV-1.3. Analyse des échantillons traités en immunoautoradiographie	94
IV-1.4. Analyse des échantillons traités en chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection électrochimique	95
IV-1.5. Analyse de l'abondance relative des ARNm par RT-PCR en « point final »	95

IV-1.6. Analyse de l'abondance relative des ARNm par RT calibrée et PCR quantitative	96
IV-1.7. Analyse des données obtenues par les mesures polygraphiques	96
IV-1.8. Analyse des mesures d'activité locomotrice	97
<i>IV-2. Expression des résultats</i>	97
<i>IV-3. Analyse statistique</i>	97
<b><u>CHAPITRE III : RESULTATS-DISCUSSIONS</u></b>	<b>98</b>
I- MISE EN PLACE DU PHENOTYPE TYROSINE HYDROXYLASE DANS LE NOYAU DU FAISCEAU SOLITAIRE AU COURS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL CHEZ LE RAT : COMPARAISON AVEC LE LOCUS COERULEUS	98
<i>I-1. Protocole expérimental</i>	99
<i>I-2. Résultats</i>	100
<i>I-3. Discussion</i>	103
<i>I-4. Conclusions</i>	105
II- MISE EN PLACE DU PHENOTYPE TYROSINE HYDROXYLASE DANS LE NOYAU DU FAISCEAU SOLITAIRE AU COURS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL CHEZ LE RAT TGR (ASrAOGEN)680	106
<i>II-1. Protocole expérimental</i>	107
<i>II-2. Résultats</i>	108
<i>II-3. Discussion</i>	119
<i>II-4. Conclusions</i>	122
III- ALTERATION DE LA MISE EN PLACE ET DE LA MATURATION DU PHENOTYPE TYROSINE HYDROXYLASE DANS LES NEURONES COERULEENS DES RATS TGR (ASrAOGEN)680	124
<i>III-1. Protocole expérimental</i>	125
<i>III-2. Résultats</i>	126
<i>III-3. Discussion</i>	143
<i>III-4. Conclusions</i>	151
IV- ETUDE COMPORTEMENTALE DES RATS CONTROLES ET TGR(ASrAOGEN)680 ADULTES	153
<i>IV-1. Protocole expérimental</i>	154
<i>IV-2. Résultats</i>	155
<i>IV-3. Discussion</i>	159
<i>IV-4. Conclusions</i>	163
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>164</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

- APA** : Amino-peptidase A
- APN** : Amino-peptidase N
- ADN(c)** : Acide désoxyribonucléique (complémentaire)
- AMP(c)** : Adénosine monophosphate (cyclique)
- Ang** : Angiotensine
- ANOVA I** : Analyse de variance à un facteur
- ANOVA II** : Analyse de variance à deux facteurs
- AOGEN** : Angiotensinogène
- APC** : Aire péricoeruléenne
- APK** : Aire périkaryale du locus coeruleus
- ARN(m)** : Acide ribonucléique (messenger)
- AS** : Antisens
- AT<sub>1,2,4</sub>** : Récepteurs aux angiotensines de types 1, 2, 4
- BET** : Bromure d'éthidium
- BH<sub>4</sub>** : Tétrahydrobioptérine sous forme réduite
- BSA** : Sérumalbumine bovine
- CA** : Catécholamines
- CaM KII** : Protéine kinase activée par le Ca<sup>2+</sup> et la calmoduline
- cdc2/cycline A** : Protéine kinase activée durant le cycle cellulaire
- CRE** : Elément de réponse à l'adénosine monophosphate cyclique
- CRF** : Facteur de libération de la corticotrophine
- DBH** : Dopamine-β-hydroxylase
- DDC** : DOPA décarboxylase
- E** : Jour embryonnaire
- ECA** : Enzyme de conversion de l'angiotensine
- GABA** : Acide gama aminobutyrique
- GAP-43** : Protéine associée à la pousse axonale 43
- GAPDH** : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
- GFAP** : Protéine fibrillaire acide gliale
- GTP** : Guanidine triphosphate
- HPLC-ED** : Chromatographie liquide à haute pression couplée à une détection électrochimique
- IA** : Coordonnée interaurale



**LC** : Locus coeruleus

**L-DOPA** : dihydroxyphénylalanine

**MAP2** : Protéine associée aux microtubules 2

**MAP kinase/ERK** : Protéine kinase activée par les mitogènes

**MAPKAP kinase** : Protéine kinase activée par les MAP kinases

**MARCKS** : Protéine myristoylée riche en alanine et substrat de la protéine kinase C

**MSK1** : Protéine kinase activée par le stress

**NA** : Noradrénaline

**NET** : Transporteur de la noradrénaline

**NRSE** : Élément « silencer » restreint aux neurones

**NTS** : Noyau du faisceau solitaire

**P** : Jour postnatal

**PB** : Tampon phosphate

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PCR** : Réaction de polymérisation en chaîne

**PF** : Paraformaldéhyde

**PKA** : Protéine kinase activée par l'AMP cyclique

**PKC** : Protéine kinase C

**PKG** : Protéine kinase activée par la guanosine monophosphate cyclique

**PNMT** : Phényléthanolamine-N-méthyltransférase

**PP2A** : Protéine phosphatase 2A

**PRAK** : Protéine kinase activée/régulée par p38

**PVN** : Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus

**RT** : Transcription inverse

**SN** : Substance noire

**SEM** : Ecartype à la moyenne

**TBE** : Tampon Tris-borate-EDTA

**TBS** : Tampon Tris salin

**TGR** : TGR(ASrAOGEN)680

**TH** : Tyrosine hydroxylase

**U.TH** : Unité de protéine TH

**u.a.** : Unité arbitraire

## *Introduction Générale*

---

La sérotonine, la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline sont les neurotransmetteurs monoaminergiques de quelques milliers de neurones qui joueraient, de part la configuration singulière de leurs différents compartiments cellulaires, un rôle primordial dans l'activité cérébrale. En effet, les périkarya des neurones monoaminergiques sont regroupés en noyaux, essentiellement localisés au niveau du tronc cérébral, focalisant ainsi une multitude d'informations afférentes. En revanche, leurs prolongements axonaux sont largement disséminés dans le système nerveux central (SNC), leur permettant d'étendre leur champ d'influence sur de larges territoires cibles. Grâce à cet important déploiement cytoarchitectural, ces noyaux participeraient à la modulation de nombreuses fonctions physiologiques vitales.

Le noyau du faisceau solitaire (NTS) et le locus coeruleus (LC) sont deux structures catécholaminergiques primordiales du SNC impliquées dans la régulation de la fonction cardiovasculaire et la mise en place des états de vigilance (voir pour revues Machado, 2001 ; Berridge et Waterhouse, 2003). Le NTS est une structure bulbaire regroupant une partie des corps cellulaires des neurones du groupe adrénérique C2 et des corps cellulaires des neurones du groupe noradrénérique A2, et constitue le premier relais central de l'arc baroréflexe. Une augmentation de la présence de noradrénaline au niveau du NTS est liée au développement de dysfonctionnements cardiovasculaires importants, tels qu'une hypotension et une bradycardie (De Jong et Nijkamp, 1976). Le LC est une structure pontique qui regroupe les corps cellulaires des neurones du groupe noradrénérique A6, et constitue la principale structure noradrénérique du SNC. Des altérations des neurones du LC sont souvent associées à des troubles psychiatriques, tels que l'anxiété, la dépression, l'agressivité, la schizophrénie et la chorée de Huntington (voir pour revue Berridge et Waterhouse, 2003).

Au sein des neurones catécholaminergiques, la synthèse du neurotransmetteur (dopamine, adrénaline, noradrénaline) dépend de la présence et de l'activité de la tyrosine hydroxylase (TH). Cette enzyme est la première à être mise en jeu dans le processus de biosynthèse des catécholamines et est également l'élément limitant de ce processus (Nagatsu et al., 1964). La TH est synthétisée au niveau des corps cellulaires catécholaminergiques. Elle est observée non seulement au niveau des périkarya catécholaminergiques, mais également au niveau de leurs prolongements axonaux et dendritiques. La protéine TH détectée au niveau des axones des neurones noradrénériques provient d'une synthèse somatique de TH et résulte d'un transport de la protéine par l'intermédiaire du flux axonal antérograde. La protéine TH observée au niveau des prolongements dendritiques résulterait également d'un

---

transport de la protéine provenant du pool somatique. Le mécanisme précis par lequel la TH somatique est adressée vers ces prolongements n'a toutefois pas été dévoilé.

Il a longtemps été considéré que l'influence des neurones catécholaminergiques sur leurs territoires cibles dépendait uniquement de la libération de neurotransmetteur par les terminales d'axones. Toutefois, une synthèse et une libération somato-dendritiques des catécholamines pourraient également participer au contrôle de l'activité neuronale au niveau du SNC (Nieoullon et al., 1977 ; Chéramy et al., 1981). Ce contrôle s'exercerait principalement sur les cellules localisées à proximité du lieu de libération des catécholamines par l'intermédiaire de contacts asynaptiques. Ainsi, le contrôle de la présence de TH dans les différents compartiments des neurones catécholaminergiques permettrait de moduler le territoire cérébral au niveau duquel se produisent une synthèse et une libération de neurotransmetteur.

Une plasticité dynamique de la synthèse et de l'activité de la TH a été observée à long terme dans les neurones catécholaminergiques à la suite de stimulus *physiologiques*, tels que le stress au froid ou l'exposition à une ambiance chaude (Richard et al., 1988 ; Garcia et al., 1994a), mais aussi à la suite de stimulus *pharmacologiques*, après traitements à la réserpine ou au RU24722 (Vindéburnol) (Labatut et al., 1988 ; Richard et al., 1989 ; Debure et al., 1992 ; Schmitt et al., 1993 ; Debure et al., 1994 ; Garcia et al., 1994b ; Debure et al., 1995), ou encore dans certaines situations *physiopathologiques*, en particulier engendrées expérimentalement par la dénervation ou l'inactivation sérotoninergique (Lewis et al., 1976 ; Crespi et al., 1980 ; McRae-Degeurce et al., 1982 ; Debure et al., 1994a,b).

Le modèle du Vindéburnol s'est avéré très intéressant, étant donné qu'il modifie certaines variables relatives au phénotype TH spécifiquement au niveau des neurones (nor)adrénergiques du LC et du NTS (Labatut et al., 1988 ; Garcia et al., 1994). En effet, le Vindéburnol stimule l'expression de la TH au niveau des neurones catécholaminergiques localisés dans ces deux structures, et fait également apparaître une expression de TH dans des cellules n'exprimant pas l'enzyme dans les conditions basales. Outre la stimulation de l'expression du gène codant pour la TH, le traitement au Vindéburnol modifie le processus de transport de la protéine dans les différents compartiments cellulaires des neurones catécholaminergiques. Ce traitement induit une forte augmentation de la quantité de TH dans les périkarya des neurones, ainsi qu'une forte augmentation des limites du marquage de la protéine au niveau de l'aire « périphérique » aux neurones, constituée majoritairement de dendrites, d'axones et de terminales d'axones (Garcia et al., 1994a ; Bezin et al., 1997, 2000a). La reproductibilité inter-individuelle de cet élargissement du champ « périphérique »

---

TH-immunopositif s'est avérée tellement forte qu'il a été suggéré que l'adressage de la TH dans les prolongements des neurones du LC et du NTS en réponse au traitement par le Vindéburnol faisait l'objet d'un contrôle déterminé génétiquement.

L'ensemble de ces observations suggère que les facteurs participant à la régulation physiologique de l'expression et du transport intracellulaire de la protéine TH seraient identiques au niveau du LC et du NTS. En outre, la régulation de l'expression et du transport intracellulaire de la protéine TH pourrait entraîner une augmentation du territoire cérébral soumis à l'influence catécholaminergique ayant pour origines le LC et le NTS.

Au niveau du LC, la régulation du processus de transport neuritique de la TH a également été observée au cours du développement postnatal. Le transport de la TH serait favorisé dans le compartiment axonal des neurones catécholaminergiques jusqu'à la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale (Bezin et al., 1994b,c). Au delà de ce stade du développement, la quantité de TH détectée dans la région du LC augmente. Ce phénomène est associé à une forte accumulation de la protéine dans l'aire « périphérique » aux neurones regroupant les prolongements catécholaminergiques, probablement en réponse à une modification du processus de transport intracellulaire de la TH (Bezin et al., 1994c). Ces résultats suggèrent qu'il existe dans les conditions physiologiques une plasticité du transport de la TH dans les neurites des neurones catécholaminergiques du LC à des stades précis du développement. Le modèle du Vindéburnol ayant révélé au niveau du NTS que la plasticité de la répartition de la TH entre les corps cellulaires et les prolongements des neurones catécholaminergiques est similaire à celle opérant au niveau du LC à l'âge adulte, il est probable que le processus de transport de la TH fasse également l'objet dans le NTS d'une profonde modification au cours de la période postnatale.

Les facteurs intrinsèques au SNC permettant la régulation de l'expression et du transport neuritique de la TH dans les neurones du LC et du NTS restent toutefois encore largement inconnus. Les études réalisées par Raizada et coll. ont mis en évidence que l'angiotensine II (Ang II), un produit de dégradation de l'angiotensinogène (AOPEN), stimule *in vitro* l'expression des gènes codant pour la TH, le transporteur membranaire de la noradrénaline (NET) et pour la dopamine bêta hydroxylase (DBH), au niveau de neurones noradrénergiques d'hypothalamus et de tronc cérébral par un mécanisme impliquant l'activation des récepteurs de type 1 aux angiotensines (AT1) (Yu et al., 1996 ; Gelband et al., 1997). Il a également été dévoilé que cette angiotensine stimule le transport neuritique de ces trois protéines (Lu et al., 1998 ; Wang et al., 2002). Ce phénomène impliquerait la

---

phosphorylation d'une protéine associée à la membrane plasmique interne des neurones, la protéine myristoylée riche en alanine et substrat de la protéine kinase C (MARCKS). Etant donné que les récepteurs AT1 sont fortement exprimés au niveau du LC et du NTS, ces résultats suggèrent que les angiotensines cérébrales pourraient participer *in vivo* à la régulation physiologique de l'expression et du transport neuritique de TH dans les neurones du LC et du NTS.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier le seul modèle animal d'inactivation spécifique du système angiotensinergique cérébral existant : le rat TGR(ASrAOGEN)680 (TGR). Ce rat exprime un transgène anti-sens du gène codant pour l'AOGEN, seul précurseur connu des angiotensines. En outre, la synthèse du transgène étant contrôlée par le promoteur de la protéine astrocytaire « GFAP » (protéine fibrillaire acide gliale), la déplétion en AOGEN est strictement restreinte au SNC. Etant donné que la GFAP est exprimée dès la fin de la période embryonnaire (Sancho-Tello et al., 1995), l'expression du transgène pourrait modifier l'établissement péri- et post- natal de l'expression et du transport neuritique de la TH au niveau du LC et du NTS.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse se sont axés autour de quatre objectifs :

- 1) Rechercher si différentes variables définissant le phénotype TH (quantités d'ARN messenger et de protéine TH) au niveau du NTS font l'objet d'une plasticité physiologique au cours du développement postnatal
- 2) rechercher si les variables mesurées dans le NTS et le LC des rats contrôles sont altérées chez des rats dépourvus d'angiotensines cérébrales
- 3) rechercher, aux âges auxquels ces altérations sont observées, si l'intégrité du transport neuritique de la protéine TH est modifié chez les rats dépourvus d'angiotensines cérébrales
- 4) rechercher si l'altération éventuelle de la plasticité du phénotype TH au cours du développement postnatal modifie à l'âge adulte le déroulement des fonctions physiologiques régulées par les neurones catécholaminergiques du NTS et du LC.

## ***Rappels Bibliographiques***

## I- LE SYSTEME ANGIOTENSINERGIQUE CEREBRAL

Dans ce chapitre seront développés certains points clés du système angiotensinergique cérébral. Ces éléments incluent notamment des informations concernant 1), la formation des angiotensines, avec une attention particulière apportée à la compartimentation cellulaire des réactions mises en jeu, 2), l'expression du seul précurseur connu des angiotensines, l'angiotensinogène et 3), la mise en place ontogénique de l'expression de l'angiotensinogène cérébral. Par ailleurs, l'implication fonctionnelle des angiotensines au niveau cérébral fera l'objet d'une discussion détaillée, mais restant toutefois dans les limites fixées par les enjeux de ce travail de thèse.

### *I-1. Métabolisme et catabolisme des angiotensines cérébrales*

#### **I-1.1. Biosynthèse des angiotensines cérébrales**

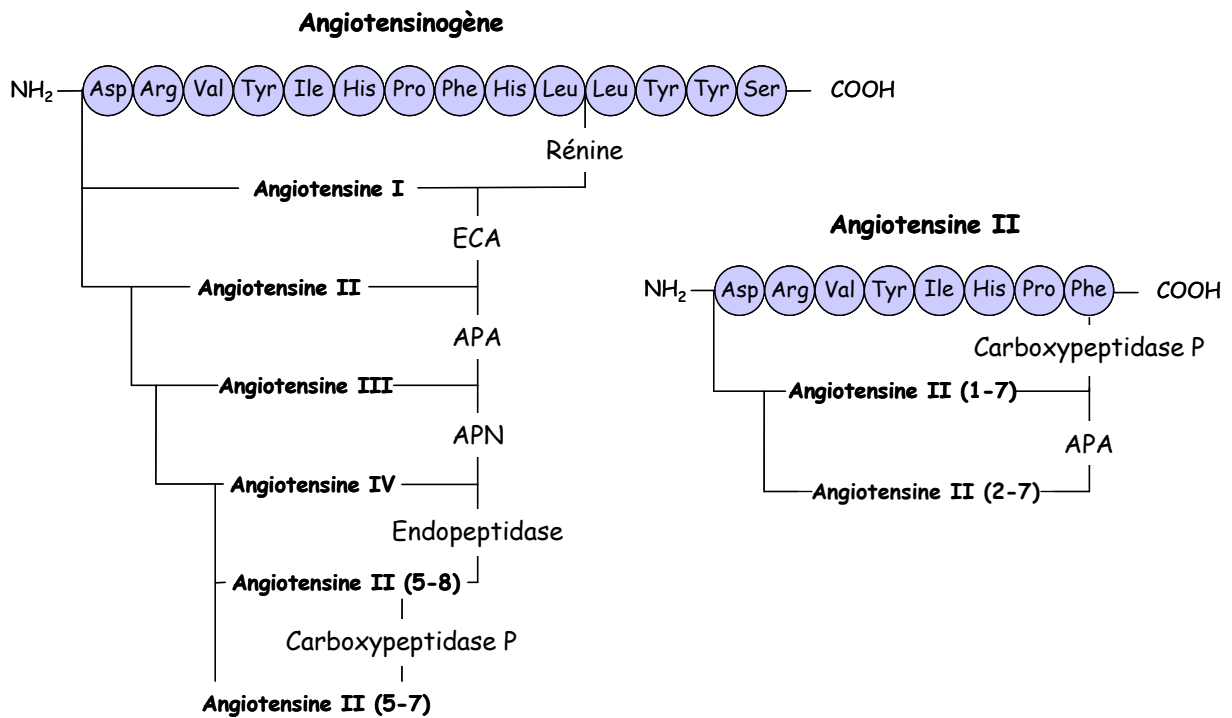
##### **I-1.1.1. Biosynthèse** (d'après Wright et Harding, 1997)

Il est communément accepté que le seul précurseur connu des angiotensines est l'angiotensinogène (AOPEN).

L'angiotensinogène (AOPEN) cérébral serait clivé par la rénine (EC 3.4.23.15), qui est une protéase, formant ainsi un décapeptide : l'angiotensine I (Ang I) (Figure I-1). L'Ang I serait ensuite clivée dans sa partie carboxyl-terminale par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA ; EC 3.4.15.1), qui est une zinc metalloprotéinase, constituant ainsi la première forme active des angiotensines: l'angiotensine II (Ang II). Néanmoins, étant donné la très faible expression de rénine retrouvée au niveau du cerveau, et sa forte parcellisation au sein du système nerveux central (SNC), il serait possible que l'Ang II soit en fait formée directement à partir de l'AOPEN par action de certaines enzymes comme la tonine (Araujo et al., 2002) ou les cathépsines D et/ou G. L'Ang II serait par la suite convertie d'une part en angiotensine II (2-8) ou angiotensine III (Ang III), qui est un heptapeptide, par action de l'aminopeptidase A (EC 3.4.11.7), et d'autre part en angiotensine II (1-7) [Ang II (1-7)] par action de la carboxypeptidase P (EC 3.4.16.1). En outre, il semblerait que l'Ang III puisse être formée alternativement à partir de l'Ang I, par l'intermédiaire de l'angiotensine I (2-10). L'Ang III est ensuite convertie en angiotensine II (3-8) ou angiotensine IV (Ang IV) sous l'action de l'aminopeptidase N (EC 3.4.11.2) ou de l'aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). Les Ang II, III, IV et II (1-7) seraient les seules angiotensines possédant une activité biologique directe au niveau du SNC. Néanmoins, quelques études suggèrent que l'Ang I (2-10) posséderait également une activité biologique propre et serait impliquée dans la régulation de



la fonction cardiovasculaire.



**Figure I-1 : Le métabolisme des angiotensines.**

D'après Wright et al, 1995

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine ; APA : Amino-peptidase A ; APN : Amino-peptidase N.

### I-1.1.2. Compartimentation cellulaire

La localisation des compartiments cérébraux au niveau desquels se produisent les différentes étapes de la formation des angiotensines cérébrales reste encore de nos jours controversée. Ceci est largement dû au fait que les différents protagonistes impliqués dans la formation des angiotensines cérébrales sont disséminés et exprimés en proportions inégales au niveau des différentes structures cérébrales (Tableau I-1, d'après Phillips et Sumners, 1998). Par ailleurs, les différents constituants impliqués dans le métabolisme des angiotensines cérébrales ont pu être détectés dans de nombreux types cellulaires, mais n'ont jamais pu être co-localisés à ce jour dans une même cellule :

- L'**AOGEN** est principalement détecté au niveau des astrocytes, mais a également été mis en évidence au niveau des neurones. La présence de l'ARN messager (ARNm) codant pour ce peptide est reconnue au niveau des cellules gliales (Stornetta et al., 1988), mais reste très controversée au niveau des neurones (Sernia, 1995 ; Sernia et al., 1997). L'AOGEN est par ailleurs

	Angiotensinogène	Rénine	Enzyme de conversion	Angiotensine II
Cortex cérébral	Faible	Faible	Faible	Faible
Hippocampe	Faible	?	Faible	Moyenne
Amygdale	Moyenne	?	Moyenne	Forte
Septum	Moyenne	?	Faible	Faible
Ganglion basal	Faible	Faible	Forte	Faible
Aire préoptique	Forte	?		Forte
Noyau paraventriculaire	Forte	?	Moyenne	Forte
Noyau supraoptique	Forte	?	Moyenne	Forte
Thalamus	Forte	?		Faible
Locus coeruleus	Faible	?	Moyenne	Faible
Noyau du faisceau solitaire	Forte	Moyenne	Forte	Forte
Olive inférieure	Forte	?	Moyenne	Moyenne
Cerebellum	Moyenne	?	Forte	Moyenne

**Tableau I-1 : Répartition et quantité relative des protagonistes majeurs de la formation des angiotensines cérébrales dans quelques structures du système nerveux central chez le rat adulte.** (D'après Gelband et al, 1997)

Des divergences existent dans la localisation des différents éléments mis en jeu dans la synthèse des angiotensines cérébrales. La rénine est très faiblement exprimée et l'enzyme de conversion de l'angiotensine n'est pas observée dans toutes les structures. Par ailleurs, les quantités relatives de chaque composante ne se recoupent pas.

retrouvé en forte quantité dans le liquide céphalo-rachidien, et proviendrait de sécrétions astrocytaire et neuronale, étant donné que des études réalisées *in vitro* ont mis en évidence que des cultures primaires d'astrocytes et de neurones peuvent toutes deux sécréter ce peptide (Sernia, 1995 ; Sernia et al., 1997).

- La **rénine** serait principalement détectée au niveau des neurones et en particulier au niveau des terminaisons (Husain et al., 1981), mais a également été mise en évidence au niveau des cellules gliales (Inagami et al., 1980a,b ; Fuxe et al., 1980).
- L'**ECA** a été détectée au niveau des neurones, des cellules gliales et des cellules endothéliales (Pickel et al., 1986a ; Dzau, 1990). Elle serait localisée sur la surface externe de la membrane de ces cellules (Pickel et al., 1986a), mais a cependant été co-localisée avec l'Ang II dans des vésicules de sécrétion neuronales (Pickel et al., 1986a). Elle est également retrouvée dans le liquide céphalo-rachidien (Unger et al., 1988).
- L'**Ang I** et l'**Ang II** sont retrouvées principalement au niveau des neurones, et particulièrement en grande quantité au niveau des terminaisons axonales et des dendrites (Pickel et al., 1986a ; Healy et Printz, 1984). L'Ang II a pu être détectée dans le noyau, les vésicules cytoplasmiques et les mitochondries de certains neurones (Erdmann et al., 1996). Elle a par ailleurs été détectée au niveau de cellules gliales et de cellules endothéliales. L'Ang I et l'Ang II sont de surcroît observées en grande quantité dans le liquide céphalo-rachidien.
- La distribution des différentes **aminopeptidases** responsables de la formation des angiotensines actives reste très floue. Il semblerait qu'au niveau cérébral, les aminopeptidases soient retrouvées sous deux formes : une forme liée aux membranes et une forme soluble (Alliot et al., 1999 ; Ramirez et al., 1990). Les **aminopeptidases A et N** ont été détectées au niveau des péricytes vasculaires, des neurones et des astrocytes (Healy et Wilk, 1993 ; Alliot et al., 1999 ; Gil et al., 2001 ; Ramirez-Exposito et al., 2001).

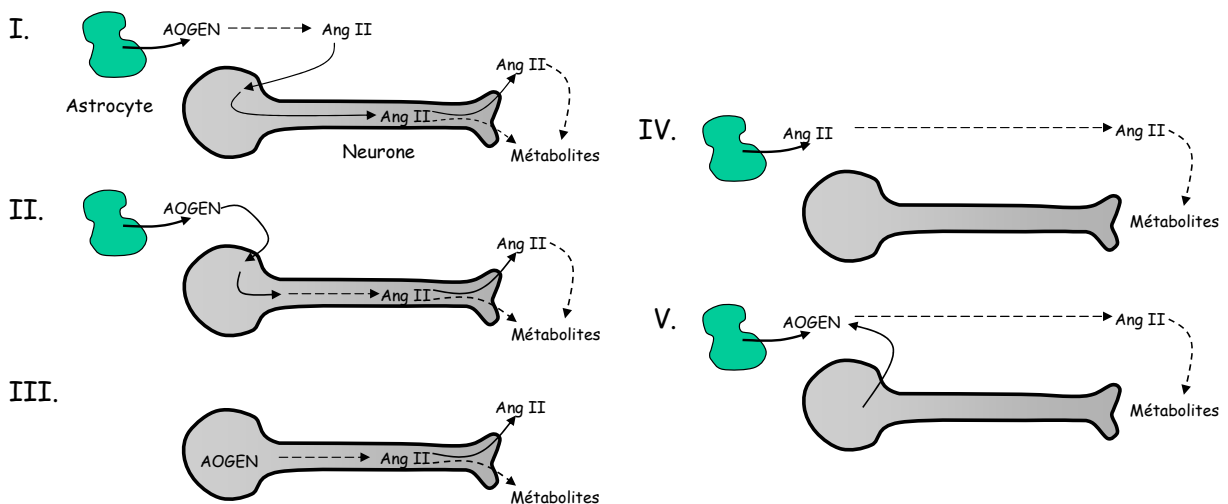
Etant donné que les différents protagonistes mis en jeu dans la formation des angiotensines cérébrales semblent largement disséminés au sein du SNC, différentes hypothèses quant à la formation de l'Ang II ont été formulées : une synthèse extracellulaire et une synthèse intracellulaire d'Ang II. Deux de ces hypothèses ont été formulées dès la fin des années 1980 (Moffet et al., 1987) :

La **première hypothèse** (Figure I-2, I.) mettrait en jeu la libération de l'AOPEN par les astrocytes, et serait suivie d'un processus extracellulaire complet menant à la formation d'Ang II via la rénine (ou une enzyme à activité de type rénine) et l'ECA, qui auraient été libérées dans le milieu extracellulaire. L'Ang II serait ensuite captée au niveau des neurones, afin d'être stockée en attendant d'être libérée. L'Ang II pourrait être ensuite métabolisée en

Ang III, IV et/ou II (1-7) à l'intérieur même du neurone ou encore dans le milieu extracellulaire après libération.

La **deuxième hypothèse** (Figure I-2, II.) mettrait également en jeu une libération astrocytaire d'AOPEN. L'AOPEN extracellulaire serait directement internalisé par les neurones, et serait dégradé en Ang II, voire en d'autres métabolites actifs de l'Ang II à l'intérieur du neurone.

La présence de l'ARNm et de la protéine AOPEN au sein des neurones suggère que l'Ang II, et ses métabolites actifs, pourraient être formés intégralement dans ces cellules (Figure I-2, III.). De plus, étant donné que la rénine et l'ECA seraient localisées dans les cellules gliales, les angiotensines cérébrales, tout au moins l'Ang II, pourraient être intégralement formées à l'intérieur des astrocytes (Figure I-2, IV). Par ailleurs, la forte concentration d'AOPEN observée dans le liquide céphalo-rachidien suggère que les angiotensines pourraient être formées dans le milieu extracellulaire (Figure I-2, V). Cette hypothèse implique que certains des effets centraux des angiotensines pourraient résulter d'un phénomène de transmission volumique.



**Figure I-2 : Les différentes hypothèses de la compartimentation de la synthèse des angiotensines cérébrales.**

AOPEN : Angiotensinogène ; Ang II : Angiotensine II

### **I-1.1.3. Stockage et libération des angiotensines cérébrales**

L'AOPEN ne serait pas stocké par les astrocytes et serait rapidement libéré après sa synthèse (Sernia, 1995). Au niveau neuronal, l'AOPEN a pu être localisé à l'intérieur de vésicules de sécrétion, suggérant qu'il pourrait être libéré par ces cellules (Pickel et al., 1986a ; Erdmann et al., 1996).

Des études réalisées au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus chez le rat, ou encore de cellules fœtales dissociées de cerveau de rat en culture, ont pu mettre en évidence qu'il existe une libération d'Ang II consécutive à la dépolarisation des membranes neuronales (Harding et al., 1992 ; Gadbut et al., 1992 ; Wright et al., 1993). La répartition intra-neuronale qu'adopte l'Ang II correspond à celle classiquement décrite pour les neurotransmetteurs : l'Ang II est détectée non seulement au niveau des corps cellulaires des neurones, mais aussi au niveau des prolongements axonaux et dendritiques (Erdmann et al., 1996). Ces observations indiquent la possibilité que ce peptide puisse être acheminé dans les prolongements de certains neurones avant d'être libéré en réponse à une activation neuronale, et pourrait être ainsi considéré comme un véritable neurotransmetteur/neuromodulateur.

### **I-1.2. Clairance des angiotensines cérébrales**

Selon Wright et Harding, l'Ang IV serait dégradée par actions successives d'endopeptidases, comme la chymotrypsine, et de la carboxypeptidase P, afin de former des angiotensines sans activité biologique. Selon von Bohlen und Halbach (von Bohlen und Halbach, 2003), l'Ang IV serait également métabolisée en angiotensine II (4-8), en angiotensine (5-8) et en angiotensine II (6-8) par actions successives de l'aminopeptidase A et de la dipeptidylaminopeptidase (EC 3.4.13.11). L'Ang II (1-7) serait dégradée en angiotensine II (2-7) par action de l'aminopeptidase A, puis en d'autres fragments apparemment inactifs tels que l'angiotensine II (3-7) [Ang II (3-7)]. Néanmoins, l'absence d'activité biologique de l'Ang II (3-7) serait remise en question puisque cette angiotensine a été impliquée dans les processus d'apprentissage (Karwowska-Polecka et al., 1997). Les compartiments cellulaires à l'intérieur desquels se produisent ces transformations restent encore à définir.

## ***I-2. L'angiotensinogène et les récepteurs aux angiotensines cérébrales***

La synthèse et la biodisponibilité des angiotensines cérébrales seraient dépendantes d'un grand nombre de facteurs, incluant notamment la synthèse du précurseur, l'AOPEN, l'activité des différentes enzymes de synthèse, en particulier la rénine et l'ECA, mais également des mécanismes de stockage, de libération et de dégradation. Par ailleurs, l'activité

biologique des angiotensines cérébrales dépend de la présence des récepteurs spécifiques de ces peptides au niveau des cellules cibles du SNC et de l'activation de certaines voies de seconds messagers. Dans la partie qui suit seront plus particulièrement développés certains points clés nécessaires à la compréhension de ce travail de thèse. Il sera notamment décrit de manière non exhaustive les structures génique et protéique de l'AOPEN, ainsi que la régulation centrale de l'expression de cette protéine. Etant donné le contexte dans lequel se place ce travail de thèse, une sous-partie sera spécifiquement dédiée à l'analyse de l'expression de cette protéine au cours du développement. Dans un second temps, seront exposées les données de la littérature décrivant 1), l'expression des différents types de récepteurs aux angiotensines cérébrales au sein du SNC au cours du développement, et 2), les voies de signalisations intracellulaires auxquelles ces derniers sont couplés.

## **I-2.1. L'angiotensinogène cérébral**

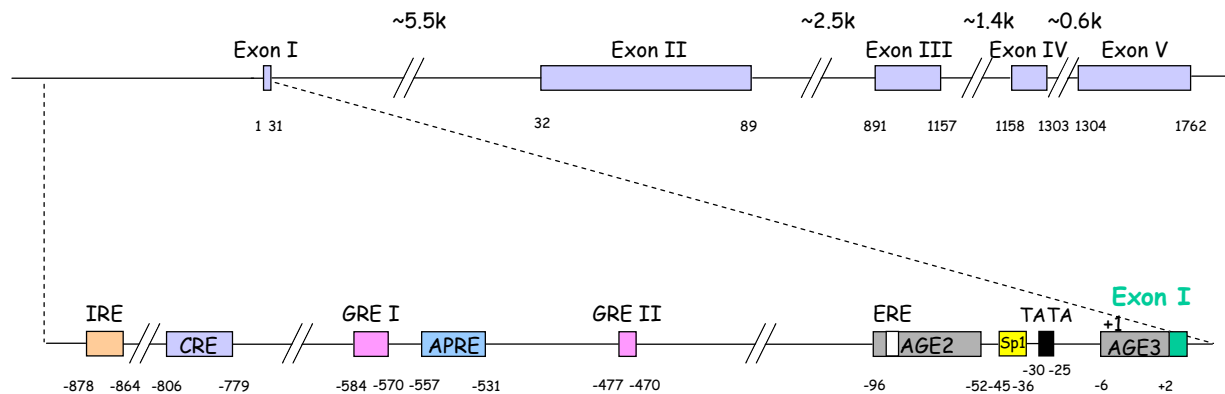
### **I-2.1.1. Le gène de l'angiotensinogène**

Le gène de l'AOPEN est présent en une seule copie chez toutes les espèces étudiées. Chez le rat, il se trouve sur le chromosome 19q (Mori et al., 1989) et mesure 11,8 kilobases (Ohkubo et al., 1983 ; cf Figure I-3). La structure de ce gène est très conservée. En effet, chez l'Homme, la souris et le rat, le gène de l'AOPEN est constitué par 5 exons et 4 introns (Ohkubo et al., 1983 ; Clouston et al., 1988 ; Gaillard et al., 1989 ; Fukamizu et al., 1990). La région située à l'extrémité 5' terminale du gène codant pour l'AOPEN chez l'Homme, la souris et le rat comporte de nombreuses séquences régulatrices de l'expression de ce gène. Ces séquences seraient par ailleurs importantes dans la spécificité tissulaire de l'expression de l'AOPEN chez l'homme (Fukamizu et al., 1990). La Figure I-3 montre les différentes séquences régulatrices identifiées dans la région promotrice du gène codant pour l'AOPEN chez le rat. Cette région est très conservée étant donné qu'elle possède 60 % d'homologie avec la séquence humaine.

Les différentes séquences régulatrices localisées dans la partie 5' terminale du gène codant pour l'AOPEN seraient toutes des séquences activatrices de son expression. Des études menées *in vitro* sur différentes préparations de cellules de foie et de rein ont mis en évidence que toutes les séquences régulatrices du gène codant pour l'AOPEN sont activables, et en particulier par les hormones (Feldmer et al., 1991 ; Brasier et Li, 1996 ; Wang et al., 1999 ; Chen et al., 2001). Au niveau cérébral, les glucocorticoïdes (Campbell et Habener, 1986 ; Kalinyak et Perlman, 1987 ; Deschepper et al., 1990 ; Bunnemann et al., 1993) ainsi que les hormones thyroïdiennes (Campbell et Habener, 1986 ; Hong-Brown et Deschepper, 1992), les estrogènes (Gordon et al., 1992 ; Healy et al., 1992) et les « facteurs activateurs du

gène de l'AOPEN » (Nishii et al., 1999) peuvent stimuler l'expression du gène codant pour l'AOPEN. Par ailleurs, le niveau d'expression du gène codant pour l'AOPEN au niveau des astrocytes est régulé par les interleukines 6 et 1 $\beta$  (Hong-Brown et Brown, 1994).

Au niveau du SNC, la régulation de l'expression du gène codant pour l'AOPEN serait distincte dans les différentes structures cérébrales (Bunnemann et al., 1993), suggérant que la régulation de l'expression de l'AOPEN cérébral est tissu-spécifique.

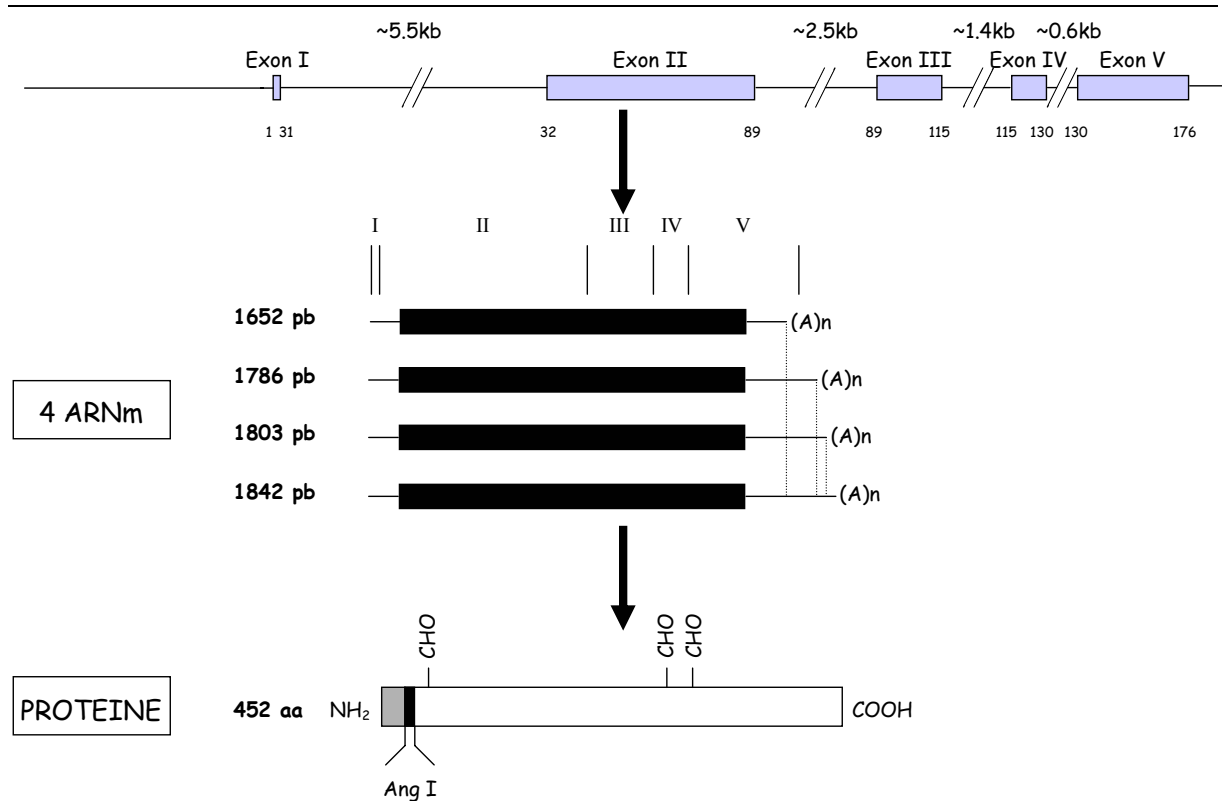


**Figure I-3 : Arrangements introniques et exoniques du gène codant pour l'angiotensinogène chez le rat, et représentation des séquences régulatrices de l'expression de ce gène situées en amont du site d'initiation de la transcription (+1).**

APRE : Elément de réponse en phase aigue ; IRE : Elément de réponse à l'insuline ; CRE : Elément de réponse à l'AMPC ; GRE : Elément de réponse aux glucocorticoïdes ; ERE : Elément de réponse aux oestrogènes ; AGE : Elément « enhancer » du gène de l'angiotensinogène.

### I-2.1.2. L'ARNm codant pour l'angiotensinogène

La transcription du gène codant pour l'AOPEN produit quatre isoformes d'ARNm-AOPEN (Figure I-4). Ces ARNm consistent en une séquence codante comprenant 1431 nucléotides, une séquence 5' terminale non-codante comprenant 61 nucléotides, résultant de la transcription de l'exon I et d'une partie de l'exon II, et une partie 3' terminale de taille variable (Ohkubo et al., 1983, 1986). L'hétérogénéité de la taille de la partie 3' non-codante provient du fait qu'elle comporte 4 sites de poly-adénylation dont la localisation diverge à l'intérieur de la séquence du gène de l'AOPEN. Toutes les isoformes de l'ARNm-AOPEN sont retrouvées dans le foie, le rein et le cerveau (Ohkubo et al., 1986).



**Figure I-4 : Représentations schématiques des ARNm codant pour l'angiotensinogène, formés par poly-adénylation différentielle, et structure de la protéine chez le rat.**

Au niveau de la protéine, le peptide signal est indiqué en gris et la portion de la protéine qui correspond à l'angiotensine I est représentée en noir. Les 3 sites de glycosylation de l'angiotensinogène sont représentés sur la protéine par des groupements CHO.

### I-2.1.3. La protéine angiotensinogène

Une seule protéine est traduite à partir des quatre isoformes de l'ARNm-AOGEN (Figure I-4). Chez le rat et la souris, la protéine mature est constituée par 453 acides aminés coiffés d'une séquence signal comportant 24 acides aminés. Elle comporte chez le rat 3 sites de glycosylation situés au niveau de motifs canoniques de type Asn-X-Ser (Ohkubo et al., 1983). Elle est très conservée au cours de l'évolution. En effet, il existe 87 % d'homologie entre les séquences en acides aminés de l'AOPEN du rat et de la souris, et 64 % entre celles du rat et de l'Homme (Clouston et al., 1988 ; Chan et al., 1990).

### I-2.1.4. Ontogénèse de l'expression de l'angiotensinogène

L'ARNm codant pour l'AOPEN a été détecté au niveau cérébral dès le jour embryonnaire (E) 15 (Kalinyak et al., 1991). L'expression de cet ARNm, mesurée dans le tissu cérébral par la technique de l'hybridation par slot blot, augmente rapidement après la naissance, puis décroît à partir du troisième mois de vie postnatale. La présence de la protéine AOPEN est détectée dès les stades fœtaux tardifs (Mungall et al., 1995). A partir de E20, la présence de l'AOPEN s'intensifie et apparaît au niveau des cellules astrocytaires. La présence



d'AOPEN neuronal apparaît à partir du jour de la naissance, au niveau du cerveau antérieur et du thalamus, et en particulier au niveau de l'hippocampe, du cortex cingulaire, de l'amygdale, des noyaux caudé-putamen, du pallidum et de l'habenula. Chez l'adulte, la majorité des cellules exprimant l'AOPEN au niveau du cortex sont des neurones. Dans les autres aires cérébrales, et en particulier au niveau de l'hypothalamus, la protéine AOPEN est détectée principalement au niveau des astrocytes.

### **I-2.2. Les récepteurs aux angiotensines**

Au niveau cérébral, les angiotensines et particulièrement l'Ang II provoquent, entre autre, une augmentation de l'activité de décharge des neurones (Felix et Schelling, 1982 ; Kang et al., 1992 ; Li et Ferguson, 1993 ; Li et Guyenet, 1995), et est notamment impliquée dans la modulation de la neurotransmission noradrénergique (Sumners et al., 1983 ; Stadler et al., 1992) (développé dans le chapitre IV). Par ailleurs, il a pu être mis en évidence que l'Ang II serait impliquée *in vitro* dans la régulation des phénomènes de différenciation et d'apoptose neuronales (Yang et al., 2001, 2002 ; Stroth et al., 1998 ; Laflamme et al., 1996 ; Yamada et al., 1996 ; Coté et al., 1999 ; Shenoy et al., 1999). Ces effets des angiotensines résultent de leur fixation à des récepteurs spécifiques : AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub>.

#### **I-2.2.1. Les différents types de récepteurs aux angiotensines**

Il existe au moins 3 types de récepteurs aux angiotensines: AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub> (voir pour revue De Gasparo et al., 2000). Le récepteur AT<sub>1</sub> peut lier par ordre décroissant d'affinité l'Ang II, l'Ang III et l'Ang I, et le récepteur AT<sub>2</sub> peut lier, dans le même ordre, l'Ang III, l'Ang II et l'Ang I. Le récepteur AT<sub>4</sub> ne semblerait pouvoir lier que l'Ang IV et la LVV-hémorphin-7, qui appartient à une classe de peptides endogènes obtenus par hydrolyse de la chaîne β de l'hémoglobine (voir pour revue von Bohlen und Halbach, 2003). Le récepteur AT<sub>1</sub> comporte chez le rat et chez la souris deux sous types, AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub>, codés par des gènes différents. Le récepteur AT<sub>1B</sub> est très peu exprimé, excepté au niveau de la glande pituitaire (Lenkei et al., 1999). Ces 3 types de récepteurs ont été mis en évidence au niveau du SNC chez le rat adulte et en général chez les mammifères (voir pour revues Wright et Harding, 1995 ; Allen et al., 1998).

#### **I-2.2.2. Ontogenèse de l'expression des récepteurs au cours du développement**

Une partie des observations décrivant la mise en place ontogénique de l'expression des récepteurs aux angiotensines au sein du SNC chez le rat est résumée dans le tableau I-2. Les ARNm codant pour les récepteurs AT<sub>1A</sub> et AT<sub>2</sub> sont détectés au niveau du SNC très tôt au

cours du développement (respectivement dès E19 et E13) (Nuyt et al., 1999, 2001). Néanmoins, le stade du développement marquant l'apparition de ces ARNm est différent selon les structures cérébrales (entre E13 et P28). En outre, des variations de quantité des ARNm-AT<sub>1A</sub> et -AT<sub>2</sub> ont été mises en évidence avec des profils différents selon les structures. Au niveau de certaines structures cérébrales, l'expression des ARNm codant pour AT<sub>1A</sub> et AT<sub>2</sub> est transitoire. L'ensemble de ces observations suggère que les angiotensines pourraient jouer un rôle dans la maturation de certaines structures du SNC ou encore dans l'établissement de certaines fonctions physiologiques au cours de périodes développementales bien définies et distinctes selon les structures cérébrales. L'expression des récepteurs AT<sub>1B</sub> au cours de l'ontogenèse n'a pas été étudiée.

Structure	ARNm-AT <sub>1A</sub>	Protéine AT <sub>1</sub>	Références
<b>Noyau du tractus solitaire</b>	½ + E19-P7 ; ++ P28 ; +++ Adulte	+	Nuyt et al., 2001 Millan et al., 1991a
<b>Locus coeruleus</b>	+ Adulte	+	Lenkei et al., 1998 Speth et al., 1991
<b>Noyau Ambigü</b>	+ E19 ; 0 E21-P7 ; +++ Adulte	-	Nuyt et al., 2001 Lenkei et al., 1998
<b>Substance noire</b>	++ P2 ; + P7 ; ++ P28 ; 0 Adulte	ND	Nuyt et al., 2001 Lenkei et al., 1998
<b>Noyau moteur du nerf vague</b>	-	+	Nuyt et al., 2001 Lenkei et al., 1998 Song et al., 1992
<b>Noyau du nerf hypoglosse</b>	+ P28 ; -Adulte	-	Nuyt et al., 2001 Lenkei et al., 1998 Millan et al., 1991a

Structure	ARNm-AT <sub>2</sub>	Protéine AT <sub>2</sub>	Références
<b>Noyau du tractus solitaire (latéral)</b>	+ E19 ; ++ E21 ; 0 P2 ; + P7-P28 ; ++ Adulte	+	Nuyt et al., 1999 Lenkei et al., 1996 Wright et al., 1995
<b>Locus coeruleus</b>	+ E19-P7 ; ++ P28-Adulte	+	Nuyt et al., 1999 Lenkei et al., 1996, 1997
<b>Noyau rouge</b>	++ E15-E17 ; 0 E19-P2 ; +++ P28-Adulte	ND	Nuyt et al., 1999 Lenkei et al., 1997
<b>Complexe olivaire supérieur</b>	++ E19-E21 ; 0 Adulte	ND	Nuyt et al., 1999

**Tableau I-2 : Expression des récepteurs AT1 et AT2 au cours du développement chez le rat.**

La détection des ARNm a été réalisée par une technique d'hybridation *in situ* à l'aide de ribosondes radioactives. Les symboles utilisés définissent le taux relatif d'expression des ARNm (½ + : très faible ; + : faible ; ++ : moyen ; +++ : fort ; 0 : pas détecté). La présence des protéines respectives des récepteurs est représentée pour les rats adultes. Les observations ont été réalisées par technique de liaison généralement de <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>]Ang II et déplacement à l'aide d'antagonistes spécifiques discriminant les sous-types de récepteurs.

Les données obtenues à partir d'études de fixation de ligands spécifiques des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> corroborent généralement les données recueillies en ce qui concerne les ARNm-AT<sub>1A</sub> et -AT<sub>2</sub> (Tsutsumi et Saavedra, 1991 ; Millan et al., 1991a,b ; Tsutsumi et al., 1993).

Jusqu'au début des années 2000, toutes les recherches convergeaient consensuellement vers une localisation neuronale des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Cependant, ces récepteurs sont également localisés au niveau des astrocytes et des oligodendrocytes chez le rat adulte, principalement dans la matière blanche cérébrale (Fogarty et Matute, 2001).

Jusqu'à présent, aucune étude ne présente le profil ontogénique de l'expression du récepteur AT<sub>4</sub>. Néanmoins, la répartition des sites de fixation de l'Ang IV dans le cerveau du rat adulte est assez bien documentée et serait très conservée au cours de l'évolution (voir pour revues Wright et Harding, 1995, 1997 ; von Bohlen und Halbach, 2003). Il semblerait que le récepteur AT<sub>4</sub> soit exprimé aussi bien par les neurones que par les astrocytes en culture (Greenland et al., 1996).

### **I-2.2.3. Couplage aux voies de seconds messagers**

Les deux sous-types du récepteur AT<sub>1</sub> semblent associés à la stimulation des mêmes voies de transduction du signal (Sandberg et al., 1992), impliquant l'activation d'une protéine G. En effet, la fixation de l'Ang II sur les récepteurs AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub> active notamment la protéine kinase C, la phospholipase C, la voie de signalisation impliquant Ras, Raf-1 et la protéine kinase activée par les mitogènes (MAP kinase), ainsi que la « NH<sub>2</sub>-terminal jun kinase » (voir chapitre IV) (voir pour revue Sumners et al., 2002). Les récepteurs AT<sub>2</sub> sont couplés à une protéine G inhibitrice dont l'activation stimule la phospholipase A<sub>2</sub> et la protéine phosphatase 2A. Les voies de signalisations intracellulaires couplées aux récepteurs AT<sub>4</sub> sont encore inconnues. Il semble cependant que ce récepteur ne soit pas couplé à une protéine G.

### ***I-3. Implication fonctionnelle du système angiotensinergique cérébral***

Le système angiotensinergique cérébral est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. Les angiotensines cérébrales régulent notamment la fonction cardiovasculaire, et il apparaît qu'elles sont également impliquées dans la régulation de certains comportements. Les effets que produisent les angiotensines sur ces fonctions physiologiques pourraient en partie résulter de leur effet modulateur de l'activité des neurones localisés dans le noyau du faisceau solitaire et le locus coeruleus.

---

### I-3.1. Régulation de la fonction cardiovasculaire

Le système angiotensinergique cérébral est étroitement lié à la régulation centrale de la fonction cardiovasculaire. En effet, au niveau cérébral le système angiotensinergique module notamment le système sympathique (voir pour revues Wright et Harding, 1992, 1995 ; Unger et al., 1988), qui est impliqué dans la régulation tonique de l'homéostasie cardiovasculaire et en particulier dans la régulation de la pression artérielle.

Des injections intracérébroventriculaires d'Ang II produisent un effet presseur, ainsi qu'un effet stimulant sur la prise de boisson, l'appétence pour le sodium et l'excrétion rénale de sodium chez de nombreux mammifères et en particulier chez le rat (voir pour revues Wright et Harding, 1992 ; Fitzsimons, 1998). Une partie des perturbations cardiovasculaires liées à l'injection intracérébroventriculaire d'Ang II résulterait d'une modification de l'activité de certaines populations de neurones au niveau du NTS, qui est le premier relais central de l'arc baroréflexe. En effet, la micro-injection d'Ang II au niveau de cette structure induit une augmentation de la pression artérielle (effet presseur) (Casto et Phillips, 1984a,b,c ; Casto et Phillips, 1985). Certaines études réalisées *in vitro* sur des tranches de cerveau suggèrent que l'Ang II régulerait la pression artérielle en modifiant les transmissions inhibitrice et excitatrice au niveau du NTS, respectivement mises en jeu dans la régulation du baroréflexe et du chémoréflexe. En effet, l'injection locale d'Ang II au niveau du NTS augmente la transmission inhibitrice au niveau du NTS, et ceci probablement en stimulant les interneurons GABAergiques résidant dans cette structure (Kasparov et Paton, 1999). De plus, l'Ang II augmenterait la transmission excitatrice au niveau du NTS, et ceci probablement par le biais de la stimulation des neurones libérant de la substance P (Kasparov et al., 1998) et des cellules endothéliales libérant de l'oxyde nitrique (Wong et al., 2002).

L'effet que possède l'Ang II sur la fonction cardiovasculaire pourrait également résulter d'une modification de la neurotransmission catécholaminergique au niveau du NTS. Cette hypothèse repose sur différentes observations indépendantes. Les neurones catécholaminergiques présents au niveau du NTS expriment de grandes quantités de récepteurs AT<sub>1</sub> (Yang et al., 1997). L'interaction entre l'Ang II et son récepteur AT<sub>1</sub> entraînerait, sur la base d'observations réalisées *in vitro*, une augmentation de l'expression de la tyrosine hydroxylase (TH) au niveau de cellules noradrénergiques (Yu et al., 1996). Cette enzyme est limitante dans la synthèse des catécholamines, dont la présence au niveau du NTS participe activement à la régulation de la fonction cardiovasculaire (De Jong et Nijkamp, 1976 ; Korner et al., 1987).

---

### I-3.2. Régulation des fonctions cognitives

Les angiotensines cérébrales sont également fortement liées à la régulation de différents processus comportementaux et cognitifs. En effet, les Ang II et IV auraient la capacité de moduler les phénomènes d'adaptation au stress, d'apprentissage et de mémoire (voir pour revue Gard, 2002).

Certaines études récentes suggèrent que les angiotensines modifieraient différents processus comportementaux et cognitifs en agissant directement sur les neurones du LC, qui est la principale structure noradrénergique du SNC. En effet, il a été mis en évidence que les présences d'Ang II et d'ARNm codants pour les récepteurs à l'Ang II augmentent au niveau cérébral et en particulier au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) et du locus coeruleus (LC) chez le rat soumis à un stress par immobilisation ou par jet d'air, suggérant une augmentation de la neurotransmission angiotensinergique locale au niveau de ces deux structures (Watanabe et al., 1998 ; Dumont et al., 1999). Etant donné que l'Ang II est capable de stimuler la libération de noradrénaline par les cellules du LC (Sumners et al., 1983), il est probable que l'augmentation du signal angiotensinergique observée dans ces conditions stressantes augmente la présence de noradrénaline dans cette structure et ses aires de terminaison. En outre, les angiotensines cérébrales pourraient agir de manière indirecte sur les neurones du LC. En effet, l'Ang II stimule la libération de « corticotropin releasing factor » (CRF) par les cellules du PVN (Sumitomo et al., 1991). Le PVN envoie des projections en direction du LC et peut stimuler par l'intermédiaire du CRF l'activité des neurones localisés dans cette structure (voir pour revue Lehnert et al., 1998). Une augmentation de la libération de CRF dans le LC, en réponse à une augmentation de la présence d'Ang II au niveau du PVN, pourrait ainsi contribuer à augmenter la libération de noradrénaline dans les territoires cibles des neurones du LC.

Les angiotensines cérébrales semblent par ailleurs pouvoir réguler les phénomènes d'apprentissage et de mémoire en agissant sur les neurones de l'hippocampe. En effet, l'injection d'Ang II dans différentes structures du SNC, et en particulier dans le gyrus dentelé (Morgan et Routtenberg, 1977 ; Lee et al., 1995) inhibe le phénomène d'apprentissage associatif mis en jeu dans les tests de conditionnement passif à l'évasion, via l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub>. De plus, la micro-iontophorèse d'Ang II au niveau de cette structure inhibe la mise en place du phénomène de potentialisation à long terme, qui est impliqué dans le processus de mémorisation (Denny et al., 1991 ; Wayner et al., 1993, 1995).

### **I-3.3. Le rat TGR(ASrAOGEN)680 : modèle d'étude des pathologies liées au dysfonctionnement du système angiotensinergique cérébral**

Les pathologies liées au dysfonctionnement du système angiotensinergique cérébral ont été peu étudiées et ceci principalement à cause du faible nombre de modèles animaux permettant d'étudier précisément les perturbations à long terme du système angiotensinergique cérébral. Les rats TGR(ASrAOGEN) représentent une souche de rats génétiquement modifiés, caractérisée par une dérégulation du système angiotensinergique spécifique au SNC.

Les rats TGR(ASrAOGEN)680 ont été développés par Ganten et coll. par insertion dans le génome de cellules souches embryonnaires de rat d'un transgène codant pour un ARN anti-sens, dont la séquence est complémentaire des 200 premiers nucléotides situés dans la région 5' terminale de l'ARNm codant pour l'AOGEN. Le promoteur de la protéine « glial fibrillary acidic protein » (GFAP) humaine a été inséré en position 5' de cette construction. Le transgène n'est de ce fait exprimé chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 qu'au niveau des cellules gliales, qui sont les seules à exprimer la GFAP, et qui sont la principale source d'AOGEN au niveau du SNC. Il résulte que le taux d'AOGEN est spécifiquement diminué au niveau cérébral chez ces rats (jusqu'à 90 %), sans que le niveau plasmatique du peptide ne soit modifié (Schinke et al., 1999). Les premières études visant à caractériser l'impact de l'invalidation du système angiotensinergique au niveau cérébral chez cette souche de rat ont par ailleurs mis en évidence une modulation différentielle des différents sous-types de récepteurs aux angiotensines dans différentes aires cérébrales (Monti et al., 2001). En effet, la quantité de récepteurs AT<sub>1</sub> est augmentée chez les rats transgéniques adultes, par rapport à leurs contrôles, dans les structures dites « profondes » du SNC (où la barrière hématoencéphalique est imperméable aux molécules circulantes), alors qu'elle est diminuée au niveau des organes subforniciaux, où la barrière hématoencéphalique est perméable aux molécules circulantes. La quantité de récepteurs AT<sub>2</sub> ne semble pas modifiée. Etant donné que le promoteur de la GFAP est activé dès le développement embryonnaire (Sancho-Tello et al., 1995), cette souche de rat transgénique est idéale pour l'analyse des répercussions de l'invalidation chronique du système angiotensinergique cérébral sur le développement du SNC. Les particularités physiopathologiques les plus marquantes de ces rats, à l'âge adulte, sont qu'ils possèdent une pression artérielle diminuée, sont sujets à un diabète insipide, ont une faible osmolarité urinaire et une polydipsie concomitantes à un faible taux plasmatique de vasopressine (Schinke et al., 1999 ; Baltatu et al., 2001). Aucun test mnésique ni cognitif n'a encore à ce jour été réalisé sur cette souche de rat.

---

## II- LA TYROSINE HYDROXYLASE

La tyrosine hydroxylase (TH) [tyrosine 3 monooxygénase; L-tyrosine, tétrahydroptéridine: oxygène oxydoréductase; EC 1.14.16.2] catalyse l'étape limitante de la synthèse des catécholamines (CA) [Dopamine, Noradrénaline et Adrénaline] (Nagatsu et al., 1964), et constitue ainsi un marqueur des cellules catécholaminergiques. Les groupes cellulaires exprimant la TH sont retrouvés à tous les niveaux du SNC. Les neurones synthétisant de la noradrénaline ou de l'adrénaline sont localisés principalement au niveau du tronc cérébral. Ceux synthétisant la dopamine sont localisés principalement au niveau du mésencéphale, du diencéphale mais aussi dans le bulbe olfactif (Hökfelt et al., 1984). Les neurones catécholaminergiques du SNC peuvent être recrutés lors de réponses à des stimuli physiologiques ou pharmacologiques. Dans ces conditions, la stratégie qu'adoptent ces neurones est généralement de moduler la synthèse de leurs neurotransmetteurs. La TH peut alors faire l'objet de régulations fines aussi bien à long terme qu'à court terme, permettant l'adaptation du taux de renouvellement des CA à la vitesse de leur utilisation. Après avoir succinctement présenté la place que tient la TH dans le métabolisme des catécholamines, les caractéristiques de cette enzyme ainsi que les mécanismes impliqués dans sa régulation seront exposés.

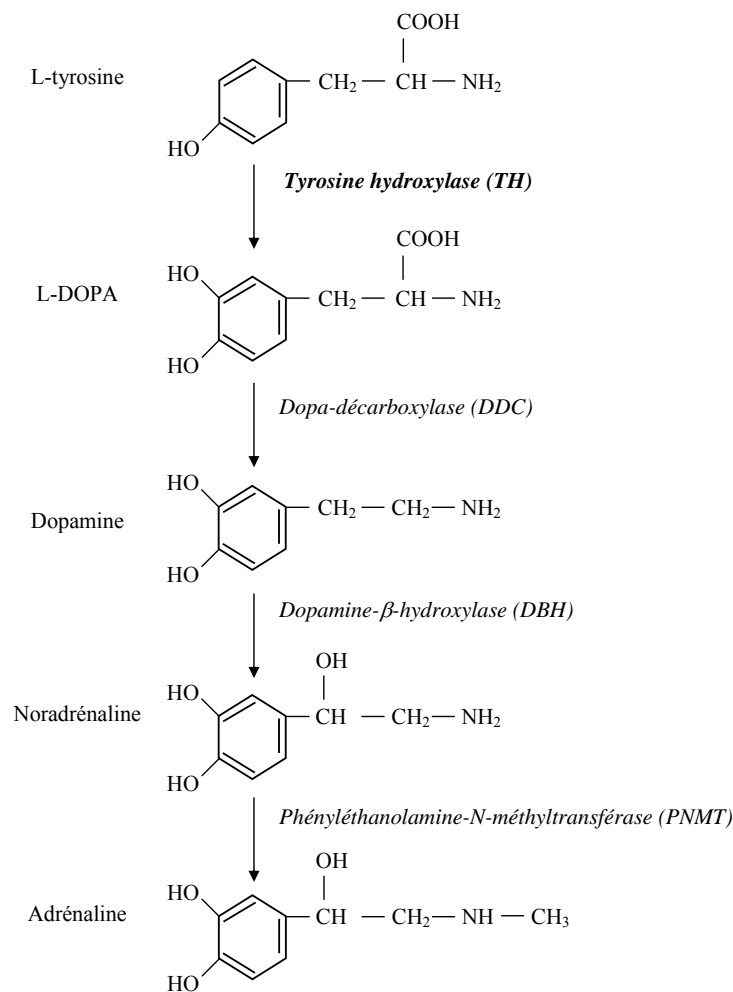
### *II-1. Le métabolisme des catécholamines*

(voir pour revues : Cooper et al., 1989 ; Weiner et Molinoff, 1989 ; Fitzpatrick, 1999 ; Flatmark et al., 2002)

#### **II-1.1. Biosynthèse des catécholamines**

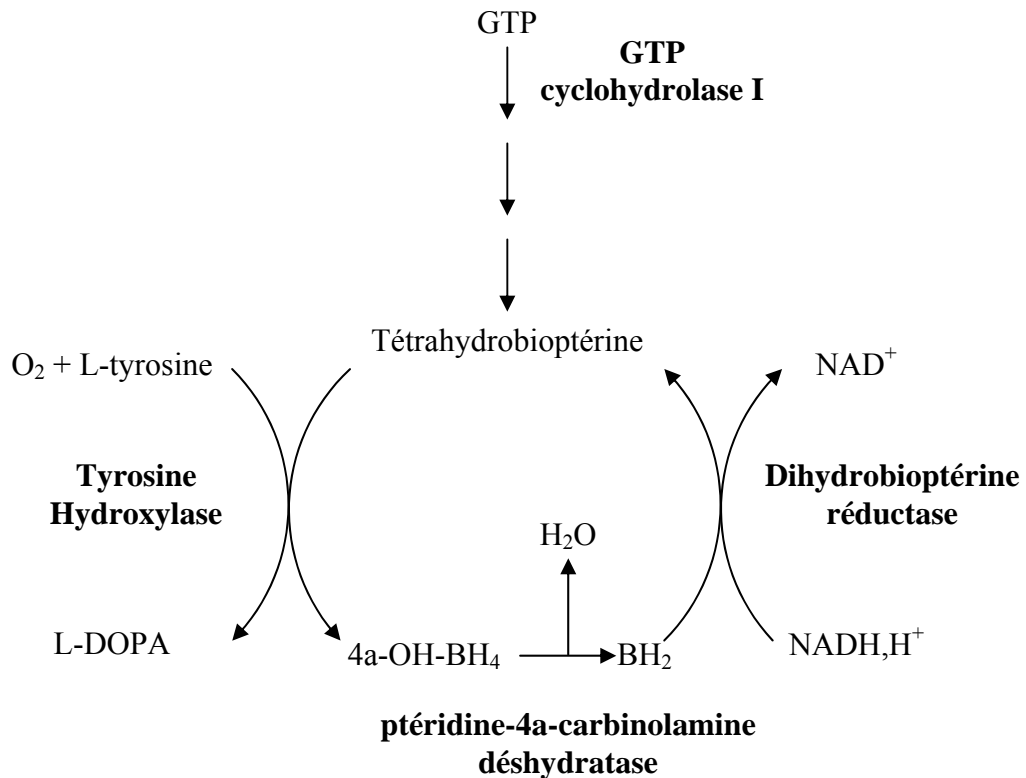
Les CA sont synthétisées à partir de la L-tyrosine ou de son précurseur la L-phénylalanine (Figure I-5). Ces deux acides aminés sont captés dans la circulation sanguine et concentrés dans les neurones par un système de transport actif dépendant de la pompe Na-K-ATPase. La première étape, commune à la synthèse de toutes les CA, est sous la dépendance de la TH qui catalyse la conversion de la L-tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine. Cette réaction nécessite la fixation séquentielle sur la TH de 3 éléments: 1) un cofacteur (la tétrahydrobioptérine sous forme réduite, BH<sub>4</sub>) qui fournit de l'hydrogène, 2) l'oxygène moléculaire, et enfin 3) la L-tyrosine (Figure I-6). La formation du BH<sub>4</sub> est réalisée à partir de guanidine triphosphate et dépend directement de l'activité de la guanidine triphosphate cyclohydrolase I. La régénération du cofacteur est assurée par une seconde réaction enzymatique, catalysée successivement par la ptéridine-4a-carbinolamine déshydratase et la

dihydrobioptérine réductase. La TH incorpore un atome d'oxygène dans la molécule de L-tyrosine et réduit l'autre en eau grâce à l'apport de deux électrons par le BH<sub>4</sub>. La 3,4-dihydroxyphénylalanine est ensuite rapidement décarboxylée par la DOPA décarboxylase (DDC), qui est une enzyme homodimérique cytosolique largement distribuée dans le cerveau et qui permet la décarboxylation de différents acides aminés aromatiques. Le produit formé correspond à la première CA: la dopamine. Dans les neurones noradrénergiques et adrénérgiques, la dopamine est ensuite hydroxylée en noradrénaline, par l'action de la dopamine-β-hydroxylase (DBH), qui est une enzyme homotétramérique associée aux vésicules de stockage. Cette réaction requiert de l'oxygène moléculaire ainsi que de l'ascorbate comme donneur d'électron. Enfin, dans les neurones adrénérgiques, la noradrénaline est N-méthylée en adrénaline par l'action de la phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT), une enzyme cytosolique. Néanmoins, cette enzyme est très peu représentée au niveau du SNC des mammifères et est principalement localisée au niveau des glandes surrénales (Wong et al., 1987 ; Diaz Borges et al., 1978).



**Figure I-5 : Schéma de la chaîne de synthèse des catécholamines**





#### Figure I-6 : Réaction catalysée par la tyrosine hydroxylase

La tyrosine hydroxylase, afin de catalyser l'hydroxylation de la L-tyrosine, nécessite de l'oxygène, qui lui est fourni par la circulation sanguine, et un co-enzyme, la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), synthétisé à partir de guanidine triphosphate (GTP). Au cours de la réaction, la BH<sub>4</sub> est oxydée. Sa régénération implique la présence de NADH,H<sup>+</sup>, notamment.

La biosynthèse des CA serait faible au niveau des péricarya et des axones des neurones. Elle se déroule principalement au niveau des terminaisons présynaptiques, le phénomène étant rendu possible grâce au transport des enzymes de synthèse par le flux antérograde. La présence importante de la TH et de la DBH dans les éléments dendritiques suggère qu'un phénomène de synthèse des CA pourrait également se produire à des taux élevés dans ce compartiment neuronal. La TH serait véhiculée dans le SNC selon un mode de transport encore très mal connu à la vitesse de 13-20 mm/jour (Levin, 1979). La DBH serait transportée dans les prolongements neuronaux sous une forme vésiculaire à la vitesse de 24-48 mm/jour.

#### II-1.2. Stockage et libération des catécholamines

Les CA sont stockées dans des vésicules à grain dense, visibles en microscopie électronique (Phillipu et Matthaei, 1988). Elles sont très peu retrouvées sous forme soluble dans le cytosol. Le remplissage des vésicules de stockage en CA est assuré par un mécanisme actif mettant en jeu les transporteurs vésiculaires des monoamines (Henry et al., 1998). Les

vésicules de stockage contenant les CA sont transportées dans les prolongements neuronaux en direction des terminaisons synaptiques (Holz, 1978).

Bien qu'aucune donnée expérimentale directe n'existe en ce qui concerne le mode de libération des CA, il est admis que lors de la dépolarisation de la membrane plasmique des neurones, les vésicules de stockage des neurotransmetteurs fusionnent avec cette membrane et libèrent ainsi les CA dans le milieu extracellulaire par un phénomène d'exocytose. La libération des CA s'effectue majoritairement au niveau des terminaisons d'axones mais serait également possible au niveau des dendrites, comme cela a été mis en évidence au niveau de la substance noire dopaminergique (Nieoullon et al., 1977 ; Chéramy et al., 1981). Le recyclage des vésicules de sécrétion est assuré par un phénomène d'endocytose (Zimmermann, 1979). De nombreux facteurs régulent la libération des CA (voir pour revue Fillenz, 1993). Parmi ces facteurs, il est très intéressant de noter que les CA présentes dans le milieu extracellulaire exercent un rétro-contrôle négatif sur leur propre libération, par l'intermédiaire d'autorécepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques localisés sur la membrane de l'élément présynaptique.

### II-1.3. Clairance des catécholamines

Le rôle de l'inactivation des catécholamines est de contrôler la durée de la présence des CA dans le milieu extracellulaire, permettant ainsi d'assurer la pertinence du message porté par le neurotransmetteur. Trois mécanismes permettent d'inactiver les CA extracellulaires: 1) la recapture, 2) la dégradation enzymatique, et 3) la diffusion dans l'espace extracellulaire.

**Le phénomène de recapture** est un processus actif qui est assuré par les transporteurs membranaires des CA. Il constituerait la voie majeure d'inactivation des CA extracellulaires. La noradrénaline et l'adrénaline capturées dans le milieu extracellulaire sont soit re-vésicularisées, soit désaminées par la monoamine oxydase A. **La dégradation enzymatique des CA** est en particulier prise en charge par deux enzymes clés: la monoamine oxydase de type A et la catéchol-O-méthyltransférase. La monoamine oxydase de type A est une enzyme mitochondriale essentiellement localisée au niveau des terminaisons nerveuses présynaptiques, mais est également retrouvée au niveau des éléments postsynaptiques, dans les cellules gliales et dans la paroi des capillaires cérébraux. Elle catalyse la désamination oxydative des CA. La catéchol-O-méthyltransférase est une enzyme ubiquitaire qui catalyse le transfert d'un groupement méthyl de la S-adénosylméthionine sur les groupements hydroxyls. **Le phénomène de diffusion** des CA représente un processus important d'élimination du neurotransmetteur de la fente synaptique.

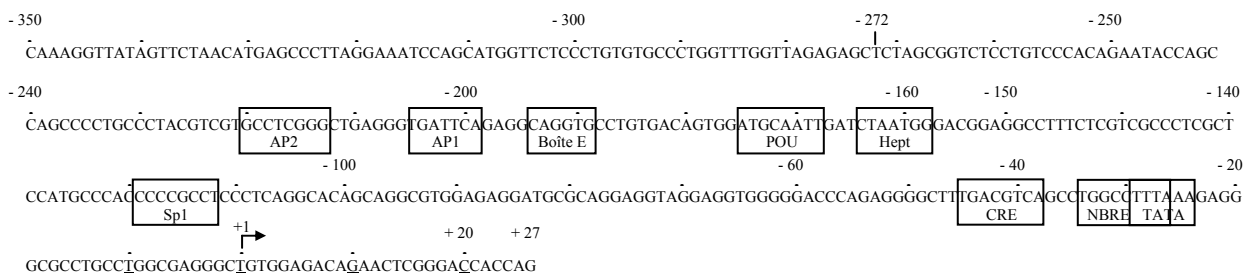
## II-2. Du gène à la protéine tyrosine hydroxylase active

### II-2.1. Le gène de la tyrosine hydroxylase

Chez toutes les espèces à nos jours étudiées, un seul gène semble coder pour la TH. Chez le rat comme chez la souris (Iwata et al., 1992) et le bovin (D'Mello et al., 1989), le gène de la TH est constitué par 13 exons et 12 introns, et mesure approximativement 7,5 kilobases. Le gène humain mesure 8,5 kilobases et possède un intron et un exon supplémentaires (O'Malley et al., 1988). Le gène codant pour la TH est très conservé au cours de l'évolution. En effet, la séquence 5' terminale de ce gène possède une homologie de 94 % entre le rat et la souris et de 74 % entre l'Homme et la souris. Par ailleurs, la région codante du gène possède une homologie de 89 % entre le rat et l'Homme (Iwata et al., 1992).

La région localisée dans la partie 5' terminale du gène codant pour la TH contient différentes séquences consensus de régulation de l'expression de ce gène (Figure I-7). Ces séquences seraient mises en jeu dans la spécificité tissulaire et cellulaire de l'expression de la TH. La disposition de ces séquences régulatrices ainsi que l'espace relatif entre ces dernières sont très conservés entre l'Homme, la souris et le rat, et notamment pour les séquences AP1, « cAMP responsive element » (CRE) et SP1 (Le Bourdellès et al., 1988 ; Iwata et al., 1992 ; Sasaoka et al., 1992 ; Kim et al., 1993 ; Yang et al., 1998).

Les séquences nucléotidiques exactes mises en jeu dans l'expression tissu/cellule spécifiques du gène codant pour la TH sont encore inconnues. Il semble toutefois que la séquence comprise entre -229 et -160 paires de bases, située dans la région promotrice du gène de la TH, soit impliquée dans l'expression tissu-spécifique de ce gène (Fung et al., 1992). Cette séquence contient en particulier les séquences régulatrices AP2, AP1, la boîte E, POU et Hept. De plus, la région comprenant les 4,5 kilobases situées en position 5' terminale du gène de la TH contient particulièrement un élément NRSE (neuronal restrictive silencer element) qui participerait à l'expression neuronale du gène codant pour la TH.



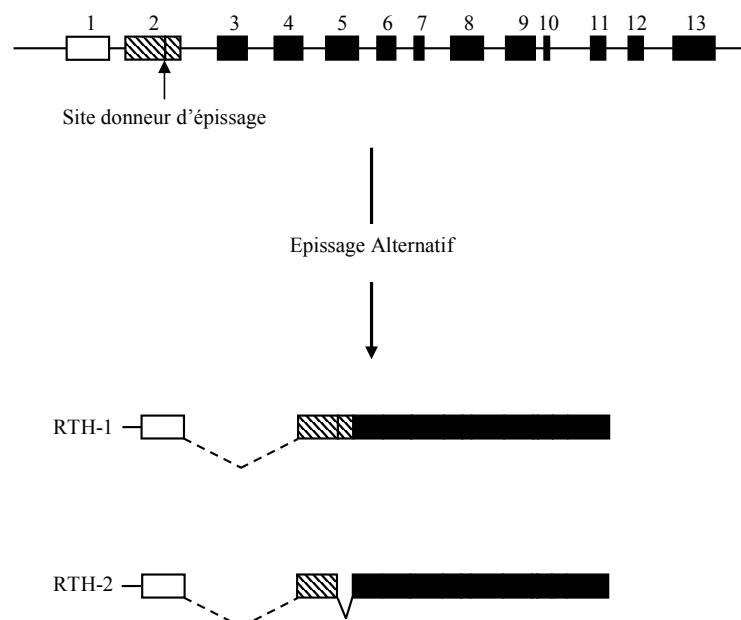
**Figure I-7 : Localisation des séquences consensus situées dans la région promotrice du gène codant pour la TH chez le rat entre les nucléotides -350 et +1.**

D'après Fung et al., 1992 et Iwawaki et al., 2000

Certaines études réalisées sur différents types cellulaires (en particulier différentes lignées de cellules phaeochromocytaires PC8b) ont pu mettre en évidence que les 212 paires de bases situées en amont du site d'initiation de la transcription du gène codant pour la TH sont suffisantes pour assurer son expression (Cambi et al., 1989). Cette région du promoteur du gène codant pour la TH contient les séquences régulatrices AP1, la boîte E, POU, Hept, SP1, CRE et la boîte TATA. Les études réalisées par Kim et collaborateurs ont très clairement impliqué la séquence CRE non seulement dans la stimulation de la transcription du gène codant pour la TH, mais aussi dans l'expression basale du gène (Kim et al., 1993, Lazaroff et al., 1995).

## II-2.2. L'ARN messager codant pour la tyrosine hydroxylase

L'ADN complémentaire de la TH a été isolé chez le rat, la souris, l'Homme, le bœuf, la caille et la drosophile. Chez ces espèces, mis à part les primates chez lesquels au moins 4 isoformes de l'ARN messager codant pour la TH (ARNm-TH) ont pu être observées, il a été longtemps considéré que l'ARNm-TH n'existait que sous une seule forme, constituée par 1494 nucléotides (Grima et al., 1985). Néanmoins, 2 isoformes de cet ARNm ont été mises en évidence chez le rat (Lanièce et al., 1996) (Figure I-8). Toutefois, malgré la présence de ces deux isoformes, une seule protéine serait traduite (Haycock, 2002).



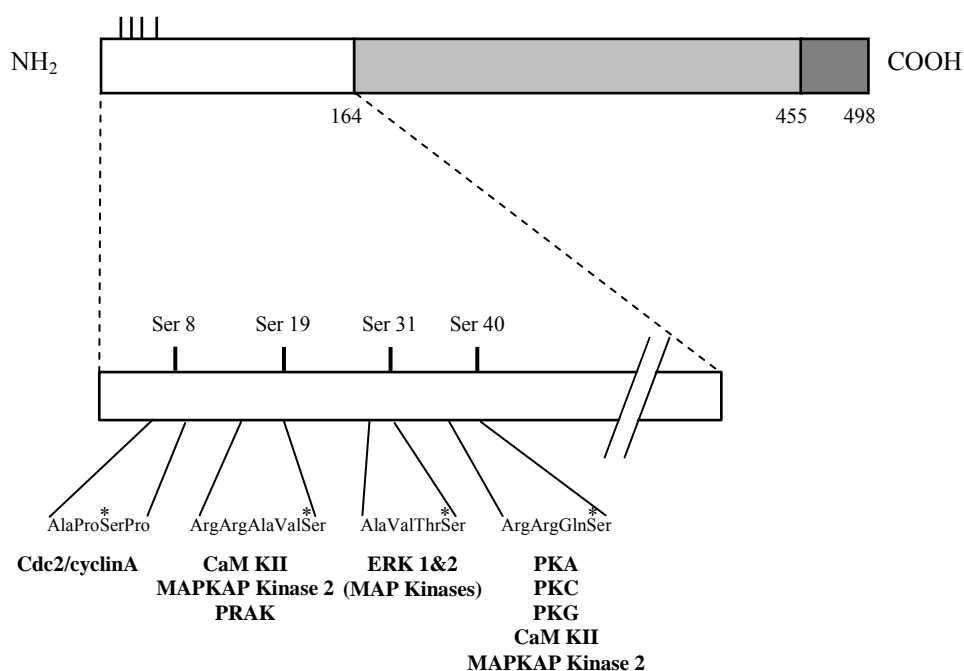
**Figure I-8 : Schéma représentatif de la structure génomique de la TH de rat et du mécanisme d'épissage alternatif à l'origine des 2 isoformes de l'ARN messager de la TH**

D'après Lanièce et al., 1996

Le site donneur d'épissage alternatif est présent au sein de l'exon 2 et est notifié par une flèche. Les 2 isoformes observées après phénomène d'épissage correspondent à la forme entière de l'ARN messager TH et à une forme plus courte, chez laquelle les 99 nucléotides situés dans la région 3' de l'exon 2 ont été excisés.

### II-2.3. La protéine tyrosine hydroxylase

La TH fait partie de la famille des hydroxylases des acides aminés aromatiques au même titre que la tryptophane hydroxylase. Le domaine catalytique des protéines constituant cette famille est très conservé. Dans toutes les espèces étudiées (Homme, rat, souris, bœuf), la TH est classiquement décrite comme étant une protéine homotétramérique d'environ 240 000 Da (Nagatsu, 1993). Chez le rat, chaque monomère est constitué par 498 acides aminés (Grima et al., 1985) et possède une masse molaire prédictive de 55 903 Da (Figure I-9). La masse molaire chaque monomère est de 60- 61 000 Da. Toutefois, au niveau du SNC de rat, différentes formes de TH, d'antigénécité similaire, ont pu être mises en évidence en regard de leur masse moléculaire. En effet, au niveau du locus coeruleus, de la substance noire et de l'hypothalamus, une forme de TH ayant une masse molaire de 200 000 Da a pu être observée. Des formes de TH, ayant des poids moléculaires de 65 000 et 130 000 Da, ont également été observées *in vitro* dans des cellules en culture issues d'autres structures cérébrales.

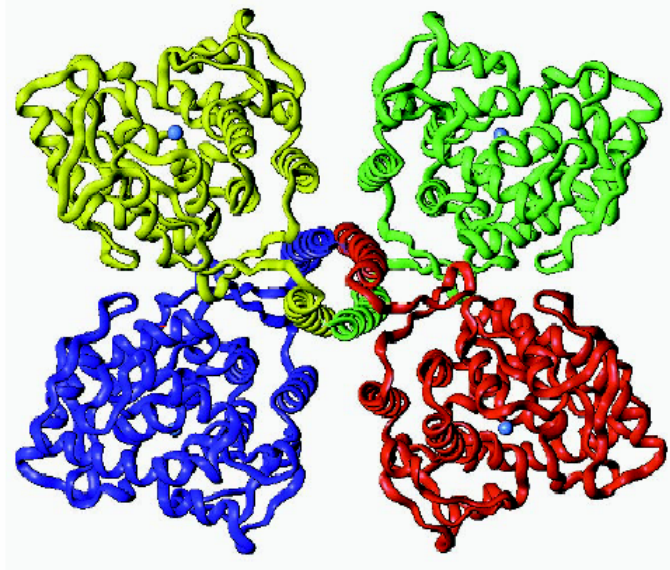


**Figure I-9 : Schémas de la structure de la protéine TH chez le rat et des différents sites de phosphorylation de la partie régulatrice de la TH.**

D'après Kumer et Vrana, 1996

Le domaine régulateur de la TH (en blanc) est constitué par les 163 premiers acides aminés composant la protéine. Au sein de ce domaine résident 4 résidus sérines constituant des sites de phosphorylation par différentes protéines kinases, les résidus sérine 8, 19, 31 et 40 (barres). La partie catalytique de la TH (gris clair) est constituée par les acides aminés 164 à 498. Les 42 derniers acides aminés de la protéine (gris foncé) sont indispensables à la tétramérisation des sous-unités de TH. Les 4 résidus sérines mis en jeu dans l'activation de la protéine TH sont représentés, ainsi que les différentes protéines kinases associées.

Chaque monomère de TH est constitué par une partie amino-terminale régulatrice et une partie carboxy-terminale catalytique (Figure I-9). La région catalytique de la protéine TH chez le rat débute à la phénylalanine 164 (voir pour revue Fitzpatrick, 1999). Les acides aminés localisés au niveau de la partie carboxy-terminale contiennent de nombreux résidus hydrophobiques et formeraient une hélice  $\alpha$ . Les 20 à 43 derniers acides aminés de la protéine, incluant l'hélice  $\alpha$ , seraient à la base de la tétramérisation des monomères de TH. Ces observations ont été corroborées après l'élucidation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme (Figure I-10).



**Figure I-10 : Diagramme en ruban du domaine catalytique du tétramère de TH.**

D'après Fitzpatrick, 1999

Les molécules de  $\text{Fe}^{2+}$  sont représentées sur chaque monomère par des sphères bleues.

Le fer est lié à la TH de manière covalente à trois résidus contenus dans la sous-unité catalytique: les His<sup>331</sup> et <sup>336</sup> et le Glu<sup>376</sup>. La région régulatrice de chaque monomère peut lier son substrat (la L-tyrosine), l'oxygène et le cofacteur (la  $\text{BH}_4$ ). Elle contient également 4 résidus sérine (Ser<sup>8, 19, 31, 40</sup>) phosphorylables, qui semblent jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de la protéine (Zigmond et al., 1989 ; Kumer et Vrana, 1996).

Au sein des neurones catécholaminergiques centraux, la TH est principalement retrouvée sous forme cytosolique. Néanmoins, dans les cellules du striatum et des glandes surrénales, la TH est également associée aux membranes, grâce à la présence de 4 domaines hydrophobes présents au sein de la protéine (Grima et al., 1995 ; Masserano et al., 1989). Au niveau des neurones du locus coeruleus, la TH est principalement observée sous sa forme cytosolique dans le soma, et sous une forme associée aux neurotubules dans les prolongements (Pickel et al., 1975).

### ***II-3. Régulations de la tyrosine hydroxylase***

(voir pour revues : Masserano et al., 1989 ; Zigmond et al., 1989 ; Fillenz , 1993 ; Kumer et Vrana, 1996)

#### **II-3.1. Régulations phasiques**

Ce type de régulations de l'enzyme TH vise à modifier son activité spécifique. Celle-ci est régulée à court terme (de l'ordre de la seconde ou de la minute) par des phénomènes 1), de régulation par les substrats, 2), d'inhibition par les produits finaux de la synthèse des catécholamines, 3), par une modification de la configuration allostérique de l'enzyme et 4), par sa phosphorylation. Le but de la régulation phasique de la TH est de pouvoir répondre le plus rapidement possible à une demande accrue en CA (Tableau I-3).

##### **I-3.1.1. Régulation par les substrats et inhibition par les produits finaux**

Pour que la TH puisse catalyser la réaction d'hydroxylation, il lui faut être en présence de L-tyrosine, d'oxygène et de son cofacteur: la BH<sub>4</sub>. L'activité de l'enzyme dépend donc de la biodisponibilité de chacun de ces substrats ainsi que de l'affinité de la TH pour ces derniers. Contrairement à la L-tyrosine et à l'oxygène, la BH<sub>4</sub> est en quantité sub-saturante *in vivo* par rapport à la TH. La biodisponibilité de la BH<sub>4</sub> est totalement dépendante de l'activité de la guanidine triphosphate cyclohydrolase I (Figure I-6), qui est régulée aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-transcriptionnel. La quantité de BH<sub>4</sub> ainsi que le niveau d'expression de la guanidine triphosphate cyclohydrolase I seraient ainsi des éléments régulateurs forts de l'activité de la TH.

La TH est susceptible par ailleurs d'être inhibée *in vitro* par toutes les CA. Néanmoins, il semble que seules la dopamine et la noradrénaline puissent exercer ce contrôle *in vivo* (Okuno et Fujisawa, 1991). La dopamine formerait au sein de la TH un complexe avec le fer sous sa forme Fe<sup>3+</sup>, stabilisant l'enzyme sous une forme inactive (la TH est active en présence de Fe<sup>2+</sup>), et réduisant ainsi fortement son activité.

##### **II-3.1.2. Régulation par changement de conformation allostérique**

La TH fait l'objet d'une modification de sa conformation allostérique, et ceci via des mécanismes qui ne semblent pas impliquer les protagonistes de la chaîne de biosynthèse des CA (voir pour revue Kumer et Vrana, 1996). L'héparine, les phospholipides ainsi que les polyanions peuvent interagir avec la TH d'une manière réversible, augmentant son activité spécifique. L'hypothèse qui a été émise est que les polyanions se fixent sur la partie amino-terminale de la TH, par des liaisons électrostatiques, et produisent ainsi une modification de sa conformation spatiale.

Type de régulation	Niveau de régulation		Protagonistes/ Mécanismes/
<b>Court Terme</b>	Inhibition par rétrocontrôle	Protéique	Produits finaux (fixation compétitive réversible sur le site du cofacteur)
	Régulation allostérique		Polyanions (Fixation sur la partie Nterm)
	Phosphorylation (des résidus sérine)		PKA PKC PKG PRAK MAP kinases MAPKAP kinase Cdc2/cycline A
<b>Long Terme</b>	Transcriptionnel	ADN	Modification du taux de transcription
	Stabilité	ARN	Modification de la demi-vie

**Tableau I-3 : Récapitulatif des différents points de régulation à court et à long termes de l'activité TH.**



### II-3-1.3. Régulation par la phosphorylation de l'enzyme

#### II-3.1.3.1. Protéines kinases impliquées et sites de phosphorylation

(voir pour revue Kumer et Vrana, 1996 ; Toska et al., 2002)

Il est généralement reconnu que la TH est le substrat de phosphorylations et de déphosphorylations directes par différentes protéines kinases et phosphatases, et que le taux de phosphorylation de l'enzyme est en relation directe avec son activité spécifique (plus elle est phosphorylée, plus elle est active). *In vitro*, la TH est phosphorylée par différentes protéines kinases. La protéine kinase activée par l'AMP cyclique (PKA), la protéine kinase activée par le  $\text{Ca}^{2+}$  et la calmoduline (CaM KII), la protéine kinase activée par le  $\text{Ca}^{2+}$  et la phospholipase C (PKC), la protéine kinase activée par la guanosine monophosphate cyclique (PKG), la protéine kinase activée durant le cycle cellulaire (cdc2/cycline A), les « mitogen activated » protéines kinases (MAP kinases), les protéines kinases activées par les MAP kinases (MAPKAP kinase), la protéine kinase activée/régulée par p38 (PRAK) ainsi que la protéine kinase activée par le stress (MSK1) ont la capacité de phosphoryler la TH, régulant ainsi son activité. Les résidus sérines représentant des cibles potentielles de phosphorylation sont localisés aussi bien dans sa partie régulatrice que dans sa partie catalytique de la TH. Néanmoins, seules les sérines en position 8, 19, 31 et 40 (Ser<sup>8, 19, 31, 40</sup>), toutes localisées dans la sous-unité régulatrice de chaque monomère de TH, sont phosphorylées *in vivo* (Figure I-9).

Très peu d'études se sont intéressées au phénomène de déphosphorylation de la TH. Toutefois, certains travaux ont mis en évidence que la phospho-TH (provenant d'extraits de striatum) est un très bon substrat pour la phosphoprotéine phosphatase de type 2A (PP2A).

Certaines études ont pu démontrer que la phosphorylation AMP cyclique-dépendante de la TH augmente non seulement l'activité de l'enzyme, mais réduit également sa stabilité. et de ce fait sa demi-vie. Le processus de phosphorylation de la TH pourrait ainsi participer au contrôle du taux de renouvellement de la protéine. Le processus par lequel la phosphorylation de la TH augmente son activité passerait en fait par une levée de la rétro-inhibition qu'exercent les CA sur l'enzyme (voir pour revue Fitzpatrick, 1999).

#### II-3.1.3.2. Mécanismes mis en jeu dans l'activation neuronale

Les modifications de l'activité enzymatique de la TH ont été abondamment étudiées *in vivo* dans la striatum, qui est une structure riche en terminaisons dopaminergiques issus des corps cellulaires localisés dans la substance noire. La stimulation du faisceau télencéphalique médian provoque une augmentation de l'activité TH au niveau du striatum, associée à l'augmentation de phosphorylation des résidus sérine (Ser) 19, 31, 40, et suivie d'une augmentation de la synthèse de dopamine (Murrin et al., 1976 ; Murrin et Roth, 1976 ;

Haycock et Haycock, 1991). Certaines études ont montré que l'activation de la TH striatale en réponse à une dépolarisation est contrôlée par des mécanismes de phosphorylation dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  (El Mestikawy et al., 1983, 1985). Par ailleurs, les protéines kinases ERK1 et ERK2 seraient mises en jeu dans ce phénomène par phosphorylation des résidu Ser<sup>31</sup> et Ser<sup>40</sup> de la TH (Lindgren et al., 2002).

### **II-3.1.3.3. Premiers messagers et mécanismes de transduction du signal**

(voir pour revue Haycock, 1993 ; Bobrovkaya et al., 2001 ; Takekoshi et al., 2002 ; Shibuya et al., 2002 ; Cammarota et al., 2003)

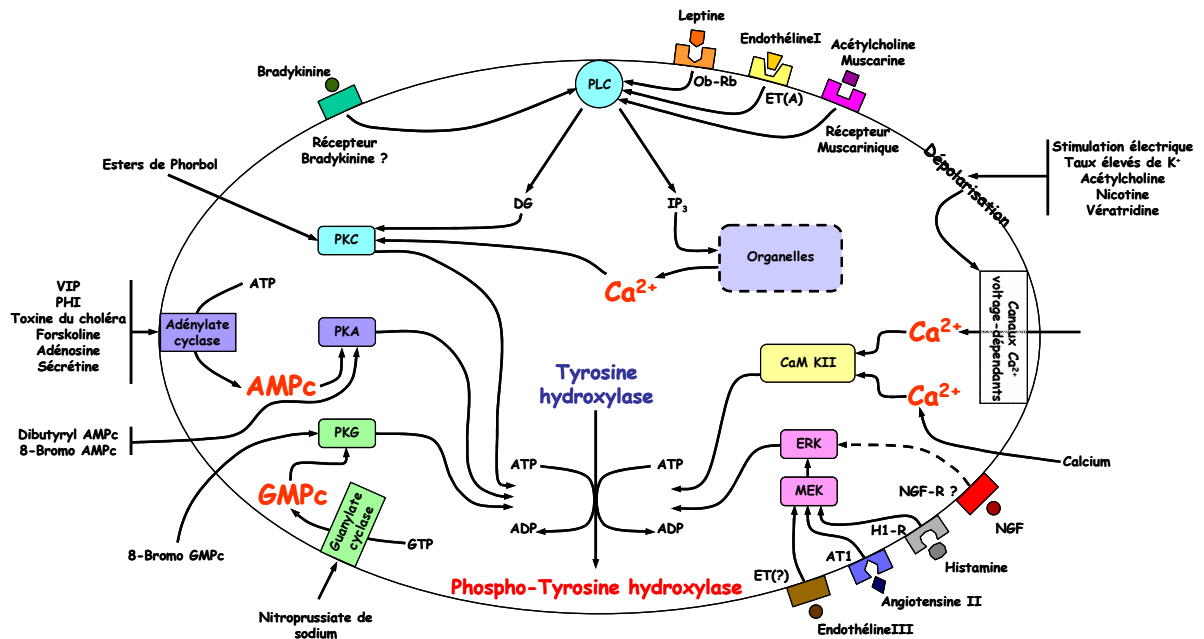
Un assez grand nombre de facteurs pouvant intervenir dans l'activation à court terme de la TH ont pu être mis en évidence grâce aux études réalisées chez le rat et le bovin, sur des cellules PC12 ou sur le ganglion cervical supérieur. Ces facteurs ont largement été répertoriés dans de nombreuses revues datant du début des années 1990. Néanmoins, il semble qu'encore de nos jours, de nouveaux facteurs induisant une augmentation de l'activité de la TH soient décrits. C'est par exemple le cas de la leptine, dont le traitement au niveau de cellules de surrénales bovines en culture induit une phosphorylation et une activation de la TH (Utsunomiya et al., 2001 ; Shibuya et al., 2002).

La Figure I-11 expose les messagers intracellulaires activés ou mis en jeu en réponse à différents facteurs activant la TH, et qui ont été décrits à partir d'études réalisées au niveau de cultures de cellules ou du ganglion cervical supérieur. Sans rentrer dans les détails, ce schéma met en relief le fait que les différents premiers messagers impliqués dans la modulation de l'activité spécifique de la TH agissent notamment sur les pools intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ , d'AMP cyclique et de GMP cyclique, qui sont de forts activateurs des protéines kinases intracellulaires.

## **II-3.2. Régulations toniques**

### **II-3.2.1. Régulation de l'activité spécifique de la tyrosine hydroxylase**

Ce mécanisme, mieux connu sous le nom d' « activation retardée » de la protéine TH, a été découvert au niveau du LC après administration systémique d'un agoniste muscarinique, l'oxotrémorine. Ce traitement induit, après une période de latence assez importante (environ 24 heures), une augmentation de l'activité de la TH culminant à 3 jours et persistant durant 2 semaines (Lewander et al., 1977). Ce phénomène n'est pas accompagné par une augmentation de la quantité de protéine TH et pourrait de ce fait affecter une forme de TH différente de celle qui est active dans les conditions basales. Par ailleurs, la compartimentation de cette TH activée pourrait différer de celle rencontrée dans les conditions normales.



**Figure I-11 : Facteurs modifiant l'état de phosphorylation et l'activation de la TH.**

D'après Masserano et al., 1989 ; Haycock , 1993 ; Bobrovkaya et al., 2001 ; Takekoshi et al., 2002 ; Shibuya et al., 2002 ; Cammarota et al., 2003.

ADP : Adénosine diphosphate ; AMPc : Adénosine monophosphate cyclique ; AT1 : Récepteur de type 1 aux angiotensines ; ATP : Adénosine triphosphate ; CaM KII : Calmoduline kinase II ; DG : diacyl glycérol ; ERK : Protéine kinase activée par les signaux extracellulaires ; ET(A) : Récepteur de type A à l'endothéline ; H1-R : Récepteur de type 1 à l'histamine ; IP3 : inositol 3-phosphate ; MEK : Protéine kinase des protéines kinases activées par les mitogènes ; NGF : « Nerve Growth Factor » ; NGF-R : Récepteur au NGF ; Ob-Rb : Forme longue du récepteur à la leptine ; PHI : polypeptide histidine-isoleucine ; PIP2 : phosphatidylinositol 4'5-diphosphate ; PKA : Protéine kinase A ; PKC : Protéine kinase C ; PKG : Protéine kinase G ; PLC : Phospholipase C ; VIP : peptide vasointestinal.

L'effet de l'oxotrémorine a également été observé au niveau des structures catécholaminergiques bulbaires (Renaud et al., 1979), et *in vitro* sur des cellules de locus coeruleus en culture (Devau et al., 1987). Il semble que cette régulation à long terme de l'activité de la TH soit également observée au niveau des neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale après traitement chronique à la nicotine (Smith et al., 1991).

La proportion de TH sous sa forme active serait en fait très faible par rapport à la quantité totale de protéine observée dans les neurones catécholaminergiques. En effet, certaines études réalisées chez le rat adulte au niveau du LC ont mis en évidence que 22 % seulement de la quantité totale de protéine TH observée dans les prolongements de ces neurones correspondent à de la TH sous sa forme active (Bezin et al., 2000b). De plus, l'étendue du territoire occupé par la TH active ne représente que 11,7 % du territoire délimité par le marquage TH-immunopositif dans les prolongements des neurones du LC. Ces observations suggèrent que les mécanismes mis en jeu dans la modulation de l'activité de la TH sont étroitement régulés et seraient compartimentés au niveau des neurones catécholaminergiques.

### **II-3.2.2. Régulation de l'expression génique de la tyrosine hydroxylase**

La stimulation des récepteurs présents à la surface des neurones catécholaminergiques peut entraîner des modifications toniques de l'activité de la TH par activation génique de l'expression de la protéine. L'augmentation de l'activité de la TH résulte dans ce cas d'une augmentation de la quantité de TH synthétisée. Néanmoins, les phénomènes de transcription, de traduction et d'activation enzymatique peuvent être régulés de manière dissociée (Leviel et al., 1991). Toutefois, il est important de prendre en considération que si l'ARNm-TH n'est classiquement observé qu'au niveau du corps cellulaire des neurones catécholaminergiques, la protéine TH est présente dans tous les compartiments cellulaires (péricarya, dendrites et axones). De ce fait, toute discordance apparente entre les variations du taux d'ARNm-TH et du taux de protéine TH doit être considérée avec prudence.

#### **II-3.2.2.1. L'induction de la TH dans le SNC**

A l'origine, l'induction trans-synaptique de la TH a été démontrée au niveau du système nerveux périphérique (Mueller et al., 1969). Ce phénomène met en jeu une induction à long terme de l'activité de la TH, consécutive à une augmentation des taux de transcription et de traduction de la protéine. L'existence d'un tel phénomène au niveau du SNC a été révélée au niveau du locus coeruleus par la réserpine (qui déplete les stocks vésiculaires de

CA) (Hartman et al., 1992 ; Debure et al., 1994). Les expériences réalisées à l'aide de la réserpine ont par ailleurs mis en évidence une augmentation retardée de l'activité TH au niveau des aires de terminaison des neurones du LC, par rapport à l'augmentation observée au niveau des corps cellulaires coeruleus. Ce délai serait dû au temps qu'il est nécessaire pour que la protéine néosynthétisée soit transportée dans les prolongements neuronaux, jusqu'aux aires de terminaison.

L'expression du gène de la TH dans le LC serait modulée par des facteurs neuronaux extrinsèques. La preuve d'un tel processus a été apportée entre autre par des expériences de réduction ou d'inhibition de l'influence sérotoninergique exercée sur le LC, par lésion du noyau du raphé dorsal (Lewis et al., 1976) ou par inhibition de la tryptophane hydroxylase (l'enzyme limitante de la biosynthèse de la sérotonine) (Crespi et al., 1980 ; McRae-Degueurce et al., 1982 ; Debure et al., 1994), pour lesquelles une induction de la TH au niveau du LC a pu être observée.

La TH peut être régulée à long terme non seulement dans le LC, mais également dans le système dopaminergique central. Une injection locale de forskoline (inducteur de l'adénylate cyclase) dans la substance noire induit une augmentation de l'expression de l'ARNm-TH (Leviel et al., 1991). La cocaïne induit également la transcription du gène codant pour la TH dans la substance noire et l'aire tegmentale ventrale (Vrana et al., 1993).

#### **II-3.2.2.2. Expression de la TH au cours du développement postnatal**

Très peu d'études révèlent les modifications de l'expression du gène codant pour la TH au niveau du SNC au cours du développement. L'ARNm-TH est détecté dans le cerveau entier à partir du jour embryonnaire 13 et est détecté *in situ* dans les tissus disséqués (tronc cérébral et hippocampe) à partir du jour embryonnaire 16. L'activité de la TH peut être détectée au niveau du tronc cérébral et de l'hippocampe respectivement aux jours embryonnaires 13 et 15 (Coulon et al., 1990). Elle augmente ensuite progressivement jusqu'à la naissance. Un pic transitoire d'activité TH est observé 3 jours après la naissance, au niveau des groupes catécholaminergiques A1C1, A2C2, A5, A6 (locus coeruleus) et A7 (Roux et al., 2003). Un second pic transitoire est observé 14 jours après la naissance au niveau de A6 et 21 jours après la naissance dans les autres groupes noradrénergiques.

Au niveau du LC (A6), qui est la principale structure noradrénergique du SNC, un pic transitoire de la quantité et de la concentration en protéine TH a été observé au cours du développement postnatal chez le rat, sans que le taux d'ARNm-TH, mesuré par une technique d'hybridation *in situ* radioactive, ne varie (Bezin et al., 1994a,b). Etant donné le sujet de recherche développé dans ce travail de thèse, la mise en place précise du phénotype TH au

niveau de cette structure sera présentée de manière beaucoup plus complète dans le chapitre III-2.

### **II-3.2.2.3. Mécanismes moléculaires de l'induction génique**

Dans les cellules eucaryotes, différentes stratégies sont développées afin de permettre la régulation de l'expression des gènes en réponse à des stimuli extérieurs à la cellule. Les signaux pouvant traverser la membrane plasmique, tels que les molécules stéroïdes, rétinoides ou les hormones thyroïdiennes, se lient généralement soit à des récepteurs cytoplasmiques qui vont migrer par la suite dans le noyau cellulaire, soit directement à des récepteurs nucléaires spécifiques. Ce processus permet d'influencer directement la transcription génique par fixation du complexe ligand-récepteur sur les séquences géniques régulatrices. Les substances ne pouvant traverser la membrane plasmique se lient à des récepteurs spécifiques présent sur la surface externe de la membrane plasmique. L'activation de ces récepteurs engendre généralement une modification des taux de seconds messagers. La variation des taux de seconds messagers permet de réguler la transcription via deux types de mécanismes : soit elle influence certains facteurs de transcription déjà présents dans la cellule, soit elle active la synthèse de ces facteurs de transcription, qui vont par la suite activer l'expression d'autres gènes (voir pour revue Morgan et Curran, 1995).

Deux séquences nucléotidiques présentes dans la région promotrice du gène codant pour la TH ont particulièrement été impliquées dans la régulation de l'expression de ce gène. La première est l'élément CRE, situé 45 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription du gène de la TH (chez le rat et l'Homme). La deuxième, située 207 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription du gène de la TH chez le rat, est l'élément AP1.

L'activation de l'élément CRE résulte d'une augmentation initiale des taux d'AMP cyclique intracellulaires. L'AMP cyclique stimule l'activité de la protéine kinase A qui phosphoryle certaines protéines, et en particulier la « CRE binding protein », la « CRE modulatory protein » et le facteur ATF-1 qui sont des facteurs pouvant se lier à la séquence CRE. Il apparaît que la « CRE binding protein » est tout particulièrement mise en jeu dans la régulation AMP cyclique dépendante de l'expression de la TH (Huang et al., 1991 ; Kim et al., 1993). La phosphorylation de la « CRE binding protein » par la protéine kinase A permet sa fixation à CRE, et la stimulation de la transcription génique par l'ARN polymérase II (Montminy et al., 1990). Parmi les éléments intracellulaires stimulant l'expression du gène codant pour la TH par l'intermédiaire de l'AMPC, les protéines Phox 2 (a et b), de la famille des facteurs de transcription à homéodomaine, sont incontestablement à classer dans les plus

importants au niveau des cellules noradrénergiques. Ces facteurs sont exprimés par l'ensemble des neurones noradrénergiques centraux et périphériques (Tiveron et al., 1996 ; Pattyn et al., 1997). Leur expression est indispensable à la maturation du phénotype noradrénergique, de part le contrôle qu'ils exercent sur l'expression de la TH et de la DBH au cours du développement (voir pour revue Goridis et Brunet, 1999). Par ailleurs, leur invalidation génique induit une très forte altération de la formation des structures catécholaminergiques centrales et en particulier du LC (Morin et al., 1997 ; Pattyn et al., 2000).

L'activation de l'élément AP1 résulte à l'origine d'une augmentation des taux de  $Ca^{2+}$  et de diacyl glycérol intracellulaires, qui stimulent l'activité de la protéine kinase C. Les effecteurs finaux de l'activation d'AP1 sont les protéines de la famille des proto-oncogènes tels que c-Fos et c-Jun, qui ont la capacité de se lier à l'élément AP1. Il semble que l'induction de l'expression de la TH via AP1 puisse résulter de deux phénomènes.

Certains autres éléments situés dans la région promotrice du gène codant pour la TH semblent pouvoir jouer un rôle clé dans la régulation de l'expression de ce gène au cours du développement (Schimmel et al., 1999 ; Iwawaki et al., 2000). En effet, l'élément « NGFI-B response element », chevauchant la boîte TATA, est susceptible de fixer Nurr1, qui est une protéine de la famille NGFI-B/Nur77 des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, mise en jeu au cours du développement des neurones dopaminergiques mésencéphaliques (Zetterström et al., 1997 ; Saucedo-Cardenas et al., 1998 ; Castillo et al., 1998). Au niveau de la région 5' terminale du gène codant pour la TH, il existerait par ailleurs des séquences nucléotidiques formant des éléments pouvant fixer les facteurs Gli et Ptx, eux aussi mis en jeu dans l'expression de la TH au cours du développement.

### **II-3.2.3. Régulation de la stabilité de l'ARN messager de la tyrosine hydroxylase**

Il semble que les conditions stimulant la transcription du gène codant pour la TH augmentent la stabilité de l'ARNm-TH. Ce phénomène serait rendu possible grâce à l'interaction entre une séquence de 28 nucléotides présents dans la région 3' non-codante de l'ARN messager de la TH riche en pyrimidine, et une protéine encore non identifiée de 66 000 Da. Cette protéine protégerait l'ARNm-TH contre une dégradation par les nucléases cellulaires.

### III- LE LOCUS COERULEUS ET LE NOYAU DU FAISCEAU SOLITAIRE

#### *III-1. Les corps cellulaires noradrénergiques et adrénérgiques centraux*

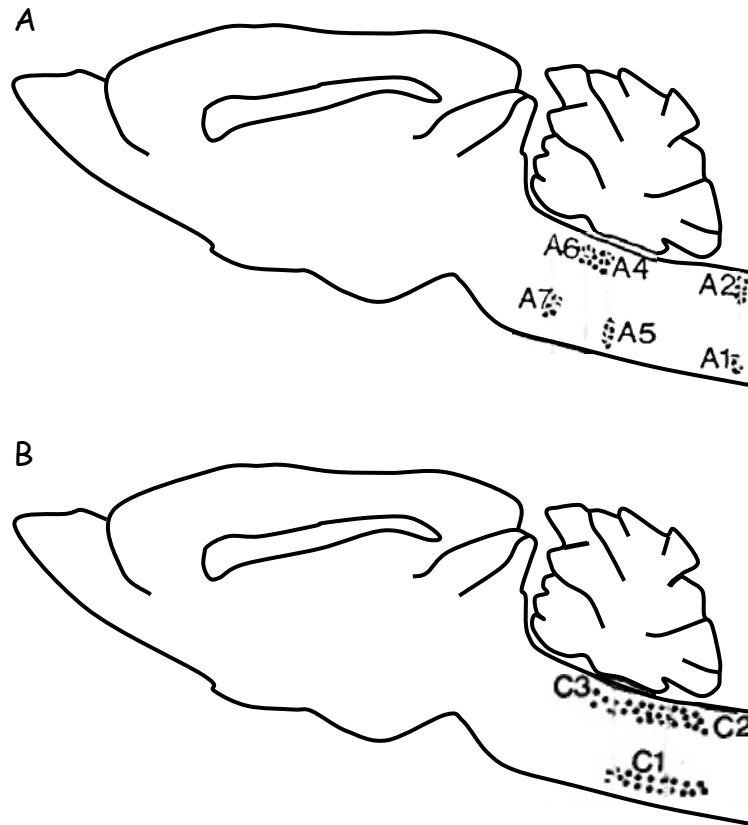
Les corps cellulaires des neurones constituant les structures noradrénergiques centrales sont principalement localisés au niveau du bulbe rachidien et du pont. Les corps cellulaires des neurones constituant les structures adrénérgiques centrales sont, eux, principalement localisés au niveau du bulbe rachidien. L'influence de ces neurones sur d'innombrables structures cérébrales provient du fait qu'ils possèdent des prolongements dendritiques et axonaux extrêmement développés pouvant s'étendre à des distances considérables et capables de libérer leurs neurotransmetteurs. La multiplicité des zones d'influence (télencéphale, diencephale, mésencéphale, tronc cérébral, cervelet et moelle épinière) des neurones noradrénergiques et adrénérgiques centraux les placent logiquement au centre de la régulation de nombreuses fonctions physiologiques.

Les neurones noradrénergiques centraux sont répartis en 7 groupes classifiés de A1 à A7 (Dahlström et Fuxe, 1964) (Figure I-12,A). L'existence du groupe A3 est cependant très controversée. Les groupes A1 et A2 forment des structures bulbaires alors que les groupes A4 à A7 forment des structures pontiques. Dans cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux de ces groupes : le groupe noradrénergique A6 et le groupe noradrénergique A2. **Le groupe A6** est une structure bilatérale, se situant latéralement par rapport aux bords du quatrième ventricule. Il constitue la principale structure noradrénergique du SNC et correspond au **locus coeruleus** (LC). Chaque LC est composé chez le rat adulte de 1600 à 1800 neurones qui représentent environ 45 % des neurones noradrénergiques centraux (Swanson et al., 1976 ; Debure et al., 1992 ; Bezin et al., 1994a). Le LC est subdivisé en 3 parties : le LC proper, qui correspond au groupe A6 proprement dit, l'extension rostrale de A6 ou A6r, qui se situe dans la substance grise périaqueducale, et l'extension ventrale de A6 ou A6v, formant le subcoeruleus. **Le groupe A2** est localisé dans la partie dorsomédiane du bulbe rachidien, et se prolongerait dans la moelle épinière (Singhaniyom et al., 1983 ; Mouchet et al ; 1986). De la limite caudale de ce groupe jusqu'au niveau de l'area postrema, ces neurones sont majoritairement éparpillés dans le **noyau du tractus solitaire** (NTS).

Les groupes adrénérgiques bulbaires sont répartis en 3 groupes : C1, C2 et C3 (Figure I-12,B). Ils se situent dans l'extension rostrale des groupes A1 et A2 bulbaires. Une superposition des groupes A1 et C1, et A2 et C2 (partielle) a été observée (Hökfelt et al., 1984 ; Chamba et al., 1984 ; Kalia et al., 1985a,b ; Tucker et al., 1987). Dans cette thèse, nous



nous intéresserons plus particulièrement au groupe adrénérgique **C2**. Les neurones du groupe C2, qui se situent au niveau du bulbe dorsomédian, constituent le noyau dorsal du NTS ainsi que la portion du NTS localisée au niveau du plancher du 4<sup>ème</sup> ventricule.



**Figure I-12 : Localisation sur plan sagittal des différents noyaux noradrénérergiques (A) et adrénérergiques (B) centraux chez le rat adulte.**

D'après Moore et Card, 1984 ; Hökfelt et al., 1984

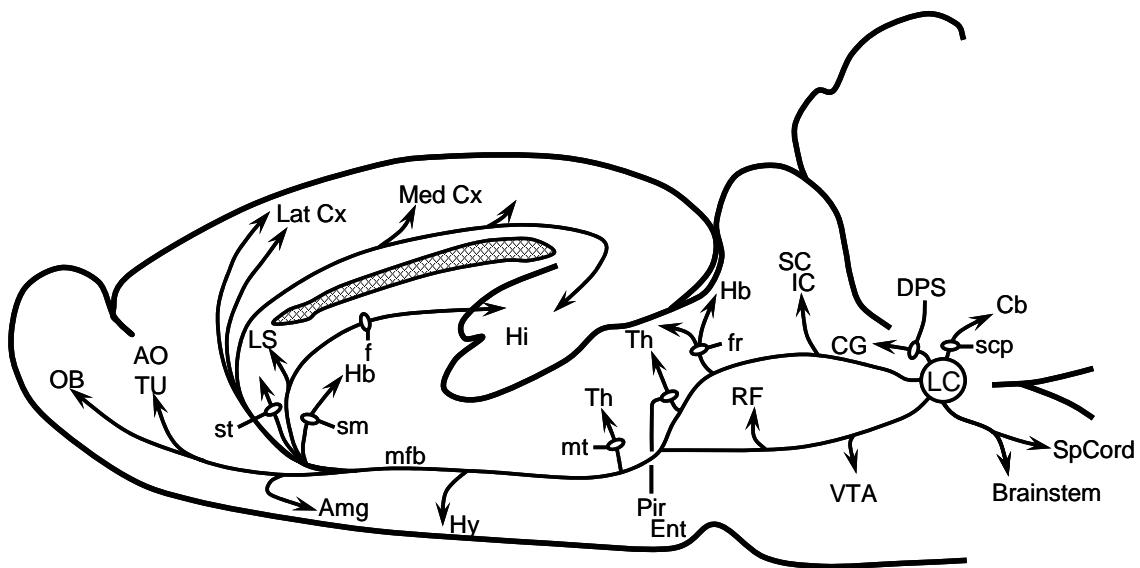
### ***III-2. Le locus coeruleus : la principale structure noradrénérergique du SNC***

#### **III-2.1. Mise en place d'un noyau noradrénérergique central**

Les cellules primordiales dont dériveraient les cellules catécholaminérgiques du LC expriment la TH dès le jour embryonnaire (E) 12,5 (Specht et al., 1981), alors même qu'elles poursuivent leur migration vers leur destination finale, atteinte durant la période tardive du développement embryonnaire. A partir du 17<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire, le LC subit une réorganisation histologique et un déplacement dans le pont. Cette réorganisation histologique du LC est caractérisée à la fois par une différenciation de prolongements axonaux et des prolongements dendritiques des neurones, par l'invasion et la différenciation des cellules gliales et par l'arrivée des fibres afférentes.

Les neuroblastes précurseurs des neurones du LC émettent des prolongements très tôt

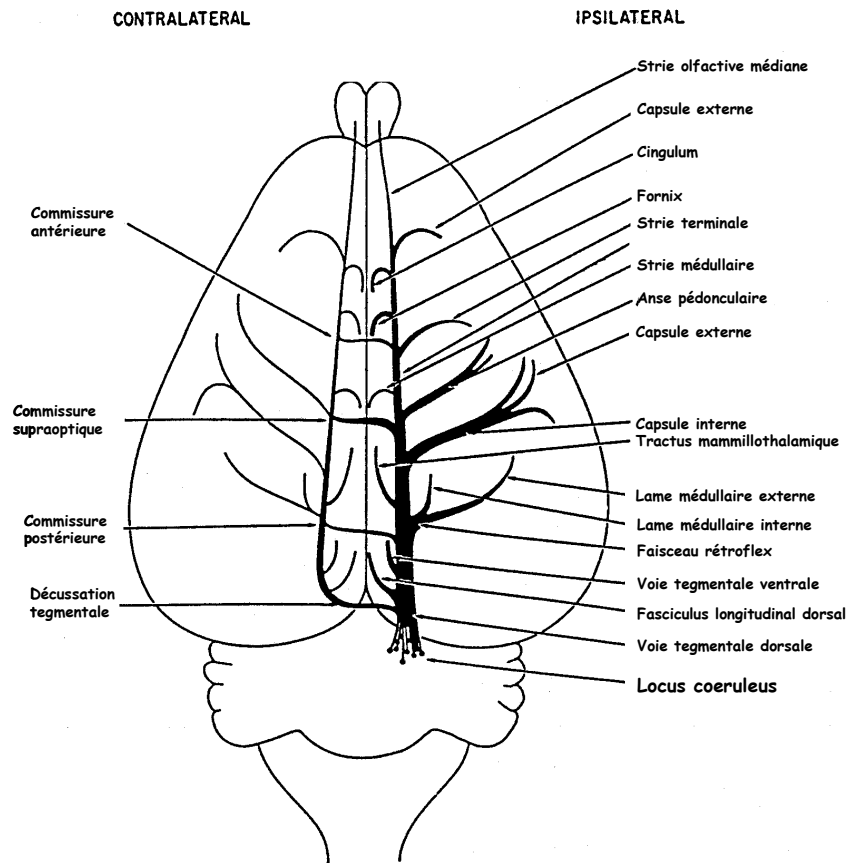
au cours de la période prénatale, dans les directions caudales et ventrales (Sievers et al., 1981). Des axones TH-immunopositifs émergent des neurones du LC se regroupent très rapidement en faisceaux allant innerver leurs cibles avant la fin de la période prénatale. Après la naissance, la croissance des axones coeruleins se poursuit et l'innervation définitive des territoires cibles des neurones du LC serait atteinte vers la fin du premier mois (Verney et al., 1982). A l'âge adulte, les faisceaux d'axones TH-immunopositifs provenant des neurones du LC empruntent la voie descendante du faisceau catécholaminergique longitudinal en direction de la formation ponto-bulbaire et de la moelle épinière, et la voie ascendante du faisceau tegmental dorsal, notamment en direction du cortex et de l'hippocampe (Figures I-13 et I-14).



**Figure I-13 : Les zones de projections majeures des neurones du LC.**

D'après Loughlin et Fallon, 1985

Amg : Amygdale ; AO : noyau olfactif antérieur ; Cb : cervelet ; CG : substance grise centrale ; ct : tractus tegmental central ; cx : cortex cérébral ; DPS : système périventriculaire dorsal ; Ent : cortex entorhinal ; f : fornix ; fr : fasciculus rétroflexus ; Hb : habénula ; Hi : hippocampe ; Hy : hypothalamus ; IC : colliculus inférieur ; LS : septum latéral ; mfb : faisceau médian du télencéphale ; mt : faisceau mammillo-thalamique ; OB : bulbe olfactif ; Pir : cortex piriforme ; RF : formation réticulée ; SC : colliculus supérieur ; scp : pédoncule cérébelleux supérieur ; sm : strie médullaire ; st : strie terminale ; Th : thalamus ; TU : tubercule olfactif ; VTA : aire tegmentale ventrale.



**Figure I-14 : Schéma des principales voies efférentes ascendantes du LC chez le rat.**  
D'après Jones et Moore, 1977

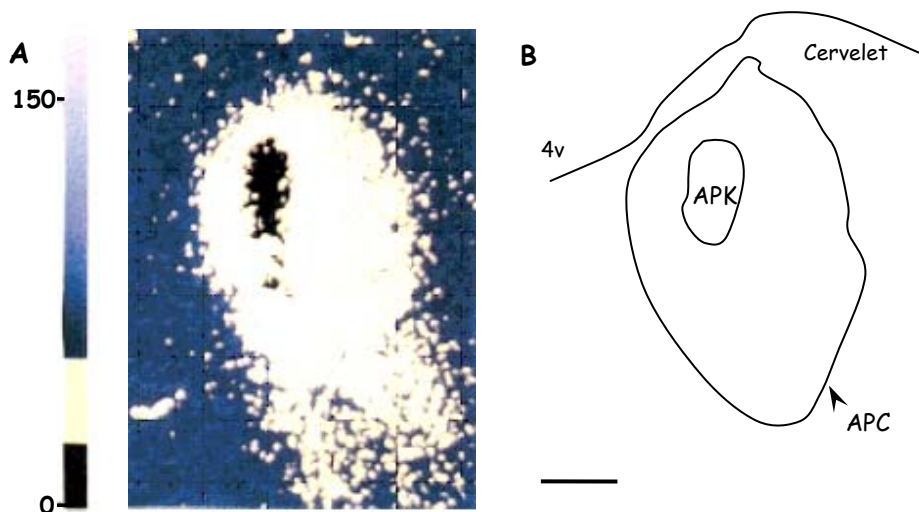
Au cours de la période postnatale, la population neuronale exprimant la TH augmente transitoirement au jour postnatal (P) 14, et diminue fortement entre P21 et P42, sans qu'aucune modification du phénomène apoptotique n'ait été mise en évidence (Bezin et al., 1994a, 2000a). Les cellules transitoirement « surnuméraires » à P14 et P21 formeraient deux populations distinctes au niveau du LC caudal. L'une perdrait le phénotype TH entre P14 et P21, l'autre entre P21 et P30, et ces deux populations seraient respectivement localisées à la périphérie et à l'intérieur de l'espace du LC adulte délimité par les soma TH-immunopositifs (Bezin et al., 1994a). Les cellules perdant le phénotype TH entre P14 et P21 ont été qualifiées de « quiescentes », étant donné qu'elles semblent pouvoir le recouvrer après traitement pharmacologique au RU24722 (Vindéburnol ; 14,15-dihydro-20,21-dinoréburnamine-14-ol) (Debure et al., 1994 ; Bezin et al., 2000a). La mise en évidence, dans le LC à l'âge adulte, de cellules exprimant le facteur de transcription Phox2a, un marqueur de la différenciation des neurones noradrénergiques (cf chapitre II-3.2.2.3), mais n'exprimant pas la TH (Bezin et al., 2000a), amène à penser que cette structure possède un « réservoir » potentiel de neurones qui peuvent se « réveiller » sous certaines conditions, afin de contribuer à la neurotransmission noradrénergique. Les neurones coeruleus Phox2a positifs – TH négatifs constitueraient ainsi

un pool de cellules pouvant contribuer, sous certaines conditions, non seulement à augmenter la libération de noradrénaline dans le LC, mais également dans certaines aires cérébrales si ces cellules partagent les mêmes territoires cibles que leurs voisines. Ces neurones « quiescents » pourraient donc participer au contrôle de certaines fonctions physiologiques dans certaines conditions nécessitant une forte libération centrale de noradrénaline, ou encore suppléer à leurs neurones voisins.

La distribution de la TH dans les différents compartiments ultra-structuraux (péricarya, dendrites et axones) des neurones du LC est modifiée de manière surprenante au cours du développement postnatal. A l'âge adulte, le dosage biochimique de la protéine TH dans le LC chez le rat, par immunoautoradiographie après transfert direct des protéines de coupes cérébrales sur des membranes de nitrocellulose, a mis en évidence que la TH est présente non seulement dans la zone du LC regroupant les corps cellulaires noradrénergiques, mais aussi dans une aire péricoeuléenne très étendue (Vachette et al., 1994 ; Bezin et al., 1994c, 1997, 2000b ; Debure et al., 1994). Il apparaît donc que la TH est compartimentée dans la région du LC entre l'aire du LC délimitée par les péricayas TH-immunopositifs (APK), et le neuropile entourant cette aire péricaryale (APC) (Figure I-15). L'APK regroupe non seulement les corps cellulaires des neurones du LC, mais aussi la portion proximale de leurs axones et dendrites, ainsi que des terminales d'axones ; l'APC regroupe une forte densité de prolongements dendritiques en provenance des neurones du LC, ainsi que des axones de passage et des terminales d'axones. La quantité de TH apportée dans le LC par les prolongements axonaux ne représenterait toutefois pas plus de 6 % de la quantité totale de TH détectée dans le LC à l'âge adulte (Gillon et al., 1989 ; Bezin et al., 1994c).

Jusqu'au jour postnatal (P)21, la TH est contenue majoritairement dans les corps cellulaires des neurones du LC (Bezin et al., 1994a,c, 1997, 2000b), donc observée principalement dans l'APK. Entre P21 et P30, une augmentation impressionnante de la présence de TH est observée au niveau du LC, sans pour autant que l'expression de l'ARNm-TH ne soit modifiée (Bezin et al., 1994b,c, 1997). Cette augmentation ne se produit pas principalement dans les corps cellulaires des neurones du LC, mais au niveau de l'APC. En effet, le volume de répartition de la TH augmente de 300 % entre P21 et P30 dans le compartiment péricoeuléen, 80 % de la protéine TH détectée dans la région du LC à P30 étant localisés dans l'APC (Bezin et al, 1994c). Etant donné la faible représentation de la TH d'origine axonale dans cette région, l'augmentation de la présence de la protéine dans l'APC résulterait d'une augmentation du remplissage des prolongements dendritiques coeruleens en TH. Il semblerait que ce remplissage ne soit pas la conséquence d'un phénomène de diffusion passive de la protéine du soma vers les dendrites. Au contraire, il s'agirait d'un mécanisme,

finement régulé et opérationnel dès la 3<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale, permettant d'orienter l'efflux de TH vers les compartiments axonaux et dendritiques (Bezin et al., 1997). Ce mécanisme serait activé lors de bouleversements physiologiques ou physiopathologiques du système noradrénergique coeruleen. En effet, le traitement de rats âgés de 23 jours au RU24722 (voir plus haut), provoque une augmentation de la présence de TH de 40 % seulement dans l'APK, mais d'un facteur 2 dans l'APC (Bezin et al., 1997). La surface du territoire cérébral TH-immunopositif mesurée dans la région du LC chez les rats P23 traités au RU24722 s'est avérée être identique à celle observée chez des rats contrôles adultes (P42), suggérant que le RU24722 agit en accélérant le processus de maturation du remplissage de l'aire dendritique du LC en protéine TH.



**Figure I-15 : Limites anatomiques de la zone TH-immunopositive délimitée par les péricaryas des neurones du LC et de la zone péricoeruleenne chez le rat adulte.**

D'après Bezin et al., 2000b

En A, photographie de la détection autoradiographique de la TH au niveau du LC du rat adulte après transfert des protéines totales sur membrane de nitrocellulose. La zone visualisée en noir correspond à la zone des péricarya des neurones du LC (APK), et la zone visualisée en jaune correspond à la région péricoeruleenne du LC (APC). En B, reconstruction topologique des limites du marquage de la protéine TH dans l'APK et l'APC. Noter que la concentration tissulaire de la TH est plus forte dans l'APK que dans l'APC. Echelle de couleur : 0 = forte concentration ; 150 = faible concentration.

## III-2.2. Organisation ultra-structurale des cellules du locus coeruleus

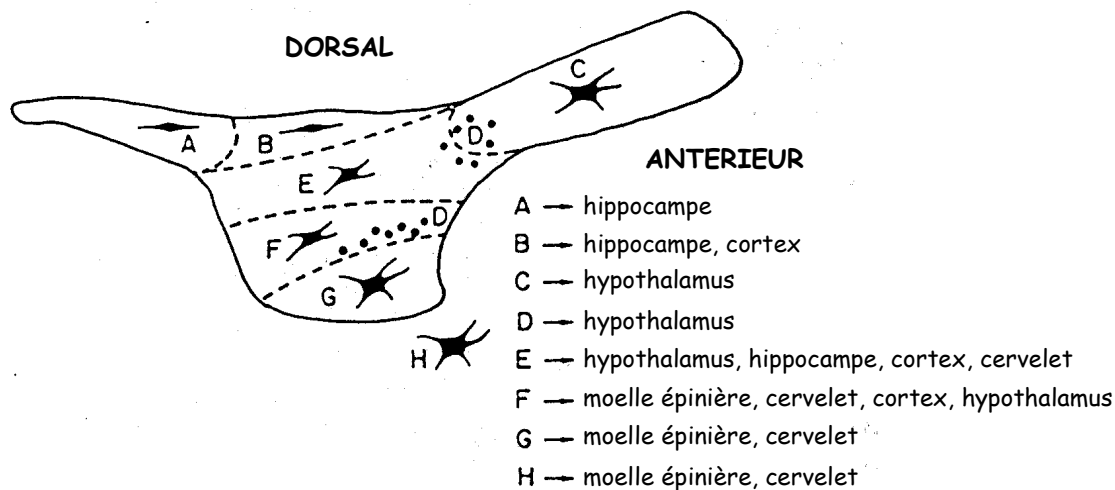
### III-2.2.1. Les corps cellulaires des neurones du LC

#### III-2.2.1.1. Morphologie et répartition

Au sein du LC, il existe essentiellement 3 types de neurones, en tenant compte de la morphologie de leur corps cellulaire. Les cellules multipolaires sont les cellules les plus volumineuses du LC. Par ordre de taille viennent ensuite les cellules fusiformes et les cellules

ovoïdes. La répartition, la morphologie et la densité de ces cellules permet de distinguer dans le LC trois subdivisions : le LC proper, l'extension dorso-caudale du LC proper et l'extension rostrale du LC proper (Figure I-16 ; Loughlin et al., 1986a).

Il existerait au sein du LC une organisation spatiale des cellules qui projetteraient sur des aires communes (Figure I-16). En effet, les cellules projetant sur l'hippocampe dorsal et ventral seraient spécifiquement situées dans la partie dorsale du LC proper et du LC postérieur. Les cellules projetant sur les hémisphères cérébraux et le cervelet, de même que celles projetant sur l'hypothalamus sembleraient être moins regroupées au niveau du LC. Les cellules projetant sur le cortex sont particulièrement situées dans les régions dorsale et ventro-médiane du LC proper. Etant donné que les cellules du LC sont réparties dans la structure selon leur morphologie, il semble donc qu'un type de cellule donné puisse envoyer des prolongements dans des aires de terminaison bien définies.



**Figure I-16 : Organisation spatiale des cellules du LC en fonction de leur morphologie et de leurs efférences.**

D'après Loughlin et al., 1986a,b

### III-2.2.1.2. Nature neurochimique des neurones coeruleins

(voir pour revue Olpe et Steinmann, 1991)

90 % des neurones du LC expriment la TH (Gagne et al., 1990 ; Chamba et al., 1991 ; Debure et al., 1992 ; Bezin et al., 1994a) et la DBH (Swanson 1976 ; Luque et al., 1992), et possèdent de ce fait un phénotype catécholaminergique. Toutefois, ces cellules n'expriment pas la PNMT, caractéristique qui leur confère un phénotype noradrénergique. Néanmoins, de nombreuses substances neurochimiques ont pu être mises en évidence au niveau des neurones de cette structure. En effet, 80 % des neurones localisés au niveau du LC contiennent de la sérotonine (voir pour revue Iijima, 1993). Toutefois, tous les neurones contenant de la sérotonine n'expriment pas la tryptophane hydroxylase, enzyme nécessaire à la biosynthèse

de ce neurotransmetteur (Weissmann et al., 1987). Il semble de plus qu'une grande majorité des neurones à phénotype noradrénergique du LC expriment également l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (Iijima, 1993). Plusieurs peptides seraient également co-localisés avec la noradrénaline dans les neurones du LC. C'est le cas de la galanine, du N-acétyl-aspartyl-glutamate, du neuropeptide Y et de la vasopressine. De plus, dans certains neurones du LC chez le rat, le facteur de libération de la corticotropine (CRF), la neurotensine, le polypeptide intestinal vasoactif et le facteur natriurétique atrial seraient également co-localisés avec la noradrénaline. La galanine notamment serait contenue dans 80 % des neurones noradrénergiques du LC, et serait susceptible d'être retrouvée dans des prolongements DBH-immunopositifs dans certaines aires de terminaison des neurones du LC, et en particulier dans le cortex cérébral et l'hippocampe.

### **III-2.2.2. Les prolongements des neurones du LC**

#### **III-2.2.2.1. Morphologie et répartition**

Les extensions dendritiques des neurones coeruleus sont souvent ramifiées en dendrites secondaires voire tertiaire. Les dendrites de ces cellules sont orientées de manière définie, mis à part pour les cellules ovoïdes. Au niveau du LC proper, il ne semble pas que les dendrites s'étendent loin des corps cellulaires. Au niveau des autres subdivisions du LC, les dendrites s'étendent dans toutes les directions et parcourent des distances considérables. Détectées par immunohistochimie de la TH ou de la monoamine oxydase, les dendrites des neurones noradrénergiques du LC peuvent mesurer de quelques dizaines de microns à 500 µm environ, selon leur direction (Swanson, 1976 ; Groves et Wilson, 1980a,b ; Grzanna et Molliver, 1980 ; Cintra et al., 1982 ; Maeda et al., 1991).

Le segment initial de l'axone des neurones coeruleus émerge soit d'un corps cellulaire, soit de la région proximale d'un tronc dendritique. Les axones des neurones coeruleus peuvent émettre des collatérales récurrentes et former des terminaisons axonales dans le LC. Des terminales d'axones en provenance d'autres structures cérébrales sont également observées au niveau du LC.

#### **III-2.2.2.2. L'APC : lieu de convergence des afférences au LC**

Le LC reçoit des afférences de types catécholaminergique (dopaminergique, noradrénergique et adrénérergique), sérotoninergique, GABAergique et cholinergique aussi bien dans l'aire du LC délimitée par les périkarya TH-immunopositifs (APK) (Pickel et al., 1975 ; Léger et Descarries, 1978 ; Bérod et al., 1984), que dans le neuropile péricoeruleus (APC) (Sutin et Jacobowitz, 1988) du LC. Par ailleurs, le LC reçoit des afférences

peptidergiques de natures très variées. Ces afférences innervent non seulement les corps cellulaires des neurones du LC mais aussi l'APC. Afin d'identifier les structures cérébrales innervant le LC, différentes techniques de traçage de voie par transport rétrograde ont été développées. L'injection de traceurs rétrogrades au niveau du LC a mis en évidence que de multiples structures cérébrales envoient des prolongements vers le LC, mais que deux structures cérébrales seulement projettent directement sur les corps cellulaires des neurones coeruleus, le noyau paragigantocellulaire et le noyau prepositus de l'hypoglosse, le lieu de contact principal des afférences arrivant au niveau du LC étant le compartiment dendritique (Cedarbaum et Aghajanian, 1978 ; Aston-Jones et al., 1986). Il semble donc que l'arborisation dendritique localisée autour de l'APK soit étroitement liée à la modulation de l'activité des neurones du LC par les informations afférentes.

### **III-2.2.3. Les cellules gliales (voir pour revue Sievers et al., 1981)**

C'est entre E17 et E18 qu'apparaissent les premières cellules gliales au niveau du LC. Ces dernières établissent des contacts membranaires avec les périkarya ou les prolongements des neurones. Ce n'est cependant que durant la période postnatale précoce, entre P3 et P14, que les cellules gliales envahissent en grand nombre le noyau de cette structure. Ces dernières se répartissent entre les cellules nerveuses, formant des feuilletts gliaux entourant préférentiellement les complexes synaptiques. Entre P15 et P30, les prolongements des cellules gliales recouvrent l'intégralité des périkarya et des prolongements des neurones du LC. A l'âge adulte, les jonctions synaptiques sont entourées d'une gaine de prolongements gliaux, et le segment initial des axones est entouré de lamelles de prolongements astrocytaires. Très tôt, il a été émis l'hypothèse que les cellules gliales pourraient être mises en jeu dans le fonctionnement à court terme des neurones du LC, et ceci, principalement en modulant les caractéristiques électriques des neurones et en modulant la diffusion des molécules au sein de cette structure. Par ailleurs, il semblerait que les astrocytes présents au sein du LC libèrent certains facteurs qui pourraient moduler l'activité à plus long terme des neurones du LC, en régulant l'expression de la TH.

### ***III-3. Locus coeruleus et fonctions***

Les premières études portant sur l'implication fonctionnelle des neurones du LC au sein du SNC avaient pu mettre en évidence que l'activité de ces neurones intervient particulièrement dans la réponse à des stimuli d'alarme, de peur ou de douleur. En fait, il est de nos jours établi que l'activité des neurones du LC participe notamment à l'initiation et au maintien de l'état d'éveil, permettant ainsi au SNC de collecter et de traiter les informations



d'origine sensorielle. De ce fait, le LC est impliqué indirectement dans la régulation d'un nombre très important de fonctions physiologiques. Par ailleurs, l'activité des neurones du LC est mise en jeu de manière beaucoup plus directe dans la modulation des circuits corticaux et sub-corticaux impliqués dans le traitement des informations relatives à la mémoire et à l'attention, ainsi que dans la gestion des fonctions de haute vigilance, et en particulier de la fonction cardiovasculaire et de l'adaptation aux conditions stressantes.

L'activation des neurones du LC, consécutive à la stimulation des nombreux récepteurs exprimés à leur surface, induit une libération de neurotransmetteur au niveau de leurs aires de terminaison. Par ailleurs, la stimulation des neurones coeruleins induirait également une libération somatodendritique de neurotransmetteur, au sein du LC lui-même. Ce type de libération du neurotransmetteur serait à la base d'une auto-régulation de l'activité des neurones du LC, par l'intermédiaire de la stimulation des autorécepteurs adrénergiques inhibiteurs (récepteurs  $\alpha_2$ ) et excitateurs (récepteurs  $\alpha_1$ ) présents à la fois à la surface des corps cellulaires des neurones du LC et de leurs prolongements (voir paragraphe III-5.). Toute modification de l'activité de décharge de certains neurones coeruleins pourrait ainsi représenter une modulation de la fonction dans laquelle ils sont impliqués.

### **III-3.1. Activité spontanée des neurones du LC**

L'activité électrique des neurones du LC change de manière importante de la période prénatale à la période adulte (Nakamura et al., 1987 ; Sakaguchi et Nakamura, 1987). Au stade fœtal et chez les jeunes rats, les neurones du LC possèdent des potentiels d'action spontanés dont l'amplitude est réduite, et la durée augmentée. De plus, le potentiel membranaire des cellules est plus élevé à ces stades du développement par rapport à l'âge adulte. Au stade périnatal, le plupart des neurones du LC n'ont aucune activité électrique spontanée et ceux qui sont néanmoins actifs émettent de façon sporadique des potentiels d'action suivis de longues périodes silencieuses. Au cours du développement, le mode de décharge des neurones du LC devient périodique (fréquence inférieure à 1 Hz). Au-delà de P20, la plupart des neurones ont une décharge tonique dont la fréquence est comprise entre 1 et 5 Hz. Il a également pu être mis en évidence que des neurones du LC distants de 100 à 300  $\mu\text{m}$  pouvaient émettre des potentiels d'action spontanés synchrones (Sakaguchi et Nakamura, 1987 ; Marshall et al., 1991).

### **III-3.2. Régulation coeruleine des cycles veille-sommeil**

(voir pour revue Berridge et Waterhouse, 2003)

L'implication du LC dans la régulation physiologique des cycles d'éveil et de sommeil

repose sur différentes observations indirectes. Cette hypothèse est fortement soutenue par le fait qu'une variation cyclique de l'activité électrique des neurones coeruleus est observée au cours du nyctémère : la fréquence de décharge spontanée des neurones du LC est importante durant l'éveil ( $1 < f < 5$  Hz), diminue progressivement au cours du sommeil lent ( $f < 1$  Hz), les neurones du LC devenant silencieux à l'entrée en phase de sommeil paradoxal. Les neurones du LC inhiberaient l'activité des neurones du thalamus et du néocortex, qui sont activement impliqués dans l'établissement des phases de sommeil. La libération de noradrénaline par les neurones du LC stimulerait l'activité de décharge des neurones localisés au niveau de l'aire du septum médian et de l'aire préoptique médiane de l'hypothalamus, et participerait notamment au maintien de la phase d'éveil.

Toutefois, certaines études suggèrent que dans certaines conditions, l'activité des neurones du LC participerait de manière indirecte à la mise en place de la phase de sommeil paradoxal. En effet, il a été mis en évidence chez le rat qu'une privation de sommeil induit une augmentation de la durée du sommeil paradoxal. La destruction sélective des neurones du LC par administration d'une neurotoxine, le DSP-4, a mis en évidence que les neurones noradrénergiques du LC sont activement impliqués dans l'établissement de ce rebond de sommeil paradoxal (Gonzales et al., 1996). Plus particulièrement, il semble que les prolongements noradrénergiques d'origine coeruleus innervant le noyau de l'amygdale soient particulièrement mis en jeu dans ce phénomène (Charifi et al., 2000).

### **III-3.3. Régulation coeruleus de la fonction cardiovasculaire**

Le LC intervient dans la régulation de la fonction cardiovasculaire notamment lors de situations d'alerte. En effet, l'activité des neurones du LC augmente considérablement lors d'une chute de pression artérielle, d'une hypoxie, ou d'une hypercapnie (Aston-Jones et al., 1991 ; Morilak et al., 1987). L'excitation des neurones coeruleus consécutive à un stress hémodynamique serait due à une libération locale de facteur de libération de la corticotropine (CRF) par les afférences vagales (Valentino et Wehby, 1988). Dans ce type de stress il apparaît une hétérogénéité anatomique de la réponse des neurones du LC, dont la réactivité est plus importante dans la partie rostrale que dans la partie caudale de la structure, ce qui dénote une régionalisation de la réponse des neurones du LC à un événement cardiovasculaire (Vachette et al., 1993). Cette régionalisation pourrait être en relation avec le fait que les neurones localisés dans la partie rostrale du LC projettent exclusivement sur l'hypothalamus, qui occupe une place prépondérante dans la régulation de la pression artérielle.

Miyawaki et coll. (1991) ont également suggéré que les neurones noradrénergiques du LC ont une influence inhibitrice sur le système sympathique. Néanmoins, cette influence des

neurones du LC ne serait pas directe. Le LC aurait également une influence inhibitrice sur l'arc baroréflexe (Murase et al., 1994).

### **III-3.4. Adaptation à des conditions stressantes**

(voir pour revue Berridge et Waterhouse, 2003)

Un grand nombre de situations stressantes pour l'individu, d'origines environnementale ou physiologique, induisent une augmentation de l'activité des neurones du LC qui pourrait résulter de la libération de CRF par les afférences en provenance du noyau paragigantocellulaire, du noyau de Barrington et du noyau central de l'amygdale.

La présentation à un nouvel environnement notamment constitue chez le rat une situation stressante. Dans une telle situation, l'animal initie en premier lieu un comportement exploratoire intense (activité locomotrice, arrêt ou immobilité, redressements et toilettage), puis son activité diminue au cours du temps (Eilam et Golani, 1989).

Le LC serait activement impliqué dans le traitement des informations relatives au stress de nouveauté. En effet, la destruction des neurones coeruleins induit en particulier une diminution des comportements locomoteur et exploratoire chez les rats exposés à une condition nouvelle, résultant apparemment d'une modification de la gestion du stress (Velley et al., 1988 ; Oknina, 1991). Il est probable que l'influence du LC se fasse par l'intermédiaire des efférences noradrénergiques du LC innervant l'hippocampe, qui est mis en jeu dans la détection de la nouveauté. Par ailleurs, il a récemment été mis en évidence qu'un stress de nouveauté provoque une augmentation des taux de noradrénaline non seulement au niveau du LC, mais également au niveau du cortex préfrontal (Pudovkina et al., 2001). L'augmentation de noradrénaline observée au niveau cortical proviendrait d'une libération par les prolongements des neurones du LC et pourrait participer à renforcer l'état de vigilance des rats.

### **III-3.5. Régulation de l'activité des neurones du LC par les autorécepteurs**

Les neurones du LC possèdent des récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques à la surface de leurs membranes somato-dendritiques. L'activation de ces derniers par la noradrénaline induit une disparition de l'activité électrique spontanée des neurones coeruleins (Cedarbaum et Aghajanian, 1977), consécutive à une hyperpolarisation des membranes somato-dendritiques. La noradrénaline libérée par les périkarya, les collatérales d'axones et potentiellement par les dendrites du LC aurait donc la capacité de stimuler ces autorécepteurs  $\alpha_2$ , opérant ainsi un rétrocontrôle inhibiteur sur l'activité des neurones du LC. Ce phénomène représente l'inhibition post-activation des neurones du LC.

Des autorécepteurs adrénergiques de type  $\alpha 1$  sont également présents dans le LC et interagiraient avec les récepteurs  $\alpha 2$ . A partir des travaux de Nakamura et coll. (1988) notamment, une hypothèse quant à cette interaction a été proposée : à faible activité des neurones du LC, la noradrénaline est libérée en faible quantité dans l'espace coeruleen et active principalement les récepteurs  $\alpha 1$ , dont l'affinité pour la noradrénaline est supérieure à celle des récepteurs  $\alpha 2$ , induisant une augmentation de l'activité de décharge des neurones du LC ; à activité électrique intense des neurones du LC, une grande quantité de noradrénaline est libérée dans l'espace coeruleen et active à la fois les récepteurs  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , induisant une sommation de composantes activatrices et inhibitrices qui, lorsqu'elle bascule en faveur de l'inhibition, induit une diminution du taux de décharge des neurones du LC.

### **III-3.6. Pathologies liées au dysfonctionnement du système coeruleen**

L'anxiété, la dépression, l'agressivité, la schizophrénie et la chorée de Huntington sont des troubles psychiatriques associés notamment à des altérations de l'expression de certaines protéines clés du métabolisme de la noradrénaline, la TH et le transporteur de la noradrénaline (NET), au niveau du LC (voir pour revues Iversen, 2000 ; Berridge et Waterhouse, 2003). Par ailleurs, une diminution du nombre de cellules noradrénergiques du LC pourrait être directement liée à la susceptibilité au suicide chez l'Homme. Toutefois, chez les individus victimes de suicide, l'expression de la TH est augmentée dans les neurones coeruleens restant (voir pour revues Arango et al., 1997 ; Ordway, 1997). La prédisposition au suicide pourrait ainsi être en partie la conséquence d'une altération (augmentation ou diminution) de la libération de noradrénaline dans différentes aires de terminaison des neurones du LC. Dans certaines pathologies neuro-dégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, une diminution du nombre de cellules est observée au niveau du LC. Toutefois, le lien qui pourrait exister entre les troubles décrits dans ces pathologies et l'altération des neurones du LC reste encore obscure.

## ***III-4. Le noyau du faisceau solitaire : premier relais central de l'arc baroréflexe***

### **III-4.1. Etablissement d'un noyau noradrénergique et adrénergique central**

Le marquage immunohistochimique des cellules positives pour la TH a mis en évidence que des neurones catécholaminergiques destinés à former le NTS sont présents dès le stade embryonnaire E15 dans le neuroépithélium adjacent au 4<sup>ème</sup> ventricule (Zhang et Ashwell, 2001). C'est à partir de E17 que les premiers neurones TH-immunopositifs ont pu

être observés dans la partie médiane du NTS caudal. Entre E19 et E21, la distribution et la densité des neurones TH-immunopositifs commence à prendre une configuration s'approchant de l'adulte, mais la densité du marquage n'est pas aussi intense qu'à l'âge adulte. Très tôt après la naissance (P2), la distribution des neurones catécholaminergiques est pratiquement identique à celle décrite chez l'adulte, mais la densité du marquage TH dans le neuropile est encore faible (comparée à l'âge adulte).

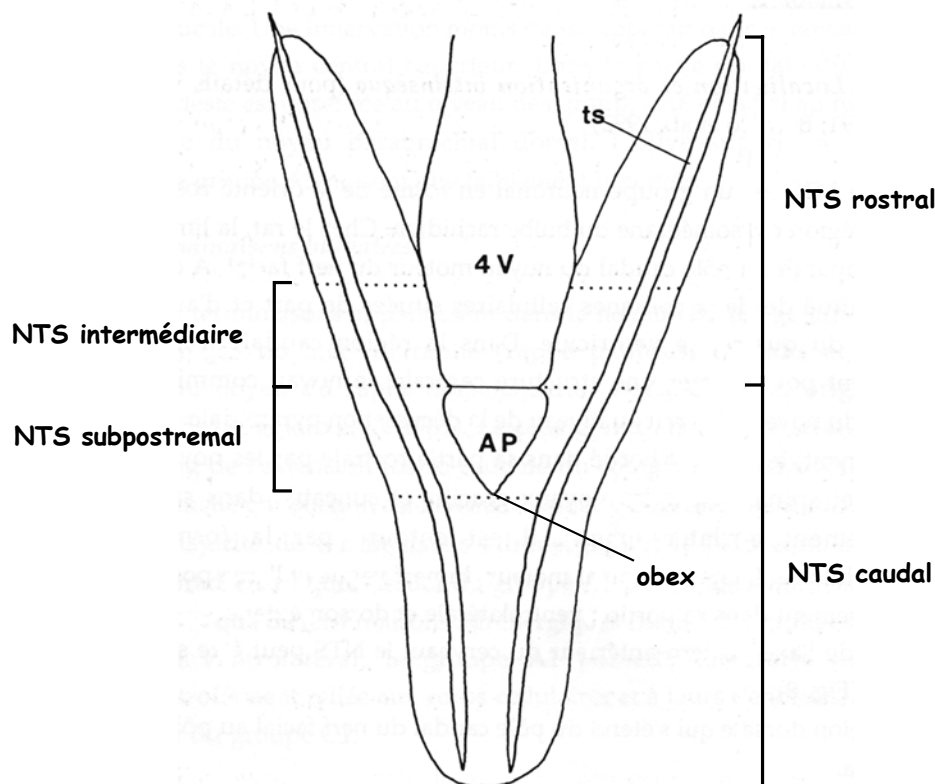
Bien que la configuration anatomo-biochimique des neurones TH-immunopositifs du NTS semble être acquise dès les stades postnataux précoces, il existerait, au sein de cette structure, des cellules adrénérergiques dans un état latent. En effet, le traitement de rats adultes au RU 24722, une molécule induisant l'expression de la TH dans les neurones catécholaminergiques du LC et du NTS, induit une augmentation du nombre de cellules exprimant la TH et la phényléthanolamine-N-méthyltransférase dans la région adrénérergique du NTS (Garcia et al., 1994, 1996). Ces cellules pourraient constituer un réservoir latent de TH et pourraient participer, dans certaines conditions qui restent encore à définir, à renforcer l'activité adrénérergique du NTS.

A l'âge adulte, la majorité de la protéine TH détectée au niveau du NTS est contenue dans le neuropile des cellules catécholaminergiques (Garcia et al., 1994). En effet, 2 % seulement de la TH serait contenue dans les péricarya des neurones catécholaminergiques du NTS. Ce neuropile est constitué de dendrites TH-immunopositifs émises par les corps cellulaires des neurones du NTS, par des axones de passage et/ou des terminales d'axones. La détection immunoautoradiographique de la TH dans la région du NTS chez le rat adulte, définit un espace topologique bien délimité et très reproductible entre les individus. Cette organisation semble être assurée non pas par la position des péricarya TH-immunopositifs, mais par l'organisation de leur neuropile proximal, regroupé en un réseau précis et finement établi (Garcia et al., 1994). En effet, la quantité de TH mesurée dans le NTS au niveau d'un plan anatomique particulier n'est pas dépendante du nombre de cellules TH-immunopositives présentes dans ce plan, mais du réseau dendritique local et des prolongements provenant de cellules localisées dans des plans anatomiques voisins. La TH contenue dans le neuropile catécholaminergique semble provenir d'un transport finement régulé de la protéine synthétisée dans les corps cellulaires des neurones. Ce transport a notamment été mis en évidence lors de fortes modifications de la synthèse de TH dans le NTS. En effet, le traitement de rats adultes au RU24722 induit une très forte augmentation de la présence de TH dans les neurones adrénérergiques du NTS, associée à une importante augmentation de l'étendue du territoire occupé par la TH dans le neuropile proximal bordant la structure (Garcia et al., 1994).

### III-4.2. Les neurones du NTS

#### III-4.2.1. Les corps cellulaires et les prolongements

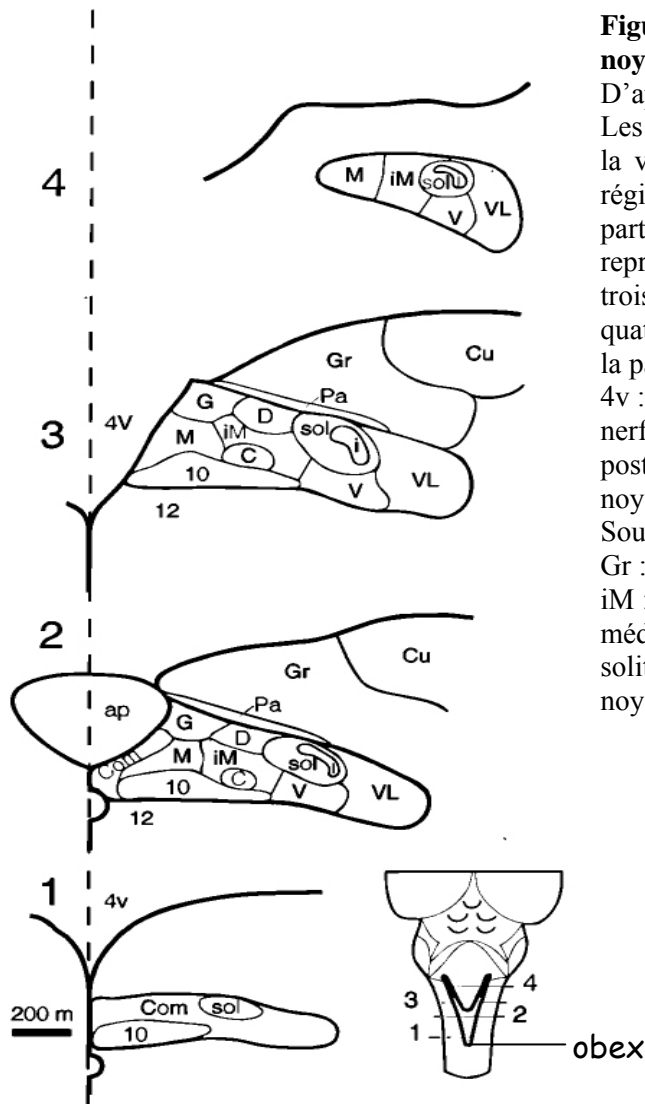
Le NTS à l'âge adulte présente une structure complexe. Le long de l'axe postéro-antérieur du cerveau, le NTS peut être subdivisé en trois régions : une région dorsale, qui s'étend du pôle caudal du nerf facial (X) au pôle rostral de l'area postrema; une région intermédiaire, qui correspond à la partie du NTS bordée par l'area postrema jusqu'à l'obex ; une région caudale, correspondant au noyau commissural qui s'étend jusqu'à la décussation pyramidale (Figure I-17). Par ailleurs, le NTS peut être divisé en 9 sous-noyaux (Figure I-18), de part la taille et la forme des cellules retrouvées dans ce noyau : Le NTS commissural, le NTS gélatineux, le NTS médian, le NTS ventro-latéral, le NTS ventral, le NTS dorsal, le NTS intermédiaire, le NTS interstitiel et le NTS central. Ces sous-noyaux ont par ailleurs été re-découpés par différents auteurs, mais la nomenclature actuelle ne retient que ces 9 sous-noyaux.



**Figure I-17 : Représentation schématique, dans un plan horizontal, des principales subdivisions anatomiques du NTS de rat et de leurs dimensions respectives**

D'après Barraco et al., 1992

AP : area postrema ; 4V : 4<sup>ème</sup> ventricule ; ts : tractus solitaire.



**Figure I-18 : Schéma représentant les sous-noyaux du NTS chez le rat adulte.**

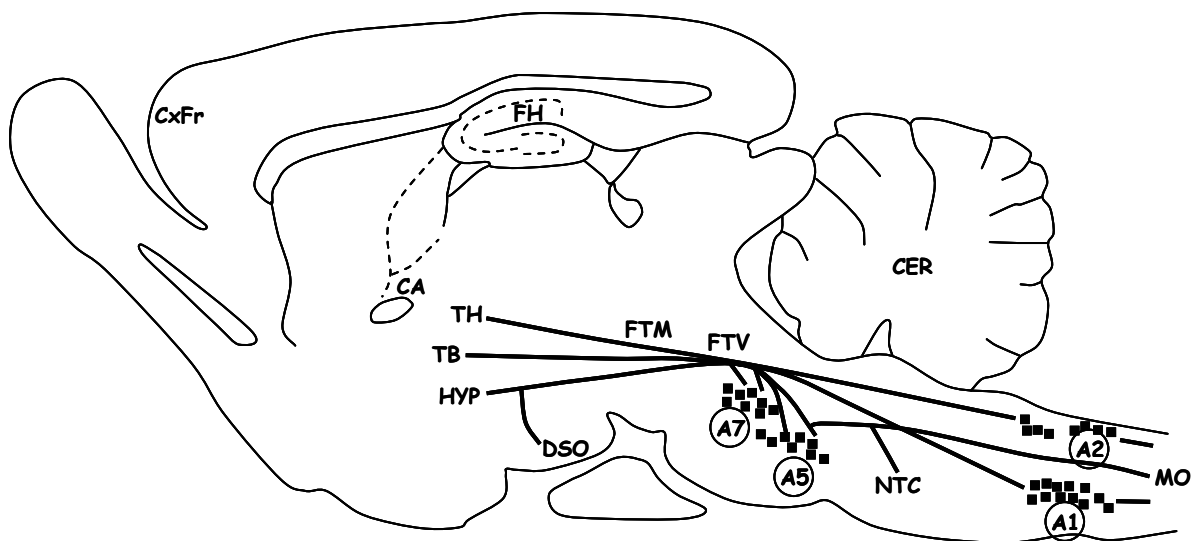
D'après Zhang et Ashwell, 2001

Les différents plans considérés sont représentés sur la vue dorsale (en bas à droite du schéma) de la région bulbaire. Le premier plan représente la partie la plus caudale du NTS ; le deuxième plan représente le NTS au niveau de l'area postrema ; le troisième plan représente le NTS au niveau du quatrième ventricule ; le quatrième plan représente la partie la plus rostrale du NTS.

4v : Quatrième ventricule ; 10 : Noyau moteur du nerf vague ; 12 : Noyau hypoglosse ; ap : Area postrema ; C : Sous-noyau central ; Com : Sous-noyau commissural ; Cu : Noyau cunéiforme ; D : Sous-noyau dorsal ; G : Sous-noyau gélatineux ; Gr : Noyau gracile ; i : Sous-noyau interstitiel ; iM : Sous-noyau intermédiaire ; M : Sous-noyau médian ; Pa : Noyau parasolitaire ; sol : Tractus solitaire ; V : Sous-noyau ventral ; VL : Sous-noyau ventrolatéral.

Au moins quatre types différents de neurones sont observés au niveau du NTS : allongés, multipolaires, fusiformes et ovoïdes (Lasiter et al., 1989 ; Vincent et Tell, 1999). La présence, la répartition ainsi que la proportion relative de ces types cellulaires diffèrent selon la subdivision du NTS considérée. Le nombre de branchements axonaux et de dendrites primaires, secondaires et tertiaires varie selon le type cellulaire. Néanmoins, aucune étude n'a catalogué de manière précise les différents types de cellules présentes dans les différentes subdivisions du NTS par rapport à l'orientation de ces dernières ainsi qu'à celle de leurs prolongements. Kawai et Senba (1996) ont toutefois proposé une nouvelle nomenclature afin de définir les différents types de neurones présents dans le NTS, notamment basée sur la direction de leurs axones. Pour ces auteurs, il existerait trois types de neurones au sein du NTS : des neurones intégrés au circuit local du NTS et caractérisés par un axone principal quittant la structure et de nombreuses collatérales d'axones distribuées dans le NTS ; des interneurons dont les collatérales d'axones sont exclusivement observées dans le NTS ; des neurones de projection dont les axones ont peu ou n'ont pas de collatérales.

A l'âge adulte, les axones des neurones catécholaminergiques sont regroupés en faisceau allant innerver des territoires cibles très éparses. Les neurones de A2 envoient des projections centrales ascendantes le long de deux voies: le faisceau tegmental central (Figure I-19) et le système catécholaminergique périventriculaire (Figure I-20). Les projections ascendantes des neurones localisés dans C2 empruntent principalement le faisceau périventriculaire ascendant, alors que les projections descendantes des neurones de C2 empruntent le faisceau périventriculaire descendant (Figure I-21). L'arborisation dendritique des cellules constituant le NTS présente un haut degré d'organisation à l'âge adulte (Schweitzer et al., 1993). Elle est extrêmement étendue sur plusieurs centaines de microns de part et d'autre du corps cellulaire et s'oriente dans toutes les directions. Ainsi, pour un neurone, l'arborisation dendritique peut s'étendre sur près d'un cinquième de la longueur totale du noyau, sur plus du tiers de sa largeur et pratiquement sur toute la hauteur du NTS. En conséquence, l'aire d'influence des afférences au NTS ne se limite pas au corps cellulaire des neurones le composant.

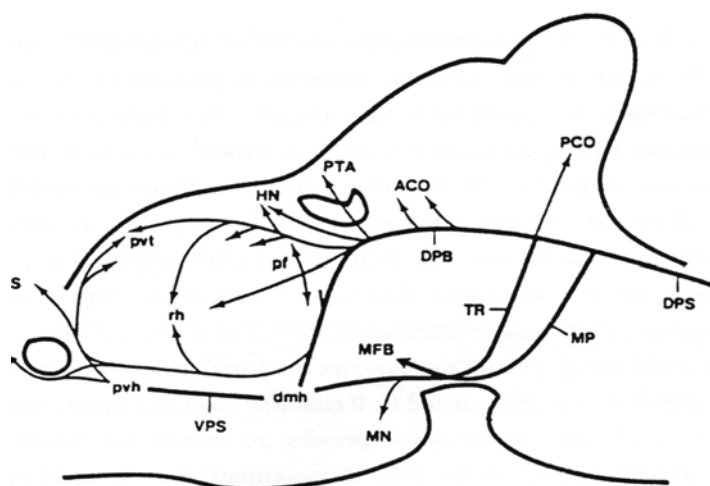


**Figure I-19 : Représentation schématique des projections ascendantes et descendantes des corps cellulaires noradrénergiques centraux du tegmentum latéral, hormis le groupe A6.**

D'après Holets, 1990

CER : Cervelet ; CxFr : Cortex frontal ; CA : Commissure antérieure ; FH : Formation hippocampique ; FTM : Faisceau télencéphalique médian ; FTV : Faisceau tegmental ventral ; HYP : Hypothalamus ; MO : Moelle épinière ; NTC : Noyaux du tronc cérébral ; TB : Télocéphale basal ; TH : Thalamus ; A1, A2, A5, A7 : Groupes cellulaires noradrénergiques.

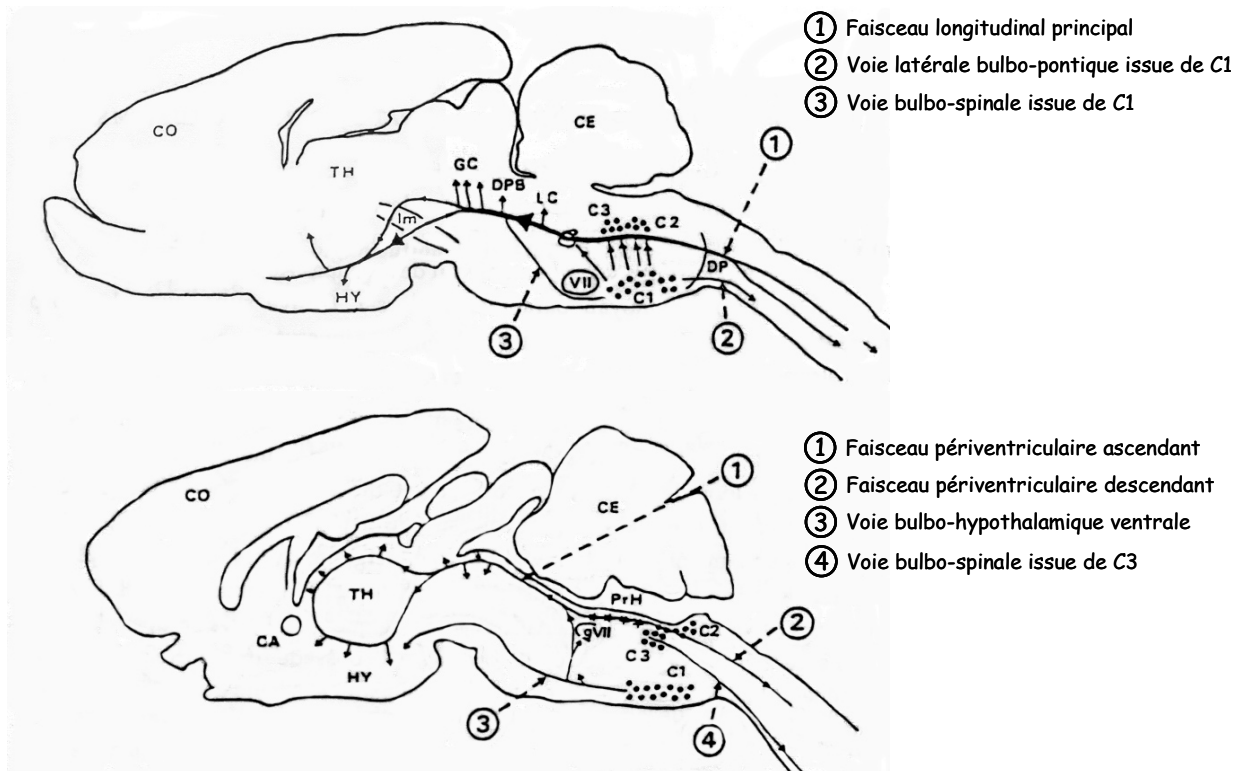




**Figure I-20 : Représentation schématique des systèmes périventriculaires dorsal et ventral, en amont de A6.**

D'après Lindvall et Bjorklund, 1974

ACO : Tubercules quadrijumeaux antérieurs ; dmh : Noyau dorso-médian de l'hypothalamus ; DPS : Système catécholaminergique dorsal ; HN : Noyaux habénulaires ; MFB : Faisceau télencéphalique médian ; MN : Noyaux mamillaires ; MP : Pédoncule mamillaire ; PCO : Tubercules quadrijumeaux postérieurs ; pf : Noyau parafasciculaire ; PTA : Aire prétectale ; pvh : Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; pvt : Noyau paraventriculaire du thalamus ; rh : Noyau rhomboïde ; S : Septum ; TR : Radiations catécholaminergiques tégmentales ; VPS : Système catécholaminergique ventral.



**Figure I-21 : Les différentes voies adrénérgiques centrales chez le rat adulte.**

D'après Astier, 1988

CA : Commissure antérieure ; CE : Cervelet ; CO : Cortex ; C1 : Groupe adrénérgique C1 ; C2 : Groupe adrénérgique C2 ; C3 : Groupe adrénérgique C3 ; DP : Décussation pyramidale ; GC : Substance grise centrale ; gVII : Genou du nerf facial ; HY : Hypothalamus ; LC : Locus coeruleus ; Im : Lemnisque médian ; PBL : Noyau parabrachial latéral ; Prh : Noyau prepositus de l'hypoglosse ; TH : Thalamus ; VII : Noyau du nerf facial.

Les projections centrales des neurones du NTS sont organisées topographiquement. En effet, le NTS rostral projette sur la partie caudo-médiane du noyau parabrachial, la région intermédiaire sur les subdivisions latérales du noyau et le NTS caudal sur le noyau Kölliker-Fuse (Kawai et al., 1988 ; Granata et Kitai, 1989 ; Herbert et al., 1990 ; Krukoff et al., 1992). Le NTS rostral, et en particulier le groupe adrénérique C2, projette sur A6/locus coeruleus (Sim et Joseph, 1994 ; Van Bockstaele et al., 1999). Les NTS commissural et rostral innervent par ailleurs le mésencéphale, et en particulier les raphés magnus et dorsalis (Herbert, 1992). Au niveau diencephalique, les neurones du NTS rostral et caudal innervent différents noyaux hypothalamiques, les noyaux paraventriculaire, dorsomédian, préoptique médian, arqué et latéral (Palkovits, 1980 ; Zardetto-Smith et Gray, 1987 ; Ter Horst et al., 1989). Au niveau télencéphalique, le NTS innerve la partie latérale du lit de la strie terminale, le noyau central de l'amygdale, et le tubercule olfactif (Guevara-Guzman et al., 1991).

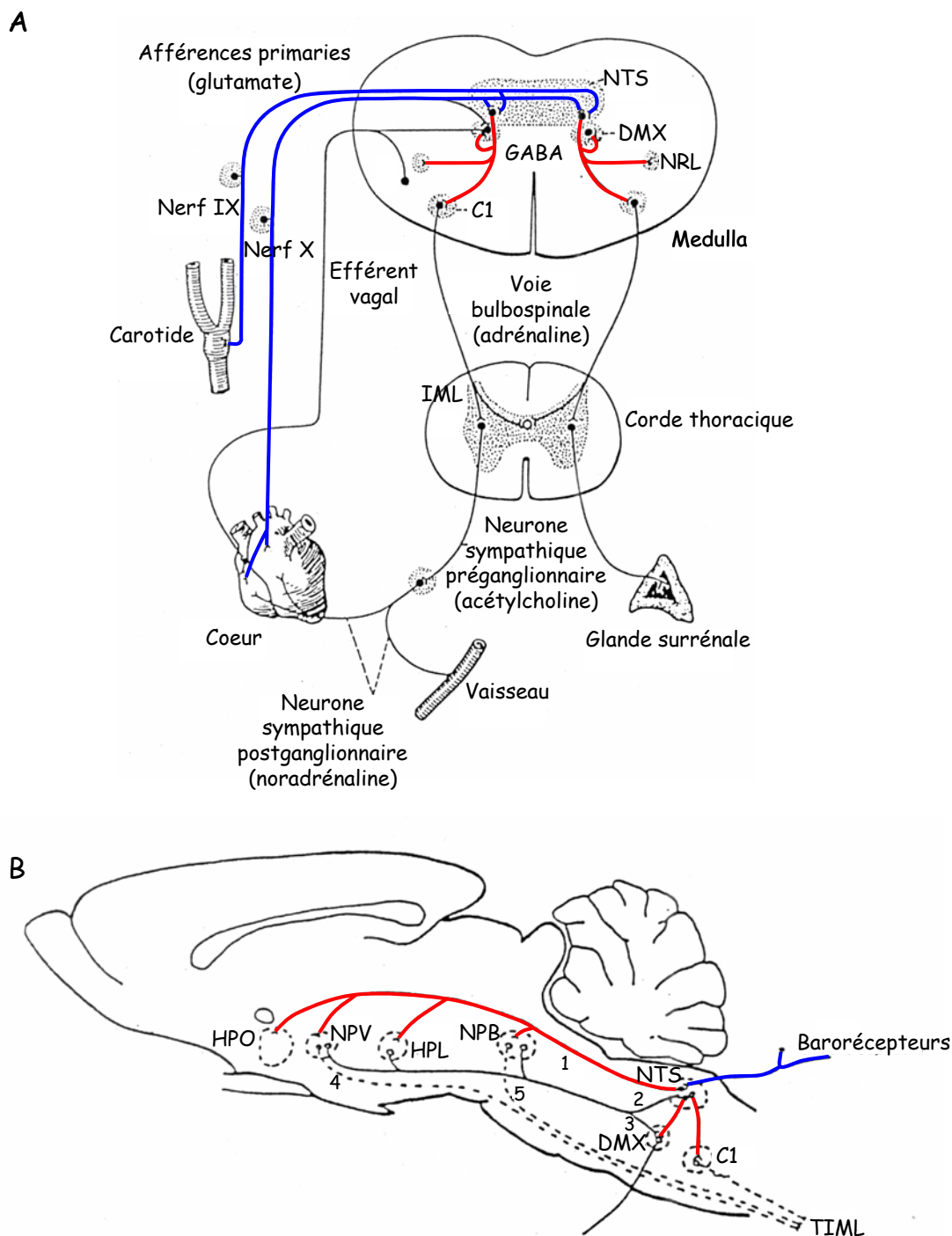
#### **III-4.2.2. Nature biochimique des neurones du NTS**

(voir pour revue Barraco et al., 1992 ; Lawrence et Jarrot, 1996 ; Talman et al., 2001)

Le NTS contient des taux élevés de noradrénaline et d'adrénaline, mais également des taux relativement élevés de dopamine. La tyrosine hydroxylase, la dopamine bêta hydroxylase et la phényléthanolamine-N-méthyltransférase ont pu être mises en évidence aussi bien dans les corps cellulaires que dans les dendrites proximales des neurones (Armstrong et al., 1982 ; Kalia et al., 1985a,b ; Ruggiero et al., 1985 ; Pickel et al., 1986b). Ces enzymes sont primordiales pour la synthèse de noradrénaline (TH et DBH) et d'adrénaline (TH, DBH et PNMT) (Figure I-5). Les cellules noradrénériques du NTS correspondent à des cellules appartenant au groupe A2 principalement, et les cellules adrénériques correspondent principalement à des cellules de C2. La dopamine mesurée au niveau du NTS semble provenir de terminaisons afférentes. Par ailleurs, certains neurones observés au niveau du NTS utilisent comme neurotransmetteur soit la sérotonine, l'acétylcholine, le glutamate, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), la somatostatine, la corticotrophine, la cholécystokinine, l'enképhaline, le peptide vasointestinal actif, le neuropeptide Y, la neurotensine, l'angiotensine II, les peptides opioïdes, la substance P et l'oxyde nitrique.

#### **III-5. Fonctions du NTS**

De part le fait que le NTS reçoit une riche innervation périphérique en provenance des nerfs crâniens, à savoir des nerfs facial, trijumeau, glossopharyngien et vague, cette structure est un véritable senseur des variations des grandes fonctions végétatives, comme la fonction cardiovasculaire, la respiration, les états viscéraux et la thermorégulation (voir pour revue



**Figure I-22 : Représentations schématiques des boucles bulbaires et supra-bulbaires du baroréflexe.**

Les voies afférentes et efférentes au NTS sont respectivement dessinées en bleu et en rouge. Abréviations : DMX, noyau moteur du nerf X ; GABA, acide gamma aminobutyrique ; HPL, hypothalamus postérolatéral ; HPO, région préoptique de l'hypothalamus ; IML, région inter-médiolatérale de la moelle épinière ; NPB, noyaux parabrachiaux ; NPV, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; NRL : noyau réticulaire latéral ; NTS, noyau du faisceau solitaire ; TIML, tractus inter-médiolatéral ; X, nerf vague ; 1, projection de neurones du NTS sur des structures supra-bulbaires ; 2, voies issues des structures supra-bulbaires et innervant le NTS ; 3, voies issues de structures supra-bulbaires et innervant le DMX ; 4, projection directe du NPV sur le TIML ; 5, projection directe de la partie dorsolatérale du pont sur le TIML.

Boscan et al., 2002). C'est en effet à son niveau que naissent les réponses réflexes déclenchées par les baro- et chémo- récepteurs périphériques (Jordan et Spyer, 1986). En particulier, les informations en provenance des barorécepteurs aortiques et sinocarotidiens convergent au niveau du NTS, où elles sont traitées une première fois avant d'être redistribuées vers d'autres structures cérébrales bulbaires et supra-bulbaires telles que le complexe A1C1, le noyau réticulaire latéral, les noyaux parabrachiaux et l'hypothalamus (Figure I-22A,B). Le traitement des informations arrivant aux neurones du NTS est fortement modulé par la libération locale d'une diversité impressionnante de neurotransmetteurs, en provenance non seulement des nerfs crâniens, mais aussi des neurones du NTS et des nombreuses afférences centrales supra-bulbaires telles que les afférences hypothalamiques (Figure I-22B).

La noradrénaline et l'adrénaline participent de façon primordiale au traitement des informations afférentes aux neurones du NTS (voir chapitre IV-5.2.). Etant donné que ces neurones expriment certains autorécepteurs adrénergiques inhibiteurs (récepteurs  $\alpha_2$ ) et excitateurs (récepteurs  $\alpha_1$ ) au niveau du compartiment somato-dendritique, la libération locale de NA dendritique au niveau du NTS pourrait à la fois participer à la neurotransmission globale, mais aussi à la modulation de l'excitabilité des neurones coeruleins en réponse à un stimulus afférent (voir chapitre IV-3.6.).

### **III-5.1. L'activité spontanée des neurones du NTS**

(Kawai et Senba, 2000)

Les neurones localisés dans les parties dorso-médiane et médiane du NTS ont une activité électrique spontanée dont la fréquence est supérieure à 2 Hz et l'amplitude maximum du courant est supérieure à 30 pA. Les courants enregistrés au niveau de ces neurones sont à la fois des courants entrants (potentiels post-synaptiques excitateurs) et des courants sortants (potentiels post-synaptiques inhibiteurs). Cette activité spontanée est due à des activités synaptiques intrinsèques glutamatergique (excitatrices) et GABAergique (inhibitrices). Il existerait 3 types d'activité électrique spontanée : le type I représente à la fois une activité de potentiels post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs; le type II représente une forte activité de potentiels post-synaptiques inhibiteurs et une très faible activité de potentiels post-synaptiques excitateurs ; le type IV représente une forte activité de potentiels post-synaptiques excitateurs.

Il existe une forte relation entre le stade du développement et l'activité spontanée des neurones du NTS. Entre P0 et P3, les neurones du NTS possèdent tous une activité spontanée de type I. Entre P5 et P10, quelques neurones seulement sont caractérisés par une activité de type I, et une large majorité de neurones par des activités de types II ou IV. Entre P22 et P37,

les neurones ont une activité spontanée de type II (environ 30 % des neurones) ou de type IV (environ 70 % des neurones). Par ailleurs, une forte corrélation est observée entre la morphologie cellulaire et l'activité spontanée des neurones.

### **III-5.2. Régulation de la fonction cardiovasculaire**

Le NTS joue un rôle important dans la régulation de la fonction cardiovasculaire et ceci notamment parce qu'il représente le premier relais central de l'arc baroréflexe. L'arc baroréflexe est un mécanisme complexe de rétro-contrôle de la pression artérielle, par lequel toute modification de cette dernière entraîne une variation opposée de la fréquence cardiaque et des résistances périphériques, visant à restaurer un état tensionnel initial. Dans les conditions physiologiques, le baroréflexe représente un mécanisme de régulation très rapide (réflexe) de la pression artérielle. La stimulation des barorécepteurs sinocarotidiens et aortiques active les nerfs glossopharyngiens et vagues, qui libèrent notamment du glutamate, et probablement également de la substance P au sein du NTS (Figure I-22A). La noradrénaline, la sérotonine, le GABA, le glutamate, la substance P, l'oxyde nitrique et les angiotensines seraient également libérés au sein du NTS, par des éléments intrinsèques et extrinsèques après activation du NTS. Ces facteurs semblent être primordiaux dans la régulation de la fonction cardiovasculaire mettant en jeu le NTS (voir pour revues Machado, 2001; Michelini et al., 2001 ; Boscan et al., 2002 ; Zanzinger et al., 2002). Une fois traitées, les informations végétatives sont redistribuées vers les neurones cardiomodérateurs centraux au niveau du bulbe et du télencéphale.

L'innervation noradrénergique du NTS semble être responsable de la stabilité de la pression artérielle, par facilitation de l'activité vasopressinergique (Yamazaki et Nonimiya, 1993). Une perturbation de l'homéostasie catécholaminergique au sein du NTS par l'injection locale de noradrénaline provoque une bradycardie ainsi qu'une hypotension (De Jong et Nijkamp, 1976). De plus, une diminution des libérations de noradrénaline et d'adrénaline a été observée chez le chat au niveau du NTS en réponse à une augmentation provoquée de la pression artérielle par injection systémique de noradrénaline (Kobilansky et al., 1988).

### **III-5.3. Les dendrites des neurones du NTS : lieu de contact des afférences**

Un nombre assez important d'afférences ne contactent pas directement les corps cellulaires des neurones catécholaminergiques du NTS, mais préférentiellement leurs dendrites. C'est en particulier le cas pour les afférences GABAergiques (Pickel et al., 1989a) et enképhalinergiques (Pickel et al., 1989b) se projetant sur les neurones du NTS.

### **III-5.4. Pathologies liées au dysfonctionnement du NTS**

L'hypertension de type neurogénique est souvent associée à un dysfonctionnement neuronal au niveau du NTS (voir pour revue Reis, 1981). L'intervention du NTS dépassant largement le cadre de la régulation de la fonction cardiovasculaire, son dysfonctionnement serait associé à un nombre très important de pathologies. Notamment, un dysfonctionnement du NTS et une diminution du nombre de cellules exprimant la TH sont observés dans certains cas de maladies neurodégénératives telle que la maladie de Parkinson (Saper et al., 1991). Un dysfonctionnement du NTS serait à la base des déficits cardiovasculaires responsables de la mort subite du nouveau-né. En effet, une absence de la PNMT (enzyme responsable de la formation d'adrénaline à partir de noradrénaline) au niveau du noyau gélatineux du NTS, ainsi qu'une réduction de l'activité de cette enzyme dans la partie rostrale du NTS, ont été observées chez les nouveaux-nés atteints de cette pathologie (Kopp et al., 1993).

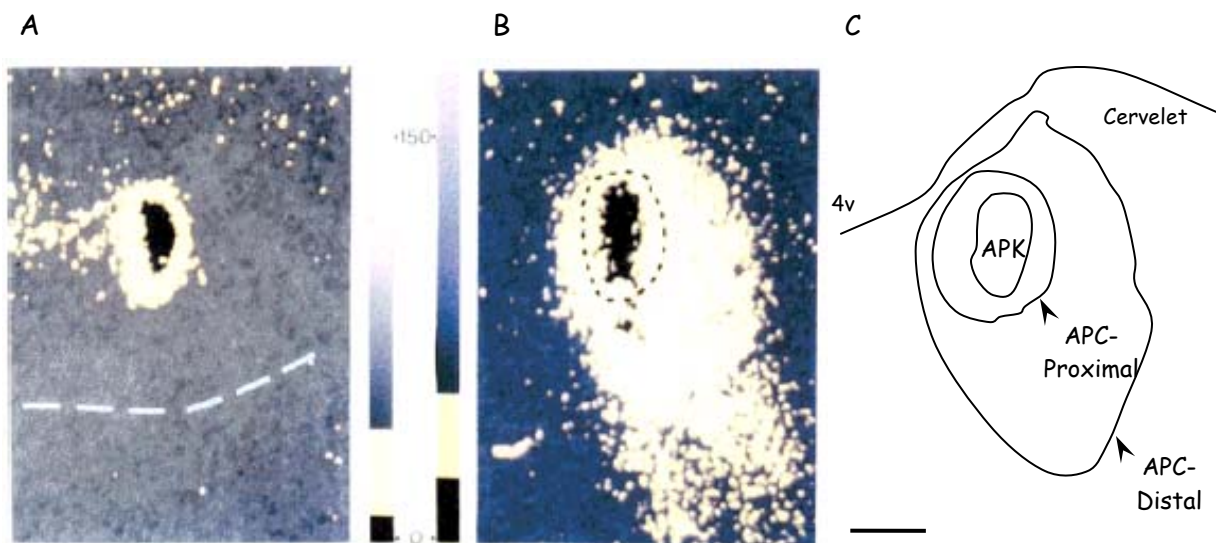
### ***III-6. Implication fonctionnelle des dendrites des neurones du LC et du NTS***

Le rôle le plus communément admis des dendrites est la réception des informations afférentes. Outre ce rôle primordial des prolongements dendritiques, il semble qu'ils participent activement à la synthèse et à la libération de neurotransmetteur.

Il a été suggéré dès 1975 une probable libération somato-dendritique des catécholamines et en particulier de la dopamine au niveau de la substance noire (Björklund et Lindvall, 1975). Le travail de Glowinski et coll. a par la suite démontré, à l'aide d'une technique de canulation « push-pull » chez le chat anesthésié, que les dendrites des neurones de la substance noire peuvent effectivement libérer de la dopamine (Nieoullon et al., 1977 ; Chéramy et al., 1981). De nombreuses observations réalisées par la suite ont laissé présager que les dendrites des neurones du LC et du NTS ont également la capacité de synthétiser des catécholamines. En effet, il a été montré que les dendrites des neurones du LC et du NTS contiennent, comme au niveau de la substance noire, une quantité très importante de TH (Garcia et al., 1994 ; Bezin et al., 1994c). De plus, les limites des territoires TH-immunopositif bordant les zones périkaryales du LC et du NTS se sont avérées être très reproductibles, ce qui suggère un contrôle très précis de la présence de la protéine dans les prolongements catécholaminergiques au niveau de ces deux structures. La synthèse potentielle de catécholamines dans les dendrites des neurones du LC et du NTS suggère que ces derniers pourraient libérer ces neurotransmetteurs. Le processus de libération dendritique est étayé au niveau du NTS par la présence dans les dendrites des neurones catécholaminergiques de nombreuses vésicules à cœur dense, pouvant correspondre à des

vésicules de sécrétion de neurotransmetteur (Pickel et al., 1986b). Cette organisation reste toutefois à confirmer au niveau des neurones du LC.

Les études concernant la TH dendritique ont essentiellement été réalisées au niveau du LC. Il a été mis en évidence que la forme active de la protéine est détectée au niveau de l'APC du LC chez le rat adulte (Bezin et al., 2000b), bien que ne représentant que 22 % de la quantité totale de protéine TH observée dans cette région (Figure I-23). La zone de l'APC contenant de la TH sous sa forme active peut être délimitée de manière très reproductible d'un individu à l'autre et semble de ce fait finement contrôlée. Chez le rat adulte, elle ne représente que 11,7 % environ de la surface totale de l'APC.



**Figure I-23 : Limites anatomiques de la région du locus coeruleus contenant de la protéine TH active chez le rat adulte.**

D'après Bezin et al., 2000b

En A, photographie de la détection de la protéine TH active réalisée à l'aide de la (3',5')-[3H<sup>2</sup>]- (D, L)- $\alpha$ -fluorométhyltyrosine. La zone visualisée en noir correspond à la zone des péricarya des neurones du LC (APK), et la zone visualisée en jaune correspond à la région péricoerulénne du LC contenant de la TH sous sa forme active (APC-Proximal). En B, photographie de la détection immunoautoradiographique de la TH au niveau du LC, dans un plan adjacent à celui présenté en A, après transfert des protéines totales sur membrane de nitrocellulose. La zone visualisée en noir correspond à la zone des péricarya des neurones du LC (APK), et la zone visualisée en jaune correspond à la totalité de la région péricoerulénne du LC contenant de la protéine TH (APC-Distal). En C, reconstructions topologiques des limites du marquage de la protéine TH dans l'APK et l'APC-Distal, et de la protéine TH sous sa forme active (APC-Proximal).

La libération dendritique de (nor)adrénaline pourrait moduler l'activité des neurones du LC et du NTS en activant les récepteurs adrénergiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ) présents au niveau de leur compartiment somato-dendritique. Localement, au niveau de l'espace neuropilien, la libération de ces neurotransmetteurs pourrait directement stimuler les autorécepteurs inhibiteurs  $\alpha_2$  présents sur les membranes des dendrites et ainsi diminuer leur potentiel électrique membranaire. Etant donné qu'une grande majorité des afférences aux neurones du LC et du NTS contactent directement leurs dendrites, la libération dendritique locale de

noradrénaline pourrait donc, en modulant le seuil d'excitabilité de ces prolongements, participer en quelque sorte à « filtrer » les informations arrivant au LC et au NTS, comme il a été suggéré par l'ensemble des études réalisées par Singewald et Philippu (pour revue, voir Singewald et Philippu, 1998). La modulation de l'adressage de la TH dans les prolongements dendritiques des neurones du LC et du NTS, et de ce fait probablement du territoire neuropilien contenant de la TH active, pourrait ainsi activement participer au contrôle de la réactivité des neurones à un stimulus donné. Cette hypothèse est corroborée par différentes études ayant utilisé une molécule induisant pharmacologiquement l'expression de la TH dans les neurones du LC et du NTS. Le traitement des rats au RU24722 (Vindéburnol) augmente l'expression de la TH au niveau des deux structures et accroît fortement la présence de la protéine sous sa forme active dans l'espace neuropilien (Garcia et al., 1994 ; Bezin et al., 1997, 2000b). Au niveau du LC, ces phénomènes sont accompagnés d'une hypo-réactivité des neurones en réponse à un stress hypotenseur (Vachette et al., 1993, 1994), qui pourrait traduire une diminution de la sensibilité des neurones du LC due à une augmentation de la libération dendritique de noradrénaline. La modulation de la présence de la TH dans l'APC pourrait donc effectivement participer à un filtrage très finement régulé des informations afférentes au LC.

#### **IV. MISE EN JEU DU SYSTEME ANGIOTENSINERGIQUE CEREBRAL DANS LA MODULATION DE LA NEUROTRANSMISSION NORADRENERGIQUE**

(voir pour revue Gelband et al., 1997)

Comme énoncé dans précédemment, le système angiotensinergique cérébral serait particulièrement impliqué dans la modulation de la neurotransmission catécholaminergique/noradrénergique au sein du SNC, notamment au niveau du LC et du NTS. Les premières études dédiées à la caractérisation des interactions entre les systèmes angiotensinergique et catécholaminergique centraux ont pu mettre en évidence que l'interaction entre l'Ang II et ses récepteurs augmente le taux de renouvellement de la noradrénaline aussi bien *in vivo* qu'au niveau de neurones noradrénergiques en culture (Sumners et al., 1983 ; MacLean et al., 1990). Les études réalisées *in vitro* sur des neurones noradrénergiques d'hypothalamus et de tronc cérébral de rats nouveaux-nés ont pu dévoiler que l'Ang II a des effets à court et à long termes sur la neurotransmission noradrénergique, qui ne mettraient pas en jeu les mêmes voies de signalisations intracellulaires.



## ***IV-1. Le système angiotensinergique au niveau du noyau du faisceau solitaire et du locus coeruleus***

### **IV-1.1. Le système angiotensinergique au niveau du noyau du faisceau solitaire (NTS)**

L'AOPEN apparaît dans le NTS entre le 4<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour de vie postnatale et persiste chez l'adulte (Mungall et al., 1995). Seuls les astrocytes semblent exprimer l'AOPEN dans cette structure. Une augmentation de l'expression et de la concentration d'AOPEN a par ailleurs pu être mise en évidence entre le stade périnatal et l'âge adulte (Meyer et al., 1990).

L'Ang II détectée dans le NTS est localisée aux niveaux présynaptique et postsynaptique. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence des terminaisons neuronales ainsi que des varicosités positives pour l'Ang II dans le NTS (Weyhenmeyer and Phillips, 1982 ; Fuxe et al., 1988 ; Lenkei et al., 1997). Se sont particulièrement les structures centrales localisées en dehors de la barrière hémato-encéphallique, tels que l'organe subfornicale ou encore l'organe vasculaire de la lamina terminalis, qui seraient principalement à l'origine de l'innervation angiotensinergique du NTS. L'Ang II résiderait également au niveau du NTS dans certaines populations neuronales localisées dans les parties caudale et intermédiaire de la structure (Krukoff et al., 1992).

Les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont localisés au niveau du NTS. La présence des récepteurs AT<sub>4</sub> reste pour l'instant controversée. L'ARNm codant pour le récepteur AT<sub>1</sub> a été détecté dans le NTS dès le jour embryonnaire E19 (Nuyt et al., 2001) et persiste chez l'adulte (Lenkei et al., 1998). La quantité de cet ARNm augmente après la première semaine postnatale jusqu'à l'âge adulte (Lenkei et al., 1998 ; Nuyt et al., 2001), et ceci de manière concomitante avec la protéine (Tsutsumi et Saavedra, 1991). Chez l'adulte, les récepteurs AT<sub>1</sub> sont situés aux niveaux présynaptique, probablement sur les afférences vagales et carotidiennes (Healy et al., 1989), et postsynaptique, sur des neurones catécholaminergiques et non-catécholaminergiques (Yang et al., 1997). Le récepteur AT<sub>2</sub> a été détecté au niveau du NTS (Wright et Harding, 1995), mais l'absence de l'ARNm codant pour cette protéine suggère que ce récepteur est localisé sur les terminaisons des afférences du NTS.

### **IV-1.2. Le système angiotensinergique au niveau du locus coeruleus (LC)**

L'AOPEN apparaît dans le LC entre le 4<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour de vie postnatale (Mungall et al., 1995) et son ARNm persiste chez l'adulte (Chai et al., 1993). Seuls les astrocytes semblent exprimer l'AOPEN au niveau de cette structure.

L'Ang II détectée au niveau du LC chez le rat adulte proviendrait exclusivement d'une

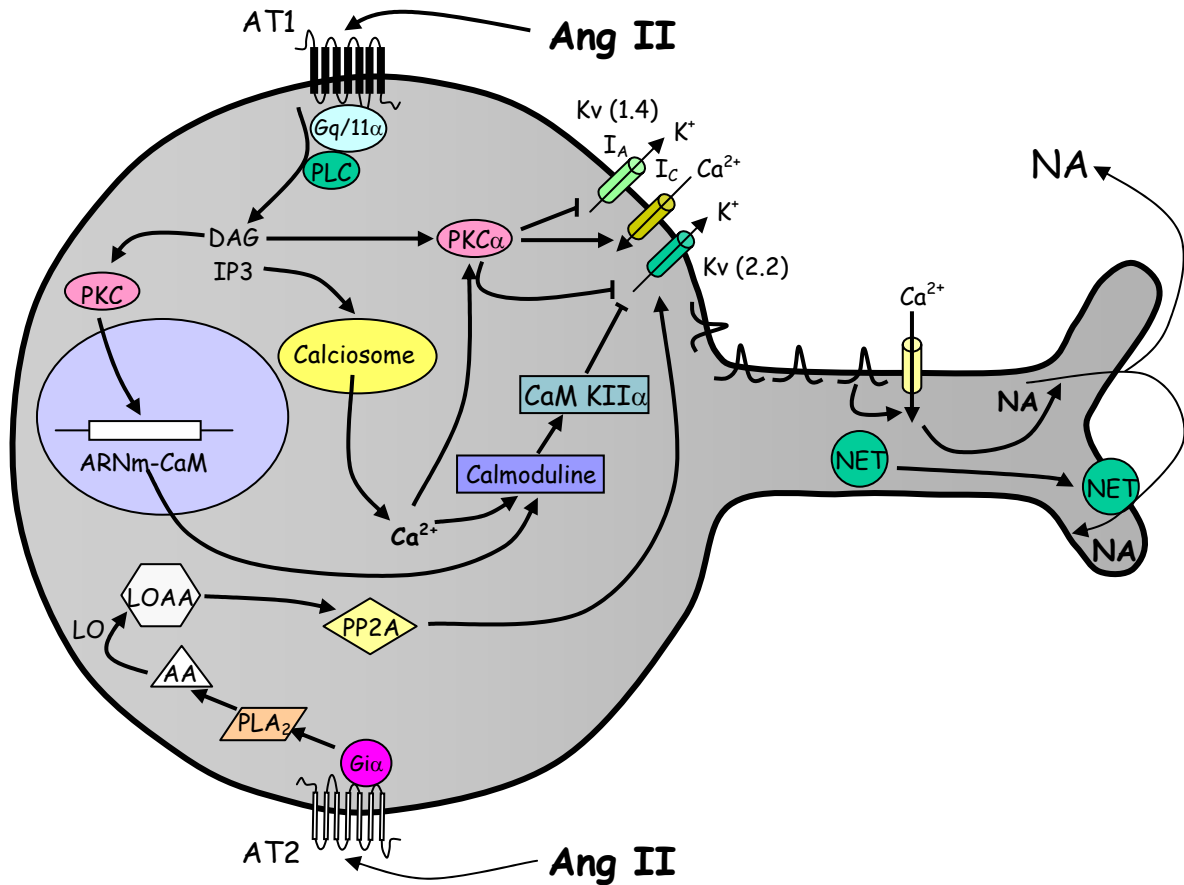
innervation afférente ainsi que de varicosités (Weyhenmeyer and Phillips, 1982 ; Fuxe et al., 1988 ; Lenkei et al., 1997). La concentration en Ang II diminue dans cette structure au cours du développement postnatal (Meyer et al., 1990) et persiste à des taux assez faibles à l'âge adulte (Tableau I-1).

Le LC est une des structures cérébrales contenant le plus de récepteurs AT<sub>2</sub>. Néanmoins, les récepteurs AT<sub>1</sub> (Speth et al., 1991 ; Lenkei et al., 1998) et des sites de liaison à l'Ang IV (von Bohlen und Halbach, 2003) ont été détectés au niveau de ce noyau noradrénergique. L'identité des cellules exprimant les différents récepteurs est cependant très mal connue. L'ARNm codant pour le récepteur AT<sub>2</sub> est observé dans le LC à partir du jour embryonnaire E19. La quantité de cet ARNm augmente après la première semaine postnatale et se stabilise ensuite (Lenkei et al., 1996 ; Nuyt et al., 1999). La concentration en protéine AT<sub>2</sub> dans le LC diminue entre la 2<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine postnatale (Tsutsumi et Saavedra, 1991), et reste stable au-delà (Speth et al., 1991). La présence de ces récepteurs au niveau des neurones noradrénergiques du LC (TH-immunopositifs) est controversée. En effet, des études de lésion de cette structure à l'aide d'une neurotoxine spécifique des neurones catécholaminergiques ont mis en évidence une très forte réduction de la densité globale des sites de liaison à l'Ang II (Rowe et al., 1990). Par ailleurs, le récepteur AT<sub>2</sub> est observé dans la plupart des zones spécifiques de terminaison des neurones noradrénergiques du LC comme le cortex cingulaire, l'hippocampe et le cervelet (Wright et Harding, 1995). De plus, l'injection intracérébroventriculaire d'Ang II augmente chez le rat le taux de renouvellement de la noradrénaline dans le LC (Sumners et al., 1983). Toutefois, l'ARNm-AT<sub>2</sub> n'a pas pu être co-localisé avec la protéine TH au niveau du LC (Nuyt et al., 1999).

#### ***IV-2. Mécanismes intracellulaires mis en jeu dans les effets***

##### ***à court terme de l'angiotensine II***

Les effets à court terme de l'Ang II sur la neurotransmission noradrénergique seraient liés à une modulation de la fréquence de décharge neuronale et une translocation membranaire rapide du transporteur de la noradrénaline (NET) à la surface des neurones. La Figure I-24 présente les différentes voies de signalisation intracellulaires mises en jeu dans les effets à court terme de l'Ang II sur les neurones noradrénergiques en culture.



**Figure I-24 : Voies de signalisation intra-cellulaires mises en jeu dans les effets à court terme de l'angiotensine II sur la neuromodulation noradrénergique.**

Ang II: angiotensine II ; AA : Acide arachidonique ; AT1: récepteur à l'angiotensine II de type 1 ; AT2: récepteur à l'angiotensine II de type 2 ; CaMKII $\alpha$ : Calmoduline-kinase II alpha ; DAG: Diacyl glycérol ; IP3: Inositol-3 phosphate ; LO : Lipoxgénase ; LOAA: Métabolites de l'acide arachidonique ; NA: Noradrénaline ; NET: Transporteur de la noradrénaline ; PKC: Protéine-kinase C ; PLA<sub>2</sub>: Phospholipase A<sub>2</sub> ; PLC: Phospholipase C ; PP2A: Protéine-phosphatase 2A.

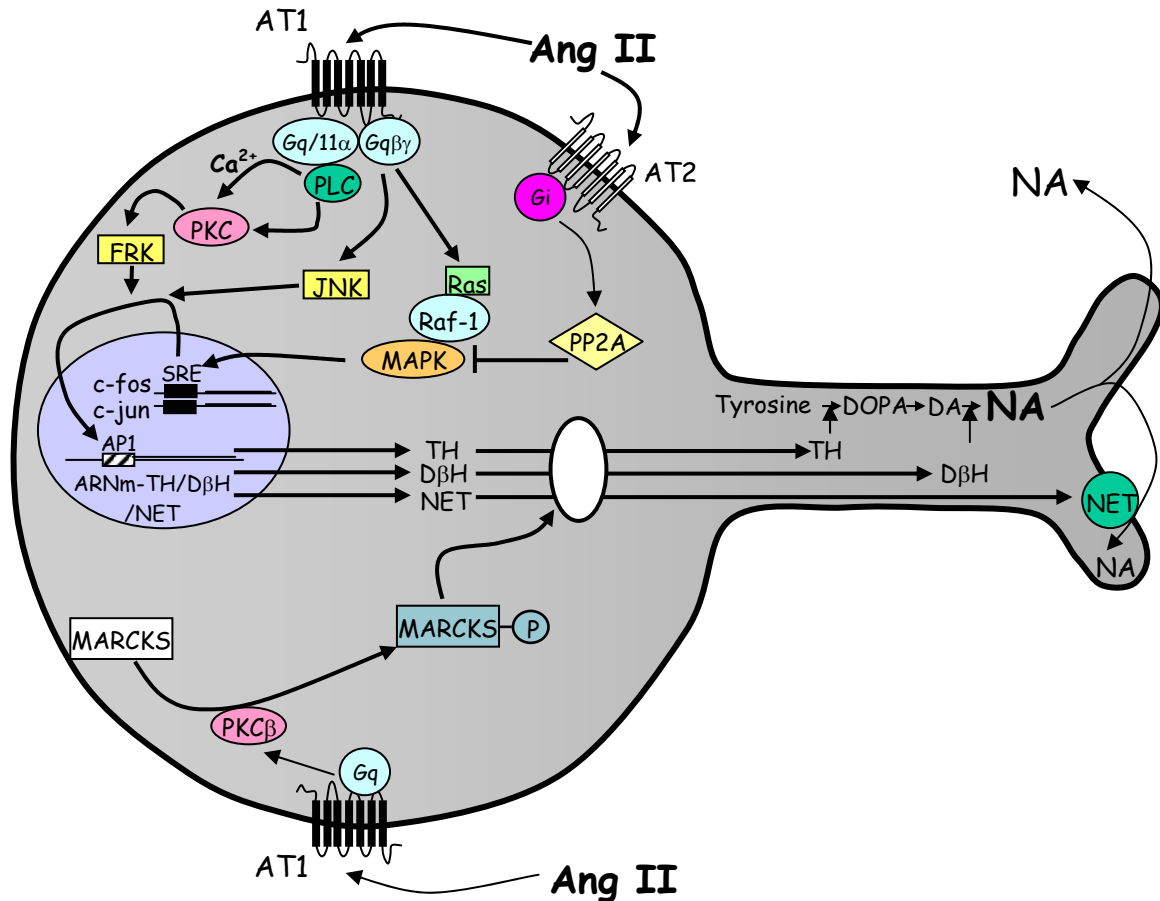
L'interaction entre l'Ang II et son récepteur de type 1 déclencherait une augmentation du taux de décharge au niveau des neurones catécholaminergiques en culture, qui serait consécutive à une diminution des courants potassiques sortants, et en particulier des courants  $I_{kv}$  et  $I_A$ , et à une augmentation du courant calcique entrant  $I_{Ca}$ . La diminution des courants potassiques serait due à la phosphorylation des canaux potassiques par la protéine kinase  $C\alpha$  (PKC $\alpha$ ). Cette enzyme serait activée via une cascade d'évènements impliquant l'activation d'une protéine  $G_{11\alpha}$  associée au récepteur  $AT_1$ , la stimulation de la phospholipase C et la formation consécutive de diacylglycérol (Gelband et al., 1999 ; Zhu et al., 1999 ; Pan et al., 2001 ; Sun et al., 2002). La diminution du courant  $I_{kv}$  impliquerait la calmoduline kinase II  $\alpha$  (Zhu et al., 1999 ; Sun et al., 2002). Cette dernière serait activée via une cascade d'évènements intracellulaires mettant en jeu la stimulation de la protéine  $G_{11\alpha}$ , la formation d'inositol 3-phosphate consécutive à l'activation de la phospholipase C, l'augmentation la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$ , et l'activation de la calmoduline dont la synthèse serait augmentée (Zhu et al., 1999 ; Sun et al., 2002). L'Ang II serait donc susceptible d'augmenter la fréquence de décharge des neurones noradrénergiques par l'activation des récepteurs  $AT_1$ .

L'interaction entre l'Ang II et le récepteurs  $AT_2$ , également exprimés par les neurones noradrénergiques en culture, semble contrebalancer les effets de l'interaction AngII- $AT_1$  sur les courants potassiques sortants. En effet, l'Ang II peut également stimuler les flux potassiques ( $I_{kv}$  et  $I_A$ ) sortants par l'activation d'une protéine de type  $G_{i\alpha}$  couplée aux récepteurs  $AT_2$  et activation de la serine/thréonine phosphatase 2A (PP2A) (Zhu et al., 2001). Dans ce contexte, la PP2A serait activée par certains dérivés de l'acide arachidonique, formés par action de la phospholipase  $A_2$  et des lipoxgénases intracellulaires (Zhu et al., 1998, 2000). Paradoxalement, malgré l'hyperpolarisation membranaire que devrait créer cette augmentation de la sortie de potassium, il semblerait que l'interaction entre l'Ang II et son récepteur de type 2 induise elle aussi une augmentation du taux de décharge des neurones catécholaminergiques en culture (Zhu et al., 2001), vraisemblablement par une voie de signalisation encore non décrite.

### ***IV-3. Mécanismes intracellulaires mis en jeu dans les effets à long terme de l'angiotensine II***

Les effets à long terme de l'Ang II sur la neurotransmission noradrénergique mettraient en jeu une modification de la synthèse de la TH, de la D $\beta$ H et du NET, ainsi que du transport de ces trois protéines vers les prolongements des neurones (Lu et al., 1998 ; Wang et al., 2001 ; Yang et al., 2002). La Figure I-25 présente les différentes voies de signalisations

intracellulaires impliquées dans les effets à long terme de l'Ang II et mises en évidence sur des cultures de neurones noradrénergiques.



**Figure I-25 : Voies de signalisation intra-cellulaires mises en jeu dans les effets à long terme de l'angiotensine II sur la neuromodulation noradrénergique.**

Ang II: angiotensine II ; AT1: récepteur à l'angiotensine II de type 1 ; AT2: récepteur à l'angiotensine II de type 2 ; DβH: Dopamine β hydroxylase ; FRK: Fos receptor kinase ; JNK: Jun NH2 terminal kinase ; MAPK : Mitogen-activated protein kinase ; MARCKS : Myristoylated alanine-rich c-kinase substrate ; NA: Noradrénaline ; NET: Transporteur de la noradrénaline ; PKC: Protéine-kinase C ; PLC: Phospholipase C; PP2A: Protéine-phosphatase 2A ; TH: Tyrosine hydroxylase.

### **IV-3.1. Expression des protéines clés du métabolisme noradrénergique**

L'interaction entre l'Ang II et son récepteur de type 1 induit une augmentation de la synthèse de la TH, de la D $\beta$ H et du NET, qui serait due à la stimulation de l'expression de certains gènes à réponse rapide, ainsi qu'à l'activation de leur activité biologique. En effet, l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun est augmentée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* au niveau des neurones catécholaminergiques après traitement à l'Ang II. L'augmentation de l'expression de ces proto-oncogènes au sein des neurones noradrénergiques serait conséquente à la stimulation de la voie de signalisation Ras-Raf-MAP kinase, résultant de l'activation d'une protéine G de type  $\beta\gamma$  couplée aux récepteurs AT<sub>1</sub> (Huang et al., 1996 ; voir pour revue Gelband et al., 1997 ; Yang et al., 1996 ; Lu et al., 1996 ; Lu et al., 1998). L'ensemble du complexe formé par AT<sub>1</sub>-Ras-Raf-MAP kinase transloquerait dans le noyau et stimulerait l'expression de c-fos et de c-jun (Lu et al., 1996). L'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> par l'Ang II stimule également l'activité de la c-Jun kinase et de la « Fos-regulating kinase » respectivement par activation de protéines G de type  $\beta\gamma$  et de type  $\alpha$  (Huang et al., 1998 ; Summers et al., 2002), augmentant le transport nucléaire de c-fos et c-jun. La stimulation de la « Fos-regulating kinase » mettrait en jeu l'activation d'une PKC sensible au Ca<sup>2+</sup>. Il semble au contraire que l'interaction entre l'Ang II et son récepteur de type 2 inhibe la stimulation de l'expression des protéines clés du métabolisme noradrénergique. En effet, l'activation du récepteur AT<sub>2</sub> stimulerait une protéine de type Gi, qui activerait la PP2A et inhiberait la MAP kinase (Huang et al., 1995, 1996).

### **IV-3.2. Transport neuritique des protéines clés du métabolisme noradrénergique**

Le transport dans les prolongements neuronaux des enzymes impliquées dans le métabolisme noradrénergique est un mécanisme de régulation fondamental, quoique très peu caractérisé, de la neurotransmission noradrénergique. En effet, la disponibilité de ces protéines au niveau des aires de terminaison des neurones intervient dans le contrôle de la libération et la capture de la noradrénaline. Les études réalisées *in vitro* caractérisant les effets de l'Ang II sur la neurotransmission noradrénergique ont mis en évidence que l'interaction entre l'Ang II et son récepteur de type 1 stimule de manière singulière le transport de la TH, de la D $\beta$ H et du NET vers les prolongements neuritiques de neurones noradrénergiques en culture, jusqu'au compartiment synaptique. Le processus activé par l'Ang II met en jeu l'activation de la PKC $\beta$  (Lu et al., 1998). Cette kinase ainsi activée peut phosphoryler un certain nombre de protéines, dont une spécifique, myristoylée et riche en alanine, appelée MARCKS (Lu et al., 1998 ; Yang et al., 2002 ; Wang et al., 2001). Les répercussions

cellulaires qui résultent de la phosphorylation de cette protéine seront plus largement exposées dans le paragraphe IV-5.

#### ***IV-4. Mécanismes intracellulaires mis en jeu dans les effets de l'angiotensine***

##### ***II sur les phénomènes d'apoptose et de différenciation neuronales***

Outre les effets de l'Ang II sur la neurotransmission au sein des neurones noradrénergiques, décrits dans le paragraphe précédent, il semble que l'Ang II soit également impliquée dans la mort cellulaire par phénomène d'apoptose des cellules de type noradrenergique en culture (Yamada et al., 1996 ; Shenoy et al., 1999) et sur la différenciation cellulaire (Stroth et al., 1998 ; Laflamme et al., 1996 ; Coté et al., 1999 ; Yang et al., 2002).

Les effets pro-apoptotiques de l'Ang II seraient consécutifs à l'activation des récepteurs  $AT_2$ , et mettraient en jeu l'inactivation par phosphorylation de la MAP kinase, orchestrée par la PP2A et la protéine-tyrosine phosphatase MKP-1. Néanmoins, ces résultats sont à considérer avec prudence. En effet, l'étude de Grammatopoulos et coll. (2002) indique que l'Ang II, via son récepteur de type 2, possède un effet protecteur sur des neurones corticaux murins en culture engagés dans un phénomène d'apoptose.

L'Ang II semble également promouvoir la différenciation de cellules neuronales en culture, en stimulant la formation de neurites et la migration cellulaire (Stroth et al., 1998 ; Laflamme et al., 1996 ; Coté et al., 1999 ; Yang et al., 2002). Néanmoins, les informations concernant les effets de l'Ang II sur la différenciation neuronale divergent selon les types cellulaires considérés. En effet, la neuro-hormone activerait différents types de récepteurs, selon la lignée cellulaire considérée. L'Ang II stimulerait par son interaction avec les récepteurs  $AT_2$  la différenciation des cellules NG108-15, PC12W et des cellules cérébelleuses en culture (Laflamme et al., 1996 ; Stroth et al., 1998 ; Coté et al., 1999). L'activation de ces récepteurs entraînerait une stimulation de la pousse neuritique, due à une augmentation de la polymérisation de la tubuline, consécutive à une augmentation des taux intracellulaires de protéine MAP2c (microtubule-associated protein 2c). La différenciation des neurones d'hypothalamus et de tronc cérébral en culture induite par l'Ang II serait dépendante de l'activation des récepteurs  $AT_1$  (Yang et al., 2001, 2002). Ce phénomène serait lié à l'activité de la phosphatidylinositol-3 kinase et de la protéine kinase B (Yang et al., 2002).

---

#### ***IV-5. MARCKS : modulateur du transport neuritique***

(voir pour revue Arbuzova et al., 2002)

MARCKS (protéine myristoylée et riche en alanine, substrat de la protéine kinase C : « myristoylated alanine-rich C kinase substrate ») a été impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement cérébral, la migration et l'adhésion cellulaires, l'endo-, l'exo- et la phagocytose. Plus particulièrement, la phosphorylation de la protéine MARCKS serait mise en jeu dans la stimulation de l'adressage neuritique et l'accumulation synaptique de différentes protéines impliquées dans le métabolisme de la noradrénaline (Lu et al., 1998). Ce processus résulterait pour la TH et le NET d'une augmentation du phénomène de transport protéique, et pour la DBH d'une augmentation du phénomène de transport vésiculaire (Yang et al., 2002). Le contrôle qu'exerce la protéine MARCKS sur le transport neuritique des protéines et organelles réside dans le fait que son état de phosphorylation module la viscosité intracellulaire.

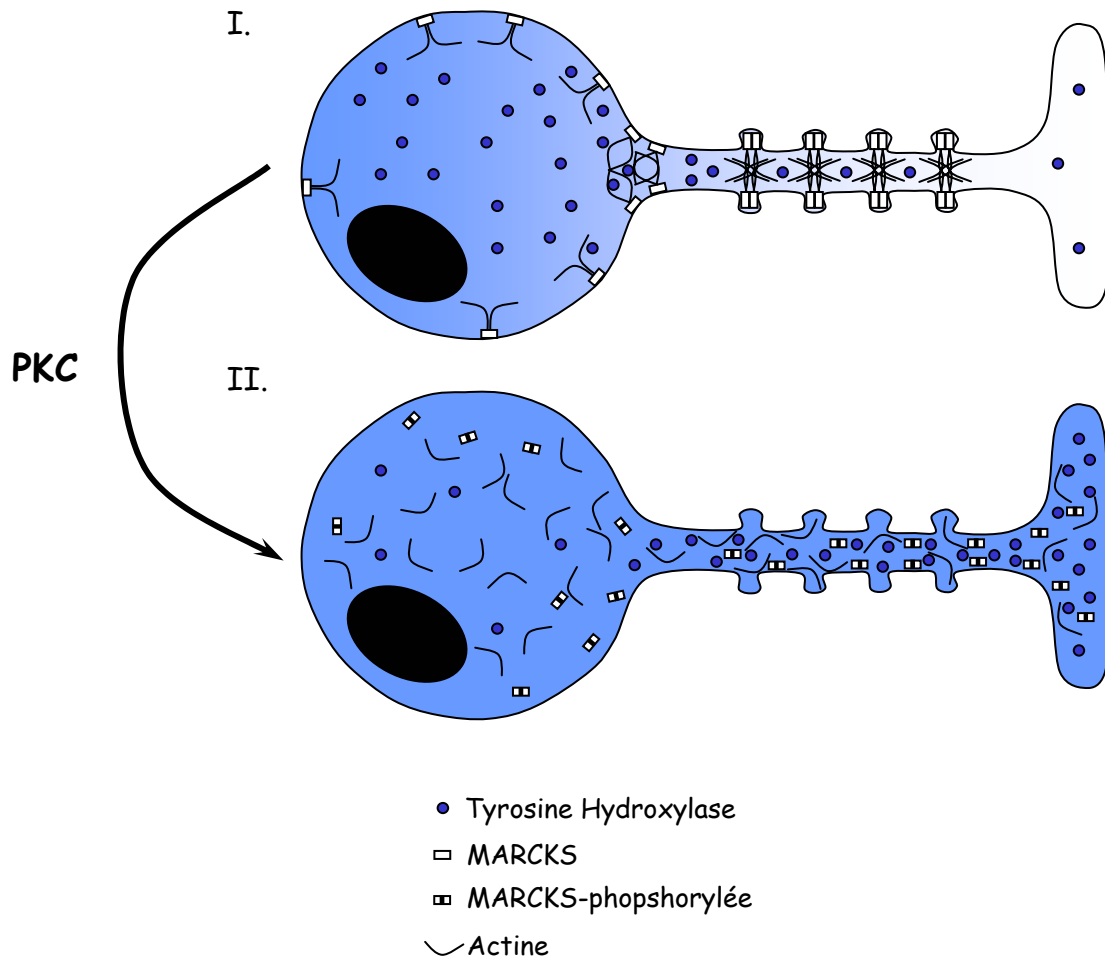
##### **IV-5.1. Structure et localisation intracellulaire de la protéine MARCKS**

MARCKS est un polypeptide de 32 kDa qui fait partie d'une famille restreinte de protéines spécifiquement phosphorylées par la protéine kinase C (Blackshear, 1993 ; Arbuzova et al., 2002). Elle est ubiquitaire et est associée à la face interne de la membrane plasmique des cellules. L'interaction entre la membrane plasmique et la protéine MARCKS dépend de l'intégrité à la fois de son extrémité amino-terminale myristoylée, qui s'insère dans la membrane de manière hydrophobe, et d'un domaine très basique appelé domaine effecteur, interagissant avec la membrane plasmique de manière électrostatique. Ce dernier domaine contient notamment certains résidus sérines (Ser<sup>152</sup>, Ser<sup>156</sup>, Ser<sup>163</sup>), qui sont les cibles de la phosphorylation par la PKC, ainsi qu'un domaine de fixation à la calmoduline. Le domaine effecteur de la protéine MARCKS contient par ailleurs 1 à 2 sites de fixation à l'actine. L'interaction qui existe entre cette protéine cytosquelettique et le domaine effecteur de MARCKS favorise la formation d'un réseau dense d'actine le long de la membrane plasmique.

##### **IV-5.2. Distribution de la protéine MARCKS dans les neurones noradrénergiques**

La protéine MARCKS a pu être détectée au niveau du SNC, à la fois dans les neurones et les astrocytes (Ouimet et al., 1990). Dans les neurones, la protéine serait localisée au niveau des axones, des terminales d'axones et des dendrites. Bien que la présence de MARCKS ait été mise en évidence au niveau de structures catécholaminergiques centrales telles que le NTS et le LC, sa distribution cellulaire n'y a jamais été étudiée. *In vitro*, MARCKS est présente





**Figure I-26 : Schéma hypothétique du mécanisme par lequel la protéine MARCKS module le transport neuritique des protéines dans les prolongements des neurones noradrénergiques.**

I. La protéine MARCKS est présente dans les conditions basales dans les corps cellulaires et les varicosités neuritiques des neurones noradrénergiques. Elle peut lier et stabiliser l'actine grâce à son domaine effecteur. MARCKS permet l'organisation d'un réseau dense et compact d'actine. Ce réseau constituerait notamment une barrière au transport de différentes organelles et protéines dans les prolongements neuritiques, et en particulier de la tyrosine hydroxylase (et du transporteur de la noradrénaline).

II. La phosphorylation du domaine effecteur de MARCKS entraîne un décrochage membranaire de la protéine ainsi que sa dissociation à l'actine. La modification de l'organisation du cytosquelette ainsi créée produit une diminution de la viscosité intracellulaire, et permet aux protéines d'être plus facilement transportées.

---

dans les conditions basales dans les corps cellulaires et les varicosités neuritiques des neurones noradrénergiques (Lu et al., 1998) (Figure I-26, I). La phosphorylation de la protéine MARCKS par la PKC entraîne une redistribution de celle-ci dans les neurites des neurones noradrénergiques en culture (Lu et al., 1998). C'est la phosphorylation des Ser<sup>152</sup>, Ser<sup>156</sup> et Ser<sup>163</sup>, localisées dans le domaine effecteur de MARCKS, qui entraînerait très probablement une neutralisation des charges de ce domaine, et induirait ainsi le décrochage de la protéine à la membrane plasmique.

#### **IV-5.3. Phosphorylation de MARCKS et réorganisation du cytosquelette**

La phosphorylation du domaine effecteur de MARCKS entraîne non seulement un décrochage membranaire de la protéine, mais également sa dissociation à l'actine. Ce processus est caractérisé par une forte diminution de la présence de l'actine au niveau de la membrane plasmique des cellules et par une diminution de la viscosité du cytosquelette. Au niveau des neurones noradrénergiques en culture, il est associé à une forte augmentation du processus de transport neuritique de la TH, de la DBH et du NET (Lu et al., 1998 ; Yang et al., 2002).

La viscosité du cytosquelette est un facteur primordial dans le contrôle du transport des protéines et des organelles intracellulaires. C'est généralement le long de cette véritable « matrice » que sont acheminées ces dernières dans les différents compartiments des cellules. La régulation de l'organisation du cytosquelette permettrait de modifier la composition et la compacité du milieu intracellulaire et ainsi de modifier le processus de transport à la fois des organelles et des protéines telles que la TH (Figure I-26, II).

## *Matériel et Méthodes*

---

## I- ANIMAUX

### *I-1. Maintien des animaux avant le début des expérimentations*

Cette étude a été réalisée sur des rats mâles Sprague Dawley « contrôles » (OFA ; Iffa Credo ; France), ainsi que des rats mâles TGR(ASrAOGEN)680 (de souche parentale Sprague Dawley, élevage INSERM), à différentes étapes de leur développement postnatal. Le jour de naissance des rats est considéré comme étant le jour 0. Les rats dont l'âge était inférieur à 3 semaines, âge limite du sevrage chez le rat, étaient laissés dans les cages avec des femelles nourricières. A partir de P21, les rats ont été répartis dans des cages par groupes de 3-4, avec nourriture et eau *ad libitum*. Les animaux ont été maintenus dans tous les cas à un cycle nyctéméral dont la périodicité imposée était de 12 heures (période lumineuse : 7-19 heures) et à une température de  $23 \pm 1$  °C. Les rats ont été préférentiellement sacrifiés le jour des expérimentations entre 9 heures et 11 heures du matin.

### *I-2. Traitement pharmacologique au NSD-1015*

Des rats contrôles et transgéniques ont été traités (100 mg/kg) au NSD-1015 (3-hydroxybenzylhydrazine dihydrochloride ; Sigma), afin de mesurer l'activité de la protéine TH *in vivo*. Le NSD-1015 est un inhibiteur des décarboxylases des acides aminés L-aromatiques et notamment de la DOPA décarboxylase (DDC), qui permet la décarboxylation de la 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) en dopamine. Chez les rats traités au NSD-1015 par voie intra-péritonéale, une accumulation linéaire de L-DOPA jusqu'à la 30<sup>ème</sup> minute post-injection est observée dans les structures catécholaminergiques (Lachuer et al, 1991). Les rats servant à ces expérimentations ont donc reçu une injection intra-péritonéale unique d'une solution de NSD-1015 puis ont été décapités 20 minutes après l'injection.

## II- PREPARATION DES TISSUS

### *II-1. Prélèvement et préparation des tissus fixés*

Ce paragraphe concerne les rats dont les cerveaux ont servi aux différentes détections immunohistochimiques réalisées au cours de cette étude.

### **II-1.1. Fixation des tissus et prélèvement des cerveaux**

Les rats sont profondément anesthésiés par injection intra-péritonéale (0,4 mg/kg) de pentobarbital sodique (Sanofi), puis sont perfusés par voie intracardiaque (30 mL/min) dans un premier temps durant 2 minutes avec du tampon phosphate salin (PBS) à 0,1M, puis 10 minutes avec une solution froide de paraformaldéhyde (PF) à 4 %, préparée dans du tampon phosphate (PB ; pH 7,4) à 0,1M final. Les rats sont ensuite décapités, puis les cerveaux sont rapidement prélevés et post-fixés dans une solution de PF 4% à 4 °C pendant 2 heures. Les cerveaux sont ensuite déshydratés pendant 48 heures dans une solution de saccharose préparée dans du PB 0,1M final, à 20 % pour les cerveaux des rats P1 à P3 et 25 % pour les autres cerveaux. Ils sont ensuite congelés dans de l'isopentane à -35 °C pendant 1 minute pour les cerveaux des rats P2 à P4, et à -40 °C pendant 1 minute et 15 secondes pour les autres cerveaux. Ils sont ensuite stockés dans un congélateur à -80 °C jusqu'à la coupe.

### **II-1.2. Coupes des cerveaux perfusés**

Des coupes coronales de 25 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica) dans la région du LC (coordonnées interaurales (IA) -1,52 à -0,60 mm), du NTS (IA -5,30 à -2,80 mm), de l'hippocampe (IA +5,20 à + 6,70 mm), du cortex (IA +9,70 à 10,70 mm), de la substance noire (IA +2,96 à 4,20 mm). Les coupes sélectionnées pour subir les protocoles de marquages immunohistochimiques sont espacées de 100 µm au niveau du LC, de 200 µm au niveau du NTS, de l'hippocampe, de la substance noire et du cortex, et de 400 µm au niveau de la substance noire. La première coupe de chaque plan est prélevée sur lamelle gélatinée (1% de gélatine) avant d'être colorée au crésyl violet afin de repérer les structures présentes dans les différents niveaux anatomiques (cf paragraphe III.2.2.). Les autres coupes sont récupérées dans des puits de plaques en plastique contenant du tampon PBS 0,1 M et 0,05 % d'azide de sodium. Ces coupes récupérées « en flottante » sont conservées au réfrigérateur à 4 °C.

## ***II-2. Prélèvement et traitement des tissus frais***

Cette partie du protocole concerne les animaux dont les tissus ont été par la suite traités afin de doser les concentrations tissulaires en catécholamines, la quantité de protéine TH et la quantité d'ARN d'intérêt.

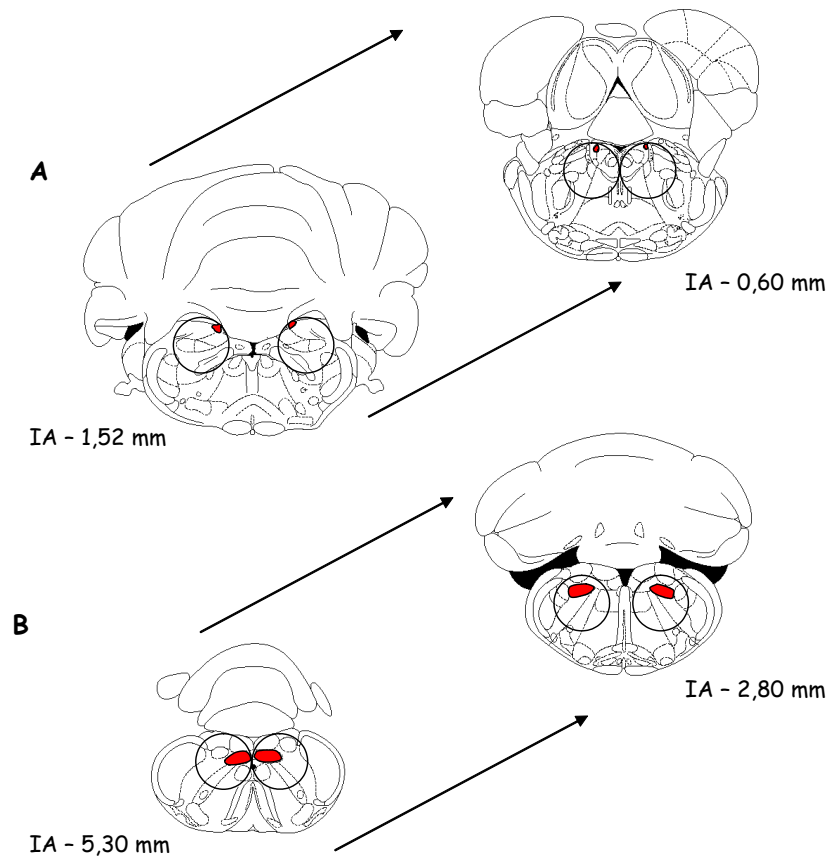
### **II-2.1. Prélèvement des cerveaux et microdissection des structures d'intérêt**

Les rats sont décapités puis les cerveaux sont prélevés sur la glace et congelés dans de l'isopentane à -35 °C pendant 1 minute pour les cerveaux des rats âgés de 1 à 4 semaines, et 1

minute et 15 secondes pour les autres cerveaux. Ils sont ensuite stockés dans un congélateur à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à microdissection des structures d'intérêt. Des coupes coronales des cerveaux d'une épaisseur de  $500\text{ }\mu\text{m}$  environ sont réalisées le long de l'axe antéro-postérieur à l'aide d'un microtome (Leica), recueillies sur des lames en verre et conservés sur une plaque de fer refroidie à l'aide de carboglace. Une fois les coupes coronales d'un cerveau entier réalisées, les structures d'intérêt sont disséquées bi-latéralement à l'aide d'une aiguille emporte-pièce de  $2\text{ mm}$  de section (Figure II-1). Les repères anatomiques permettant la localisation des différentes structures sur les coupes coronales sont les mêmes pour chaque cerveau et à chaque âge. Les tissus collectés pour une structure entière sont ensuite déposés dans des tubes eppendorfs de  $1,5\text{ mL}$  tarés, puis congelés immédiatement dans de l'azote liquide et stockés dans un congélateur à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

Le NTS des rats a été prélevé sur les coupes de cerveau à partir de l'Obex (coordonnées interaurales IA  $-5,30\text{ mm}$  ; Atlas de Paxinos et Watson, Paxinos and Watson, 1998) sur  $2\text{ }000\text{ }\mu\text{m}$ .

Le LC a été prélevé sur  $1500$  (1 semaine) à  $2000$  (2 à 12 semaines)  $\mu\text{m}$  à partir IA  $-1,52\text{ mm}$ .



**Figure II-1 : Microdissection des structures cérébrales d'intérêt par la méthode de punch**

Le locus coeruleus (A), et le noyau du faisceau solitaire (B) ont été micro-disséqués sur des coupes de tissu frais d'environ  $500\text{ }\mu\text{m}$  d'épaisseur, par une technique d'emporte-pièce à l'aide d'une aiguille dont le diamètre est de  $2\text{ mm}$ . IA : Coordonnées interaurales.

## II-2.2. Préparation des homogénats de tissu frais

40  $\mu\text{L}$  d'eau stérile dépourvue d'activité RNAsique ont été ajoutés dans chacun des tubes contenant les tissus cérébraux prélevés. Les tissus ont ensuite été homogénéisés par sonication sur de la glace pendant 30 à 45 secondes, centrifugés quelques secondes afin de récolter les gouttes formées sur les parois des tubes, puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. Pour les échantillons servant à l'étude de l'activité TH *in vivo*, les tissus ont été repris dans 100  $\mu\text{L}$  d'un tampon contenant 0,1 M d'acide perchlorique et 0,4M d'EDTA. Les tissus ont ensuite été homogénéisés par sonication des tubes à 20 000 Hz dans un bain de glace. Les tubes ont été conservés sur la glace et traités le jour même de la dissection.

## II-2.3. Préparation des échantillons avant les différents dosages

Les homogénats tissulaires servant à l'étude développementale ont été décongelés puis répartis dans trois tubes qui serviront à réaliser les différents dosages :

- 5  $\mu\text{L}$  de chaque homogénat ont été prélevés afin d'en extraire les catécholamines. Ces aliquots d'homogénat sont mélangés à 100  $\mu\text{L}$  d'un tampon contenant 0,1 M d'acide perchlorique et 0,4M d'EDTA. Les tubes sont ensuite soniqués à 20 000 Hz dans un bain de glace et centrifugation (6 minutes à 8 800 x g). Le surnageant ainsi formé dans les tubes, contenant notamment les catécholamines, est prélevé et congelé dans de la carboglace, puis conservé à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

- 15  $\mu\text{L}$  de chaque homogénat sont prélevés afin d'en extraire les protéines solubles totales. Ces aliquots sont mélangés à 35  $\mu\text{L}$  de tampon  $\text{K}_2\text{K}$  (5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; pH 6) contenant 0,2 % de Triton X-100 ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, mini ; Boehringer Mannheim). Les tubes sont ensuite centrifugés à 13 000 x g pendant 20 minutes à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  et les surnageants, contenant les protéines solubles totales, sont prélevés et déposés dans des epi-tubes de 500  $\mu\text{L}$ . La concentration en protéines solubles totales est mesurée dans chacun des échantillons par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Les tubes sont ensuite stockés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

- 25  $\mu\text{L}$  de chaque homogénat sont prélevés afin d'en extraire les ARN totaux.. Ces aliquots d'homogénat sont dans un premier temps mélangés à 230  $\mu\text{L}$  d'eau distillée dépourvue d'activité RNAsique. Ensuite, 750  $\mu\text{L}$  de Trizol LS (Gibco) sont ajoutés au mélange, puis les tubes sont vortexés. 200  $\mu\text{L}$  de chloroforme sont ajoutés dans les tubes, qui

sont ensuite centrifugés à 12 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. La phase aqueuse contenue dans ces tubes est prélevée et 500 µL d'isopropanol y sont ajoutés. Les tubes contenant ce mélange sont centrifugés pendant 30 minutes à 15 000 x g à 4 °C. Le surnageant est éliminé et les culots d'ARN totaux contenus au fond des tubes sont lavés par ajout d'éthanol à 75 % et centrifugation légère à 7 500 x g pendant 10 minutes à 4 °C. Les culots sont par la suite séchés à 37 °C, solubilisés dans 20 µL d'eau distillée stérile ne contenant pas d'activité RNAsique et stockés à -80 °C. Avant la congélation, une petite fraction de chaque échantillon est prélevée et diluée dans de l'eau stérile afin de doser la concentration en ARN totaux. Cette dernière est calculée par la formule suivante : Concentration en ARN (ng/µL) = Absorbance à 260nm x 40 x facteur de dilution.

En ce qui concerne les échantillons tissulaires servant à l'étude de l'activité TH *in vivo*, les homogénats tissulaires sont centrifugés pendant 6 minutes à 8 800 x g. Le surnageant ainsi formé dans les tubes est prélevé et congelé dans de la carboglace, puis conservé à -80 °C jusqu'à utilisation.

### **III- PROCEDURES EXPERIMENTALES**

#### ***III-1. Détections immunohistochimiques***

##### **III-1.1. Coloration au crésyl violet**

Les coupes de cerveaux perfusés récupérées au début de chaque plan et pour chaque structure d'intérêt sont colorées au crésyl violet. Cette coloration permet non seulement d'estimer l'intégrité du tissu cérébral après la coupe, mais aussi d'observer sur chaque coupe différents repères anatomiques permettant de les situer le long de l'axe caudo-rostral. Ces repères permettent notamment de recalibrer les plans sélectionnés pour chaque structure cérébrale étudiée entre les différents cerveaux récoltés. Les lamelles gélatinées portant les coupes sont plongées dans une solution de crésyl-violet-acétate (Crésyl-violet ; Merck) à 0,5 % poids/volume, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na 12,2 mM, pH 3,5), puis sont déshydratées par passages successifs dans des bains d'éthanol à 50, 70, 95 et 100 %, délipidées par passage dans un bain de xylène, et montées entre lamelles dans du milieu histologique (DPX, Sigma).



---

### **III-1.2. Détection immunohistochimique de la protéine TH**

Des coupes de cerveau, réalisées au niveau des noyaux cérébraux d'intérêt, ont été traitées pour la détection de la protéine TH à l'aide d'un protocole d'immunohistochimie à révélation colorimétrique, ainsi que pour la double détection des protéines TH et MARCKS à l'aide d'un protocole d'immunohistochimie à révélation fluorescente.

#### **III-1.2.1. Détection simple sur coupes de cerveaux perfusés**

Toutes les incubations ont été réalisées à température ambiante. Les coupes flottantes ont été rincées 3 fois 10 minutes dans du tampon PBS 0,1M contenant 0,3 % de Triton X-100 (PBS-T), puis incubées pendant 1 heure dans le même tampon contenant 1 % de sérum normal de cheval (PBS-T-H). Ensuite, les coupes ont été incubées à 4 °C durant 18 heures dans une solution d'anticorps monoclonal de souris anti-TH de rat (Boehringer # 1 017 381; concentration de la solution mère : 40 µg/mL) dilué au 1:1000 dans du PBS-T-H. Le jour suivant, les coupes ont été rincées (3 fois 10 minutes) dans du tampon PBS-T, puis incubées durant 1 heure et 30 minutes dans une solution d'anticorps biotinylé de cheval anti-IgG de souris (Vector ; concentration de la solution mère : 0,5 mg/mL) dilué au 1:1000 dans du tampon PBS-T-H. Puis, les coupes ont été rincées dans du tampon PBS-T et incubées pendant 1 heure et 30 minutes dans une solution de complexe avidine-biotine couplé à la peroxydase (Vector), dilué au 1:500 (volume/volume) dans du tampon PBS-T. A la fin de cette étape, les coupes ont été rincées 3 fois 10 minutes dans du tampon PBS-T et la peroxydase a été révélée dans une solution de diaminobenzidine (SigmaFast). Le temps de révélation dépend de la montée du signal et a été fixé pour les différentes structures. Les coupes ont été rincées dans du tampon PBS 0,1M, puis montées sur lamelles gélatinées (1 %) et séchées à température ambiante. Enfin, elles ont été déshydratées par bains successifs dans de l'éthanol à 50, 70, 95 et 100 %, délipidées par passage dans un bain de xylène, puis montées entre lamelles dans un milieu histologique (DPX, Sigma).

#### **III-1.2.2. Double détection immunohistochimique des protéines TH et phospho-MARCKS sur coupes de cerveaux perfusés**

Les coupes flottantes ont été rincées 3 fois 10 minutes dans du tampon PBS-T, puis incubées durant 1 heure dans le même tampon contenant 2 % de sérum normal d'âne (PBS-T-D), et durant 48 heures à 4 °C dans une solution d'anticorps monoclonal de souris anti-TH de rat (Boehringer # 1 017 381; concentration de la solution mère : 40 µg/mL) et d'anticorps de chèvre anti-phospho-MARCKS (Ser 159/163) (Santa Cruz ; concentration de la solution mère : 200 µg/mL) respectivement dilués au 1:1000 et au 1:250 dans du PBS-T-D. Les coupes

ont été rincées (3 fois 10 minutes) dans du tampon PBS-T. La suite des différentes étapes s'est déroulée à l'abri de la lumière. Les coupes ont été incubées durant 24 heures à 4°C dans une solution d'anticorps d'âne anti-IgG de souris couplé à l'Alexa fluor 488 (Molecular Probes ; concentration de la solution mère : 2 mg/mL) et d'anticorps de lapin anti-IgG de chèvre couplé à la cyanine 3 (Sigma ; concentration de la solution mère : 1 mg/mL) respectivement dilués au 1:1000 et au 1:300 dans du tampon PBS-T-D. Les coupes ont été rincées dans du tampon PBS-T (1 fois 10 minutes), dans du tampon PBS (2 fois 10 minutes), et enfin dans de l'eau courante (1 fois 10 minutes). Les coupes ont ensuite été montées sur lames en verre (SuperFrost Plus), séchées à température ambiante, puis montées entre lame et lamelle dans un milieu histologique adapté à la fluorescence (Prolong Gold Antifade ; Molecular Probes).

### **III-1.3. Détections immunohistochimiques de la GFAP et de MAP2**

Des coupes adjacentes de cerveau, réalisées au niveau des noyaux cérébraux d'intérêt, ont été traitées pour les détections des protéines GFAP et MAP2 à l'aide d'un protocole d'immunohistochimie à révélation colorimétrique.

Les coupes flottantes ont été rincées 3 fois 10 minutes dans du tampon PBS 0,1M contenant 0,3 % de Triton X-100 (PBS-T), puis incubés pendant 1 heure dans le même tampon contenant 1 % de sérum normal de cheval (PBS-T-H) pour les coupes servant à la détection de MAP2 et dans du tampon contenant 1 % de sérum normal d'âne pour les coupes servant à la détection de la GFAP. Les coupes ont été ensuite incubées 48 heures dans une solution d'anticorps monoclonal de souris anti-MAP2 de rat (Sigma) dilué au 1:6000 dans du PBS-T-H ou dans une solution d'anticorps polyclonal de lapin anti-GFAP de rat (Chemicon) dilué au 1:2000 dans du PBS-T-D. Les coupes ont été à nouveau rincées (3 fois 10 minutes) dans du tampon PBS-T, puis incubées durant 1 heure et 30 minutes soit (pour MAP2) dans une solution d'anticorps biotinylé de cheval anti-IgG de souris (Vector) dilué au 1:750 dans du tampon PBS-T-H, soit (pour GFAP) dans une solution d'anticorps biotinylé d'âne anti-GFAP de lapin (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1:1000. Les coupes ont été par la suite rincées à nouveau dans du tampon PBS-T puis incubées pendant 1 heure et 30 minutes dans une solution de complexe avidine-biotine couplé à la peroxydase (Vector), dilué au 1:500 (volume/volume) dans du tampon PBS-T. Les coupes ont été ensuite rincées 3 fois 10 minutes dans du tampon PBS-T et la peroxydase a été révélée par passage des coupes dans une solution de diaminobenzidine (SigmaFast). Le temps de révélation dépend de la montée du signal et a été fixé pour les différentes structures. Les coupes ont été ensuite rincées dans du tampon PBS 0,1M, puis montées sur lamelles gélatinées (1 %) et séchées à température

ambiante. Elles ont été pour finir déshydratées par passage dans des bains d'éthanol de concentration croissante (50, 70, 95 et 100 %), délipidées par passage dans un bain de xylène, puis montées entre lamelles dans un milieu histologique (DPX, Sigma).

### ***III-2. Dosage neurochimique des catécholamines***

#### **III-2.1. Principe de la technique de chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection électrochimique (HPLC-ED)**

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique basée sur le mouvement des molécules entraînées dans une phase liquide mobile propulsée par une pompe. Ces molécules sont ensuite séparées par polarité inverse lors de leur passage dans une colonne, dans notre cas composée par une phase stationnaire de silice greffée à des groupements alkyls (C<sub>4</sub> à C<sub>8</sub>), en fonction de la force de leur interaction avec la phase stationnaire, qui dépend directement de leur charge ionique.

Un détecteur est placé à la fin de la chaîne de chromatographie, à la sortie de la colonne. Ce dernier est composé de 3 électrodes : une électrode de référence (Ag<sup>+</sup>/AgCl), une électrode de travail en carbone vitreux, chargée d'oxyder les molécules qui sortent de la colonne, et une électrode auxiliaire. Une différence de potentiel (+ 0,67 V) règne de manière stable entre les électrodes de référence et de travail, qui permet l'oxydation des molécules qui traversent le détecteur. Ainsi, les noyaux catéchols des catécholamines et de la L-DOPA, qui possèdent des groupements hydroxyles facilement oxydables, sont transformés à la sortie de la colonne d'HPLC en noyaux orthoquinone. Cette oxydation libère des protons et des électrons qui modifient la tension au niveau de l'électrode auxiliaire, de manière proportionnelle à la quantité de composés oxydable présents dans la chambre de mesure. Le courant ainsi généré est transcrit en un tracé dont les inflexions et déflexions sont traitées au niveau d'un intégrateur sous forme de surface ou de hauteur de pics.

#### **III-2.2. Etalonnage de la chaîne de chromatographie**

Un étalonnage de la détection des catécholamines a été réalisé en faisant passer dans la colonne de chromatographie un standard constitué par un mélange de noradrénaline, adrénaline, dopamine (100 pg chacun) préparé dans une solution d'acide perchlorique à 0,1 M et d'EDTA à 0,4 M. Ce standard permet d'une part de mesurer et de fixer le temps de rétention des différentes molécules à doser, et d'autre part d'étalonner l'intensité de la détection/la hauteur des pics.

### **III-2.3. Quantification de la noradrénaline**

Pour l'étude de la mise en place ontogénique des concentrations tissulaires de noradrénaline, des aliquots de 15 µL des surnageants obtenus comme décrit précédemment (cf. paragraphe III-2.3) sont injectés sur une colonne montée en phase inverse (Spherisorb ODS-2,5 µm, 125 x 4 mm) et sont éluées dans une phase mobile constituée de 50 mM d'acide citrique, 50 mM d'acétate de sodium, 1 mM d'EDTA, 437 mM d'acide acétique, 4,3 mM de sulfonate d'octane et de 4 % de méthanol, sous un débit imposé de 0,9 mL/min.

### ***III-3. Détection immunoautoradiographique de la protéine TH***

La protéine TH est dosée dans les échantillons de protéines solubles par la technique de dot-blot mise au point par Haycock (1989) et développée dans différents travaux (Bourde et al, 1993 ; Schmitt et al, 1992, 1993a,b,c). Cette méthode permet le dosage immunochimique des protéines natives non dénaturées. Elle est rapide, sensible et permet le dosage successif de nombreux échantillons. Néanmoins, elle ne peut être utilisée qu'avec des anticorps monoclonaux ou des anticorps polyclonaux monospécifiques pour lesquels une seule bande est observée en Western Blot. Cette condition est essentielle à la réalisation de cette technique, étant donné qu'elle ne permet pas de discriminer les différentes protéines contenues dans les échantillons. Les différentes validations de cette technique, ainsi que les conditions de concentrations en anticorps anti-TH et en protéine A radiomarquée à l'iode 125 [<sup>125</sup>I] ont été fixées dans les études réalisées par Bourde et coll et Schmitt et coll.

#### **III-3.1. Etalonnage du marquage immunoautoradiographique**

L'étalonnage du marquage immunoautoradiographique de la protéine TH a été réalisé en utilisant une gamme de standards de concentrations croissantes en protéine TH. Cette gamme a été réalisée en diluant des échantillons de protéines solubles totales extraites d'homogénats de glandes surrénales (riches en TH) avec des échantillons de protéines solubles totales extraites d'homogénats de cervelet (pauvre en TH). L'homogénat de glandes surrénales a été préparé à partir de glandes surrénales dégraissées, broyées et homogénéisées (20 % poids/volume) dans du tampon K<sub>2</sub>K contenant 0,2 % de Triton X-100. Les homogénats ont ensuite été ultra-centrifugés à 100 000 x g pendant 30 minutes à 4 °C et le surnageant a été recueilli. L'homogénat de cervelet est préparé selon le même protocole. A partir de ces deux homogénats, une série de dilutions en cascade de l'homogénat de glande surrénale dans l'homogénat de cervelet permet de faire varier la concentration en protéine TH, sans faire varier la concentration en protéines totales. Différents standards de la quantité de TH sont ainsi obtenus : 100 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,12 - 1,56 et 0 % d'homogénat d'origine

surrénalienne. 1  $\mu\text{L}$  de chaque standard ont été déposés sur chaque membrane de nitrocellulose ayant servi à la détection immunoautoradiographique de la TH dans les extraits tissulaires des structures cérébrales d'intérêt.

### **III-3.2. Immunoautoradiographie**

Après décongélation, 1,5  $\mu\text{L}$  de chacun des échantillons ont été déposés directement sur une membrane de nitrocellulose (Biorad ; diamètre de pore : 0,2  $\mu\text{m}$ ). La membrane est incubée dans un premier temps dans du tampon Tris salin 50 mM (TBS 50 mM) contenant 2 % d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 30 minutes, afin de saturer les sites de fixation non spécifiques de l'anticorps primaire. La membrane a ensuite été incubée pendant une nuit à température ambiante dans une solution d'anticorps monoclonal de souris anti-TH de rat (Boehringer # 1 017 381 ; concentration de la solution mère : 40 ng/ $\mu\text{L}$ ) dilué au 1:3 000 dans du tampon TBS-2% BSA. Le jour suivant, la membrane a été rincée 5 fois dans du tampon TBS, puis incubée pendant 2 heures dans une solution de [ $^{125}\text{I}$ ]-protéine A (Amersham ; activité spécifique : 30 mCi/mg) diluée au 1:1000 dans du tampon TBS-2% BSA. La protéine A radiomarkée permet de révéler la présence du complexe antigène-anticorps étant donné qu'elle reconnaît les fragments Fc des immunoglobulines G. La membrane a enfin été rincée 6 fois dans du tampon TBS, 1 fois dans du tampon TBS 500 mM, 1 fois dans de l'eau distillée, puis séchée. Elle est ensuite apposée directement à une plaque de cristaux sensibles aux radiations (Molecular Dynamics). La plaque est ensuite révélée grâce à un phosphorimager (Molecular Dynamics) après 12 heures d'exposition.

### ***III-4. Quantification relative des ARN par RT conventionnelle et PCR en***

#### ***« point final »***

Les détections des ARNm codant pour la TH et la GFAP et de l'ARN antisens de l'AOPEN, et la quantification de leur concentration, ont été réalisées au niveau des structures d'intérêt au cours du développement à l'aide de la technique de RT-PCR. La RT (reverse transcription) consiste en la transcription inverse des ARNm en ADNc, ces derniers étant ensuite amplifiés grâce à la technique de PCR (polymerase chain reaction) pour quantification. Pour être fiable, la quantification des ARNm par RT-PCR doit essentiellement tenir compte des différences relevant de la variabilité inter-échantillons de la réaction de RT. Afin de corriger ces différences, un gène interne, dont l'expression est considérée comme invariante dans les différents paradigmes expérimentaux, est choisi comme « calibrateur » de la réaction. Ainsi, l'ensemble des quantifications relatives à un ARN donné (GFAP, TH,

ARN-antisens) sont corrigées par ce « calibrateur » interne. Le gène « calibrateur » choisi pour notre étude est un gène, dit de ménage, codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Ce gène est considéré comme étant invariant au cours du développement.

#### **III-4.1. Purification des ARN totaux**

Avant de subir l'étape de transcription inverse, les échantillons d'ARN totaux se doivent d'être exempts de toute contamination potentielle en ADN génomique. Dans cette optique, les échantillons d'ARN totaux ont été dans, un premier temps, tous dilués à la même concentration finale, correspondant à la concentration de l'échantillon le moins concentré. Ensuite, les échantillons ont été traités avec 2 unités de désoxyribonucléase I « amplification grade » (Invitrogen) à 25 °C pendant 15 minutes. La réaction de digestion de l'ADN est stoppée par ajout de 2 µL d'EDTA à 25 mM et passage des tubes à 65 °C pendant 10 minutes. Les tubes sont ensuite congelés et stockés à - 80 °C.

#### **III-4.2. Transcription inverse**

La phase de transcription inverse des ARN totaux en ADN a été réalisée selon les conseils du manufacturier sur 200 ng d'ARN totaux pour chaque échantillon, à l'aide de la transcriptase inverse SuperScript II RT (Invitrogen). La réaction de transcription inverse s'est déroulée pendant 1 heure à 42 °C en présence d'un mélange (rapport 1:4) d'amorces aléatoires (Invitrogen) et nucléotides oligo(dT)<sub>15</sub> (Invitrogen), et de 0,5 mM de désoxy nucléotides tri-phosphates (Promega). Une seconde série de transcriptions inverses des échantillons a été réalisée afin de ne sélectionner que l'ARN-Antisens. Elle s'est déroulée en présence d'une amorce spécifique de cet ARN: 5' ATA GCT GTG CTT GTC TGG GC 3' (Schinke et al, 1999). La réaction de transcription inverse est stoppée par incubation des échantillons à 95 °C pendant 5 minutes.

#### **III-4.3. Amplification des ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

##### **III-4.3.1. Choix des amorces**

Les différents couples d'amorces (Tableau II-1) ont été synthétisés par les laboratoires Eurobio. Leurs séquences ont été choisies à l'aide du logiciel en ligne « Primer 3 » (NIH ; <http://www.basic.nwu.edu>), en tenant compte des critères de sélection suivants : 1) minimisation des complémentarités internes aux séquences des amorces afin d'éviter la

ADNc amplifié	Amorces	Position sur la séquence d'ADNc	Taille de l'amplicon (paires de bases)	Référence Genbank
<b>Antisens de l'AOPEN</b>	<b>Amorce sens</b> 5' CGC AGG TGC TCT TGC TGT AG 3' <b>Amorce antisens</b> 5' ATA GCT GTG CTT GTC TGG GC 3'	13-32 218-237	225	* Schinke et al., 1999
<b>DBH</b>	<b>Amorce sens:</b> 5' CGA AAT CTG GAA TCC GCA TCT 3' <b>Amorce antisens:</b> 5' TCA TTG CCG AAC CGG TTT ACT 3'	1214-1234 1569-1589	376	L12407
<b>TH</b>	<b>Amorce sens:</b> 5' ACT GTC CGC CCG TGA TTT TC 3' <b>Amorce antisens:</b> 5' TCC CCA TTC TGT TTA CAT AGC CC 3'	893-912 1142-1165	273	M10244
<b>GAPDH</b>	<b>Amorce sens</b> 5' GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA 3' <b>Amorce antisens</b> 5' GCC ATG CCA GTG AGC TTC CC 3'	336-355 741-760	425	X02231.1
<b>GFAP</b>	<b>Amorce sens</b> 5' TAG CTA CAT CGA GAA GGT CC 3' <b>Amorce antisens</b> 5' AAG AAC TGG ATC TCC TCC TC 3'	262-281 599-618	357	RNU03700
<b>MAP2</b>	<b>Amorce sens:</b> 5' CCC AAG AAC CAA CAA GAT GAA 3' <b>Amorce antisens:</b> 5' AAT CAA GGC AAG ACA TAG CGA 3'	1921-1941 2230-2250	310	NM_013066.1
<b>NET</b>	<b>Amorce sens:</b> 5' TTG CTA TGC CTG ATG GTC GTT 3' <b>Amorce antisens:</b> 5' AAA TCC AGC TCC CAG GGA AAA 3'	754-774 991-1011	258	AB021970
<b>TH</b>	<b>Amorce sens</b> 5' ACT GTC CGC CCG TGA TTT TC 3' <b>Amorce antisens</b> 5' TCC CCA TTC TGT TTA CAT AGC CC 3'	893-912 1143-1165	273	M10244

Tableau II-1 : Séquences des amorces nucléotidiques utilisées dans le cadre de l'amplification par PCR des gènes d'intérêt.

formation d'épingles à cheveux, 2) minimisation des complémentarités intrinsèques à l'extrémité 3'OH de chaque amorce afin d'éviter l'« auto-dimérisation » et 3) minimisation maximale des complémentarités entre les amorces et en particulier au niveau de leur extrémité 3'OH. Idéalement, les amorces ne doivent pas dimériser afin d'éviter de diminuer leur disponibilité durant l'amplification des ADN cibles.

#### **III-4.3.2. Etalonnage de la réaction d'amplification par la méthode en « point final »**

L'accumulation des ADN par la technique de PCR suit une loi exponentielle pendant un nombre assez court de cycles d'amplification, phase durant laquelle la quantité d'ADN formé est proportionnelle à la quantité initiale d'ADN, puis est soumise à un phénomène de saturation. Afin de pouvoir réaliser des quantifications d'ADN fiables dans nos différents échantillons, nous nous devons de nous placer pour chacun des gènes étudiés dans cette phase d'accumulation proportionnelle d'ADN. Dans cette optique, nous avons procédé à un étalonnage préalable de la réaction de PCR, en étudiant l'accumulation de chaque ADN en fonction du nombre de cycles d'amplification. Ainsi, un nombre de cycles correspondant au point le plus précoce de la phase d'accumulation exponentielle des ADN a été fixé pour chaque gène.

#### **III-4.3.3. Amplification des ADN d'intérêts**

La réaction d'amplification a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur (Biometra T Gradient) dont les variations de température sont produites par effet Pelletier. La synthèse des ADNc d'intérêt et de l'ADN-Antisens de l'angiotensinogène a été réalisée à l'aide de l'ADN polymérase Platinum Taq polymérase (Invitrogen) en présence d'un mélange de désoxy nucléotides tri-phosphate (Invitrogen). Les séquences nucléotidiques utilisées afin d'amorcer la synthèse des ADN au cours de la réaction d'amplification sont spécifiques des gènes d'intérêt. Ces séquences, ainsi que le résumé des différentes conditions d'amplification utilisées, sont rapportés dans le tableau II-2. Le dixième du volume du produit de transcription inverse a été utilisé pour l'amplification de chaque gène. L'amplification par PCR est précédée par une étape de dénaturation des ADN (94 °C pendant 3 minutes) et suivie par une étape d'élongation finale des brins d'ADN (72 °C pendant 5 minutes). La réaction d'amplification proprement dite consiste en la répétition de 3 étapes : une étape de dénaturation des ADN (94 °C), une étape d'hybridation des amorces à l'ADN dont la température dépend de la séquence des amorces, et une étape d'élongation de l'ADN (72 °C) (Tableau II-2).



ADNc amplifié	Dénaturation initiale	Amplification			Nombre de cycles	Elongation finale
		Dénaturation	Hybridation	Elongation		
<b>Antisens de l'AOPEN</b>	94 °C; 3 min.	94 °C; 30 sec.	72 °C; 30 sec.	60 °C; 45 sec.	26	72 °C; 5 min.
<b>GAPDH</b>	94 °C; 3 min.	94 °C; 30 sec.	72 °C; 30 sec.	60 °C; 45 sec.	24	72 °C; 5 min.
<b>GFAP</b>	94 °C; 3 min.	94 °C; 30 sec.	72 °C; 30 sec.	60 °C; 45 sec.	28	72 °C; 5 min.
<b>TH</b>	94 °C; 3 min.	94 °C; 30 sec.	72 °C; 30 sec.	60 °C; 45 sec.	30-35	72 °C; 5 min.

**Tableau II-2 : Conditions d'amplification des gènes d'intérêt par PCR en « point final » sur thermocycleur à effet Pelletier.**

---

### ***III-5. Détection des ARN par RT calibrée et PCR quantitative***

Au cours de ce travail de thèse, le laboratoire CNRS-UCBL UMR 5123 s'est équipé avec un thermocycleur de type Lightcycler (Roche), permettant à la fois le suivi en temps réel et la détermination de la phase quantitative de la PCR. Les ADNc issus de la transcription inverse des ARNm codant pour la protéine « microtubule associated protein 2 », pour le transporteur de la noradrénaline et la dopamine bêta hydroxylase ont été quantifiés dans nos échantillons à partir de ce type de PCR. De plus, afin de conforter certains résultats obtenus par RT conventionnelle et PCR en « point final », l'ADNc issu de la transcription inverse de l'ARNm-TH a également été quantifié dans une partie de nos échantillons à l'aide de cette technique.

#### **III-5.1. Transcription inverse calibrée**

Etant donné que la réaction de transcription inverse n'était jusqu'à présent pas calibrée, l'équipe de recherche dirigée par le Dr. Laurent Bezin a développé et mis au point une technique d'étalonnage de cette réaction, permettant à la fois d'évaluer la qualité de la réaction de transcription inverse et la normalisation des échantillons entre-eux. Cette invention est protégée par un brevet Européen (Brevet n° 032290958.2 enregistré et déposé aux noms du CNRS et de l'université C. Bernard Lyon 1 et ayant pour co-inventeurs les Drs Laurent BEZIN et Anne MORALES ; <http://www.frinnov.com/index.php?wpe=a460>). Cet étalonnage est basé sur l'ajout d'une quantité connue d'un ARN de synthèse possédant une queue poly(A) dans le volume réactionnel final de chaque échantillon où s'opère la réaction de transcription inverse. Deux particularités caractérisent cet ARN de synthèse : i) sa séquence nucléotidique est distincte de toutes celles référencées dans les différentes banques de données, tout génome confondu, ce qui lui confère le qualificatif de « hétérologue », et ii) les séquences nucléotidiques servant à l'amorçage de la synthèse de son ADNc durant la réaction de PCR ne permettent pas l'amplification des ADNc issus de la transcription inverse des ARNm des échantillons expérimentaux prélevés chez différentes espèces animales, ce qui lui confère le qualificatif de « non-compétitif ». La séquence de cet ARN de synthèse a été très difficile à élaborer, car de nombreuses amorces qui correspondaient au premier de ces deux critères permettaient l'amplification d'ADNc de séquences inconnues dans les échantillons expérimentaux. Ainsi, cet ARN de synthèse poly(A) joue le rôle de calibrateur externe hétérologue non-compétitif.

La réaction de transcription inverse est réalisée pour chaque échantillon dans un volume réactionnel final de 20  $\mu$ L, contenant 350 ng d'ARN totaux et un mélange réactionnel contenant 50 Unités d'Expand Reverse Transcriptase (Roche), le tampon Expand RT à la

concentration finale de 1X, 0,5 mM final de chacun des désoxy nucléotides tri-phosphates (Promega), un mélange (rapport 1:4) d'amorces aléatoires (Invitrogen) et nucléotides oligo(dT)<sub>15</sub> (Eurobio), et 80 pg de l'ARN de synthèse. Les RT de tous les échantillons sont effectuées en même temps à partir d'un même mélange réactionnel. Après une incubation d'1 h à 42°C, la transcriptase inverse est inactivée par la chaleur (2 min à 95 °C). Les solutions d'ADN complémentaires (ADNc) obtenues pour chaque échantillon sont diluées dans 80 µL d'eau ultra pure (Eurobio) et fractionnées en aliquotes de 5 µL dans des tubes à faible pouvoir de rétention des acides nucléiques (Axygen) avant d'être stockées à -25°C.

### **III-5.2. Amplification quantitative des ADN d'intérêt par la technique de PCR en « temps réel » (Lightcycler™)**

#### **III-5.2.1. Principe et avantages du Lightcycler**

L'amplification des ADNc d'intérêt a été réalisée par la technique de PCR en « temps réel » à l'aide du Lightcycler™ (Roche). Le développement de ce thermocycleur a résulté de la convergence de deux principes qui sont, d'une part, le transfert de chaleur par convection d'air chaud ou froid, et d'autre part, le suivi en « temps réel » de la cinétique complète de l'amplification des ADNc. L'utilisation de tubes capillaires (verre en borosilicates) ayant une grande surface de contact avec le milieu ambiant facilite les échanges thermiques lors de la réaction d'amplification et permet une nette réduction du temps de chaque étape de l'amplification.

Le principal avantage de cette technique est le suivi cycle par cycle de l'amplification des ADNc d'intérêt, ce qui permet d'identifier précisément les cycles au-delà desquels l'amplification n'est plus exponentielle, et de ce fait plus quantitative. Ce suivi est rendu possible grâce à l'utilisation du fluorophore SYBR Green I, qui n'est pas fluorescent sous sa forme libre, mais qui émet de la fluorescence ( $\lambda_{\text{excitation}} = 494 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{émission}} = 521 \text{ nm}$ ) lorsqu'il est intercalé au niveau d'un ADN double-brin. Chaque cycle d'amplification est constitué par une phase de dénaturation, une phase d'hybridation des amorces et une phase d'élongation. A la fin de chaque cycle d'amplification, l'ADNc contenu dans le mélange réactionnel est sous forme double-brin. Une lecture spectrofluorométrique est alors réalisée afin de quantifier avec une grande précision la quantité d'ADNc amplifié et accumulé dans le capillaire. L'ordinateur associé au Lightcycler acquière et traite les données en temps réel. Le traitement des données par la méthode du « maximum de la dérivée seconde » de la cinétique d'amplification permet de calculer le dernier cycle d'amplification exponentielle de la PCR. Ce cycle est appelé « Point de Sortie », et sera utilisé afin de comparer la quantité d'ADNc ciblé contenue dans

les différents échantillons, grâce à sa conversion en concentration en ADNc, rendue possible par la réalisation préalable d'une gamme d'étalonnage (voir chapitre III-5.2.3.).

### III-5.2.2. Choix des amorces

Les différents couples d'amorces (Tableau II-1) ont été synthétisés par les laboratoires Eurobio. Leurs séquences ont été choisies à l'aide du logiciel en ligne « Primer 3 », comme décrit précédemment dans le chapitre III-4.3.

### III-5.2.3. Etalonnage de la réaction d'amplification

La réaction d'amplification par le Lightcycler<sup>TM</sup> a été étalonnée pour chaque gène, dans le but d'associer à une valeur de point de sortie d'un échantillon, une concentration en ADNc ciblé. Pour un gène donné, la gamme étalon a été réalisée par une série de dilutions en cascade au 10<sup>ième</sup>, dans de l'eau ultra-pure, d'une solution purifiée d'ADNc ciblé ou « standard pur » ce concentration connue, de sorte à obtenir 4 à 8 logs de concentration en « standard dilué ». La répartition des points de concentration de la gamme pour chaque gène est choisie de telle sorte que leurs points de sortie après PCR en temps réel encadrent ceux des échantillons à doser. La concentration en ADN ciblé de chaque point de la gamme est connue. Cette concentration est transformée en nombre de copies grâce à la valeur de la masse moléculaire des amplicons et du nombre d'Avogadro. L'amplification des ADNc spécifiques contenus dans chaque point de gamme permet ainsi d'obtenir pour chaque gène une relation entre le point de sortie d'un échantillon et le nombre de copies d'ADNc ciblé présentes dans l'échantillon avant l'amplification par PCR, par l'obtention de l'équation de la droite étalon :

$$\text{point de sortie} = \text{coefficient directeur} \times \text{nombre initial de copies} + \text{ordonnée à l'origine}$$

Le coefficient directeur de cette équation permet par ailleurs de calculer le coefficient d'efficacité de la réaction de PCR, dont il est communément admis qu'il doit être compris entre 1,6 et 2.

### III-5.2.4. Amplification des ADN d'intérêt

L'amplification des ADNc d'intérêt a été réalisée à l'aide soit à l'aide du kit d'amplification Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen), soit à l'aide du kit LC FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) du kit. Cette réaction est réalisée dans un volume réactionnel de 20 µL contenant 5 µL de solution d'ADNc et 0,5 µM de chacune des amorces. Les conditions d'amplification et de fusion des ADNc sont résumées dans le tableau II-3.

ADNc amplifié	Dénaturation initiale	Amplification			Fusion			Refroidissement	Equation de la droite étalon	Efficacité
		Dénaturation	Hybridation	Elongation	Dénaturation	Hybridation	Elongation			
DBH	95 °C 15 min.	94 °C 15 sec.	60 °C 20 sec.	72 °C 20 sec.	95 °C 0 sec.	70 °C 20 sec.	95 °C 0,1 °C/sec.	60 °C 0,1 °C/sec.	$y=-4,0582x+39,903$	1,76
MAP2	95 °C 15 min.	94 °C 15 sec.	60 °C 20 sec.	72 °C 20 sec.	95 °C 0 sec.	70 °C 20 sec.	95 °C 0,1 °C/sec.	60 °C 0,1 °C/sec.	$y=-4,338x+46,246$	1,7
NET	95 °C 15 min.	94 °C 15 sec.	60 °C 20 sec.	72 °C 20 sec.	95 °C 0 sec.	70 °C 20 sec.	95 °C 0,1 °C/sec.	60 °C 0,1 °C/sec.	$y=-4,1269x+37,413$	1,75
TH	95 °C 15 min.	94 °C 15 sec.	60 °C 20 sec.	72 °C 20 sec.	95 °C 0 sec.	70 °C 20 sec.	95 °C 0,1 °C/sec.	60 °C 0,1 °C/sec.	$y=-3,8682x+35,173$	1,81

**Tableau II-3 : Conditions d'amplification des ADNc d'intérêt à l'aide du Lightcycler™.**

L'amplification des ADNc d'intérêt réalisée à l'aide du Lightcycler comporte 3 phases (dénaturation des ADN, hybridation des amorces nucléotidiques et élongation des fragments d'ADNc) et est précédée par une phase de dénaturation initiale des ADNc. Ces 3 phases sont répétées dans notre cas 50 fois pour chaque gène. Durant l'amplification, une mesure de la quantité d'ADNc est réalisée à la fin de chaque phase d'hybridation dans chaque capillaire réactionnel. A la fin des 50 cycles d'amplification, une phase de fusion des ADNc accumulés, au cours de laquelle la quantité en ADNc est mesurée en continu, est réalisée. Cette étape permet pour chaque échantillon de calculer la température de fusion des ADNc amplifiés, qui est spécifique de chaque amplicon. L'établissement d'une courbe d'amplification étalon pour chaque gène, à l'aide de standards dilués, permet non seulement de quantifier la quantité d'ADNc contenue dans chaque échantillon après amplification, mais également de calculer l'efficacité de la réaction d'amplification, qui est classiquement comprise entre 1,6 et 2.

### **III-5.2.5. Identification de l'ADNc amplifié**

Chaque ADNc double-brin amplifié par PCR possède une température de fusion ( $T_m$ ) spécifique, définie comme étant la température pour laquelle 50 % de cet ADNc contenu dans l'échantillon en fin de réaction de polymérisation est sous forme double-brin et 50 % est sous forme simple-brin. Le  $T_m$  est déterminé par une étape dite de « fusion » réalisée après le dernier cycle de PCR : la température est élevée jusqu'à 95°C, à la vitesse de 20 °C/sec., afin de dénaturer l'ADNc double-brin, puis elle est abaissée à la même vitesse jusqu'à une température supérieure de 10 °C à la température d'hybridation, et enfin augmentée très lentement (0,1 °C/sec.) jusqu'à 95 °C. La fluorescence est lue en continu durant l'étape de fusion. Le calcul logiciel du  $T_m$ , sous forme d'un pic de fluorescence en fonction de la température, permet de s'assurer qu'un seul pic est présent et donc qu'à priori la réaction d'amplification a été spécifique d'un seul ADNc. Une étape supplémentaire de refroidissement des produits d'amplification permet la réhybridation des ADNc simple-brins et permet la vérification de l'identité du produit formé après amplification, à la suite de la migration des échantillons sur un gel d'agarose à 1,5 %.

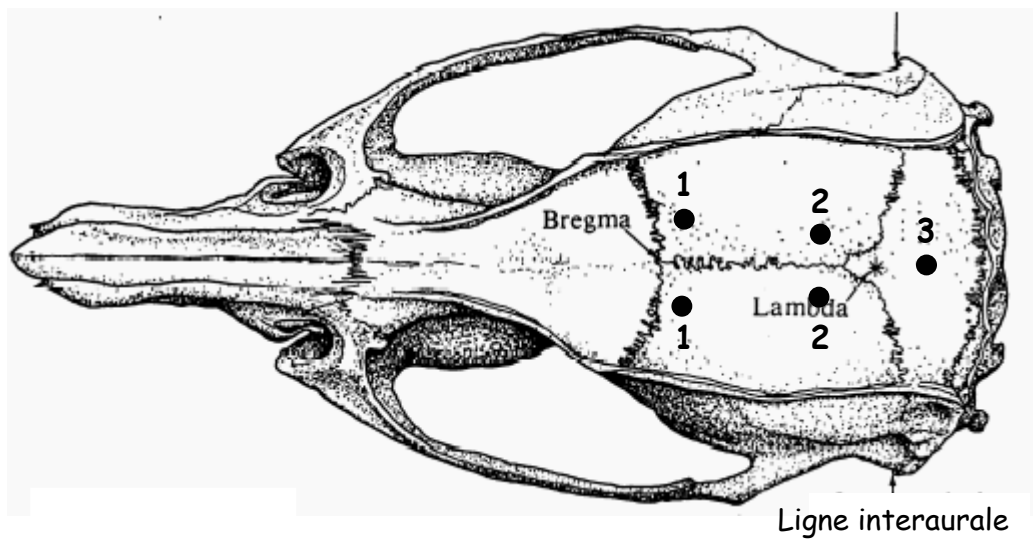
### ***III-6. Mesure de la durée des cycles éveil-sommeil***

Une étude de la rythmicité des cycles éveil-sommeil des rats contrôles et des rats transgéniques adultes a été réalisée en collaboration avec le Dr. Jean-Louis Valatx faisant partie du laboratoire de Neurobiologie des états de sommeil et d'éveil, INSERM U480 (Directeur : Raymond Cespuglio) de Lyon.

#### **III-6.1. Principe**

Sous une anesthésie générale profonde (pentobarbital sodique 50 mg/kg injecté par voie i.p.) les rats sont implantés à l'aide de mini vis intra-crânielles, localisées au-dessus du cortex et au-dessus de l'hippocampe, afin d'enregistrer l'activité électrique cérébrale (électroencéphalogramme) (Figure II-2). Une thermistance est implantée au niveau du cervelet de ces rats afin de mesurer en parallèle la température des rats. En outre, 2 électrodes en métal sont insérées entre les muscles de la nuque des rats afin de mesurer leur activité locomotrice (électromyogramme). Les câbles partant des différentes électrodes de mesure sont connectés à une broche à 10 languettes qui est ensuite scellée sur le crâne des rats à l'aide de ciment acrylique. Durant 2 semaines après la chirurgie, les rats sont laissés pour récupération et habituation aux conditions d'enregistrement dans des cages individuelles avec accès à l'eau et à la nourriture à volonté, et sous les soins constants d'un observateur. Les électroencéphalogramme, électromyogramme et température des rats sont enregistrés à l'aide

d'un enregistreur digital à 16 canaux (Somnologica<sup>TM</sup> Flaga hf.) et stockés en continue sur un ordinateur.



**Figure II-2 : Zones d'implantation des électrodes servant à mesurer l'électroencéphalogramme et la température des rats**

Une paire d'électrodes corticales (1) situées à proximité du Bregma et une paire d'électrodes corticales situées au-dessus de l'hippocampe (2) ont été implantées sur le crâne des rats afin d'enregistrer leur électroencéphalogramme. Une thermistance a été implantée au niveau du cervelet (3) afin d'enregistrer la température des rats.

### III-6.2. Enregistrement de l'activité cérébrale basale

La durée des différents cycles d'éveil et de sommeils a été enregistrée dans des conditions de base durant les 3 jours précédents la déprivation de sommeil des rats.

### III-6.3. Déprivation de sommeil

Les rats ont été placés durant 10 heures (7h-19h) sur un piédestal (diamètre : 4,5 cm) entouré d'eau dans le but de causer une déprivation du sommeil. L'aversion des rats pour l'eau et l'étroitesse du piédestal empêchent les rats de dormir, notamment durant la période diurne, qui correspond chez les rats à la période de sommeil.

### III-6.4. Enregistrement de l'activité cérébrale après déprivation de sommeil

Après les 10 heures de privation de sommeil, les rats sont remis dans leur cage individuelle et la durée des différents cycles d'éveil et de sommeils a été enregistrée en continue pendant 48 heures.

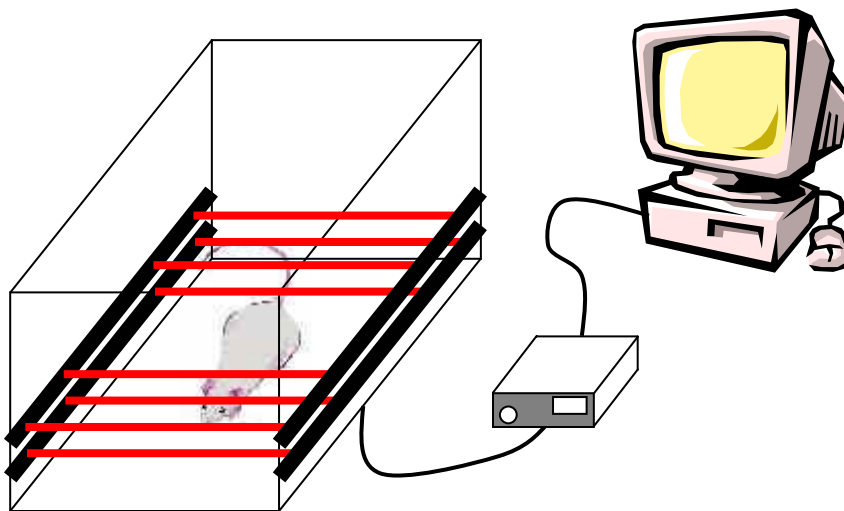
### III-7. Test en open-field/actimétrie

Une étude du comportement locomoteur des rats contrôles et des rats transgéniques adultes a été réalisée en collaboration avec le Dr. Laura Lambas-Senas appartenant au laboratoire de Neuropharmacologie et Neurochimie, INSERM U512 (Directeur : Pr. Bernard Renaud) situé à Lyon.

#### III-7.1. Principe

Le comportement locomoteur des rats est mesuré à l'aide d'un actimètre de marque Imétronic comportant 8 casiers pouvant recevoir chacun une cage. Un seul rat est déposé par cage. Chaque casier est équipé de deux paires de baguettes (une paire de chaque côté du casier) comportant chacune 4 faisceaux infrarouges (2 à l'avant du casier et 2 à l'arrière) (Figure II-3). Les faisceaux les plus bas sont situés à 4 cm du plancher du casier. Les cages d'enregistrement sont en polycarbonate transparent et mesurent 26 x 20 x 41 cm (l x h x L).

L'ordinateur relié à l'actimètre comptabilise en continu le nombre de va-et-vient dans la cage, ainsi que le nombre de mouvements à l'avant de la cage, le nombre de mouvements à l'arrière de la cage et le nombre de redressements effectués par les rats. Un va-et-vient est comptabilisé lorsqu'un rat coupe successivement les rayons infrarouges à l'arrière puis à l'avant de la cage (ou inversement). Un redressement est enregistré lorsque le rat coupe les faisceaux infrarouges dans le sens vertical.



**Figure II-3 : Schéma représentant la chaîne d'actimétrie**

Les cages logées dans l'armoire de l'actimètre sont entourées de faisceaux infrarouges rendant possible la détection et le comptage des mouvements horizontaux et verticaux des rats. Le décompte des différents types de mouvements est réalisé par un logiciel installé sur un ordinateur (PC) relié à un intégrateur.



### **III-7.2. Réactivité à la nouveauté**

Le comportement locomoteur des rats a été évalué en milieu de matinée durant 20 minutes après qu'ils aient été déposés dans les cages d'actimétrie ne comportant ni eau, ni nourriture, ni litière. Ces cages représentent pour les rats un environnement nouveau. Les données recueillies par l'ordinateur au cours du test sont cumulées par tranches de 1 minute. Les résultats fournis par l'ordinateur sont donc exprimés en nombre de mouvements par minute, sur une période de 20 minutes.

### **III-7.3. Activité locomotrice spontanée**

Les rats précédemment testés sont utilisés le même jour afin de mesurer leur activité locomotrice spontanée/circadienne. Ils sont placés à nouveau dans l'actimètre, mais cette fois-ci dans des cages contenant de la litière et avec accès illimité à la nourriture et à l'eau. Après une période d'habituation d'environ 2 heures, leur activité locomotrice est mesurée durant 24 heures. L'intervalle de temps respecté entre chaque cumule de mesures est fixé à 30 minutes.

## **IV- ANALYSE ET TRAITEMENT DES DONNEES**

### ***IV-1. Variables analysées***

#### **IV-1.1. Analyse des coupes traitées en immunohistochimie**

Les coupes traitées en immunohistochimie colorimétrique ont été analysées à l'aide d'un microscope (Diaplan, Ernst Leitz Wetzbar GmbH) auquel était associée une caméra vidéo (DXC 930P tri CCD couleur, Sony Corp.). La première étape de l'analyse des coupes traitées en immunohistochimie est de calibrer le logiciel de l'analyseur d'image pour les distances, grâce à une lame en verre graduée observée avec les différents objectifs du microscope. Ensuite, les coupes ont été dans un premier temps numérisées en couleur, puis l'image a été convertie en niveaux de gris à l'aide du programme de quantification Leica Q5001W. Après cette étape de numérisation, les images obtenues pour chaque coupe ont été superposées à l'aide de différents repères anatomiques. Une fois la meilleure superposition obtenue, un système de référence (Bezin et al., 1994c) a été établi, laissant par la suite la possibilité, à l'aide du logiciel pilotant l'analyseur d'images, de précisément délimiter sur chacune des coupes des boîtes de mesure de position et de taille reproductibles. Dans un second temps, le marquage immunopositif pour la TH observé sur chaque coupe a été seuillé : une fourchette de niveaux de gris ne prenant en compte que le signal dont l'intensité est

supérieure à celle du bruit de fond a été fixée pour chaque coupe. Le logiciel de quantification a ensuite permis de mesurer à l'intérieur de boîtes de mesure, délimitées de manière reproductible sur chaque image à l'intérieur du système de référence, la valeur de la surface totale représentée par les éléments dont l'intensité de marquage est supérieure à celle du bruit de fond de la coupe. Cette valeur a été exprimée en pourcentage de la surface de la boîte de mesure et a été utilisée dans cette étude comme un index de la densité en éléments TH-immunopositifs présents dans les régions cérébrales étudiées.

#### **IV-1.2. Analyse des coupes traitées en double détection immunohistochimique**

Les coupes doublement marquées ont été observées au microscope confocal (Leica TCS SP2). Les fluorochromes couplés aux anticorps secondaires présents sur les coupes sont excités à l'aide d'un laser à l'Argon à une longueur d'onde de 488 nm ou à l'aide d'une diode laser à une longueur d'onde de 532 nm. Le logiciel d'analyse du signal filtre les fluorescences émises par les fluorochromes : pour l'Alexa Fluor 488, le logiciel récupère le signal fluorescent dans une fourchette de 497 à 527 nm (vert); pour la Cy3, le signal recueilli est compris dans une fourchette de 550 à 663 nm (rouge). Une fois les images acquises, elles ont été superposées à l'aide du logiciel de traitement d'image Adobe Photoshop<sup>TM</sup>. Un marquage double correspond à une superposition des marquages rouge et vert, et la colocalisation des marquages rouge et vert est visualisée en jaune. Un traitement ultérieur des images superposées a permis d'isoler le signal correspondant uniquement à la colocalisation des deux marquages.

#### **IV-1.3. Analyse des échantillons traités en immunoautoradiographie**

Après révélation de la plaque à cristaux radio-sensibles, les spots correspondant au signal TH-immunopositif de chaque échantillon sont quantifiés à l'aide du logiciel Image Quant<sup>TM</sup> (Molecular Dynamics). Le logiciel mesure le rapport entre la densité optique de chaque spot et leur surface (DO/S) et l'exprime en unité arbitraire.

La réaction immunoautoradiographique est étalonnée par les standards de TH (100 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,12 - 1,56 et 0 % d'homogénat tissulaire d'origine surrénalienne ; voir chapitre III-3.1.), dont le rapport DO/S a été mesuré en même temps que celui des échantillons de protéines solubles des structures d'intérêt. Chacun des standards contient une quantité connue de TH exprimée en unité de TH (U.TH): 1 U.TH correspond à la quantité de TH contenue dans 10 µg de glande surrénalienne. Cette quantité est proportionnelle à la valeur de la DO/S mesurée par le logiciel de quantification. Les valeurs obtenues pour les échantillons de protéines extraites des structures d'intérêt sont converties en U.TH grâce aux

standards, puis en U.TH/mg de protéines solubles totales, expression de la quantité tissulaire de TH.

#### **IV-1.4. Analyse des échantillons traités en chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection électrochimique**

L'étalonnage de la chaîne de chromatographie par le standard contenant des quantités connues des différentes catécholamines permet d'obtenir les valeurs de la quantité en catécholamines contenues dans les échantillons, en picogramme (pg). Ces valeurs ont ensuite été rapportées au poids en milligramme (mg) du tissu frais ayant servi à confectionner ces échantillons et exprimées en pg/mg de tissu frais.

#### **IV-1.5. Analyse de l'abondance relative des ARNm par RT-PCR en « point final »**

Après la fin de la réaction de PCR, les produits d'amplification sont mélangés à un tampon de charge. Ils sont ensuite déposés sur un gel d'agarose (Eurobio) à 2 % préparé dans du tampon borate-EDTA (TBE 1X ; 0,1 M Tris, 0,09 M acide borique, 0,001 M EDTA) contenant 5 % de bromure d'éthidium (BET 5 µg/mL; Sigma), baignant à l'intérieur d'une cuve d'électrophorèse dans du tampon TBE. Un échantillon de standards d'ADN de tailles connues (100 bp DNA ladder ; Invitrogen) est déposé sur chaque gel en même temps que les échantillons. Le gel est ensuite soumis à un champ électrique (tension: 80 V). A la fin de la migration, le gel est passé sur un banc à ultraviolets, permettant la révélation des bandes d'ADN marquées par intercalage du BET. La présence d'une seule bande d'ADN après amplification puis révélation permet de juger de la spécificité des amorces utilisées. La révélation des marqueurs de taille d'ADN en même temps que celle des ADN d'intérêt permet de juger de la taille du produit de l'amplification, et de ce fait de son identité.

Le gel est numérisé à l'aide d'une caméra vidéo (Kodak DC 120 ; Kodak) placée au-dessus du banc à ultraviolets, et pilotée par un logiciel de quantification (Kodak Digital Science 1 software ; Kodak). Le logiciel de quantification permet de mesurer la densité optique moyenne des bandes fluorescentes (intensité de fluorescence), et fournit une valeur en unité arbitraire. L'intensité de fluorescence des bandes est proportionnelle à la quantité de BET présente dans celles-ci, qui est directement proportionnelle à la quantité d'ADN. Etant donné que le nombre de cycles d'amplification fixé pour chaque ADN ciblé se situe dans la phase proportionnelle de leur accumulation au cours de la réaction de PCR (voir chapitre III-4.3.2.), la quantité d'ADN présente dans les bandes après migration des produits de PCR représente donc un index de la quantité initiale d'ADN ciblé dans chaque échantillon avant leur amplification.

---

Les valeurs obtenues pour les ADN ciblés ont été relativisées pour chaque produit de PCR par celles obtenues pour un gène de ménage (considéré comme invariant entre les différents échantillons), la GAPDH. Cette « normalisation » permet de tenir compte des fluctuations d'origine protocolaire qui pourraient exister entre les échantillons, tant au niveau de l'efficacité des réactions de transcription inverse et de PCR qu'au niveau de la reproductibilité de l'expérimentateur. Ainsi, les résultats sont exprimés en unité arbitraire (u.a.) par le ratio ADN d'intérêt/ADNc-GAPDH, et représentent un index de la concentration *relative* d'ARN ciblé dans les échantillons expérimentaux de départ avant les étapes de RT et de PCR.

#### **IV-1.6. Analyse de l'abondance relative des ARNm par RT calibrée et PCR quantitative**

Les valeurs du point de sortie de l'ADN ciblé ainsi que de l'ADN de synthèse observés pour chaque échantillon ont été converties en valeur de nombre de copies, à l'aide de l'équation de la droite étalon obtenue pour chaque gène (voir chapitre III-5.2.3.). Dans un échantillon donné, la valeur du nombre de copies de l'ADN ciblé est ensuite normalisée par celle de l'ADN de synthèse. La normalisation des valeurs de nombre de copies des ADN ciblés par l'ADN de synthèse permet de juger à la fois de l'efficacité de la phase de transcription inverse, puisque l'ARN de synthèse est introduit dans chaque échantillon en quantité constante, et de celle de la phase de PCR, en s'affranchissant de l'utilisation d'un gène intrinsèque (calibrateur interne) pouvant être lui-même soumis à des régulations dans certains paradigmes expérimentaux. La valeur ainsi obtenue est exprimée pour chaque gène ciblé en nombre de copies d'ADNc initialement présentes dans l'échantillon avant amplification par PCR et tient compte de l'hétérogénéité des différentes étapes expérimentales qui peuvent exister entre les échantillons.

#### **IV-1.7. Analyse des données obtenues par les mesures polygraphiques**

Les tracés électroencéphalographiques obtenus ont été scorés par séquences de 30 secondes en accord avec les critères classiques des stades de vigilance, c'est-à-dire en périodes de sommeil lent, de sommeil paradoxal et d'éveil. Cette classification est réalisée grâce aux particularités des différents stades du sommeil, i.e. la fréquence et l'intensité des ondes cérébrales, l'activité musculaire et la température des rats. Les résultats sont exprimés en minutes passées pour chaque stade et peuvent être dissociées en activité de période diurne et de période nocturne.

---

#### **IV-1.8. Analyse des mesures d'activité locomotrice**

L'actimètre comptabilise le nombre de mouvements de va-et-vient, de mouvements à l'avant de la cage et de mouvements à l'arrière de la cage (mouvements déambulatoires), ainsi que le nombre de redressements (mouvements non déambulatoires) effectués par les rats. Par ailleurs, il calcule la somme des mouvements à l'avant et à l'arrière, et des va-et-vient, représentant l'activité déambulatoire totale, qui est la valeur dont nous avons tenu compte lors de cette étude. Les résultats sont exprimés en nombre de mouvements déambulatoires par intervalle de temps (/1 minute ou /30 minutes).

#### ***IV-2. Expression des résultats***

Pour chaque étude, un nombre  $n$  de rat a été utilisé pour chaque groupe (témoin et transgénique). La moyenne des mesures obtenues pour chaque groupe et pour chaque étude est calculée, ainsi que l'« erreur standard sur la moyenne » (SEM) entre les mesures. Les résultats sont exprimés pour chaque étude par la moyenne  $\pm$  SEM des valeurs obtenues.

Pour les comparaisons réalisées au cours du développement entre les deux souches de rats, pour un même âge, les résultats obtenus chez les animaux transgéniques sont exprimés en pourcentage de la valeur moyenne obtenue chez les témoins  $\pm$  SEM.

#### ***IV-3. Analyse statistique***

Une analyse de variance à un facteur (ANOVA I) a été réalisée afin d'étudier indépendamment les profils des différentes variables mesurées au cours du développement postnatal chez les rats contrôles et chez les rats transgéniques.

Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA II), où le facteur « 1 » est la souche de rat et le facteur « 2 » est l'âge, suivie d'un test post-hoc de Newman Keuls, a été réalisée afin de comparer les valeurs des quantités en protéine et ARNm-TH, et des concentrations en catécholamines au cours du développement entre les deux souches de rats.

Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA II), où le facteur « 1 » est la souche de rat et le facteur « 2 » est le temps, suivie d'un test post-hoc de Newman Keuls, a été réalisée afin de comparer les valeurs des nombres de mouvements réalisés par les deux souches de rats dans la cage d'actimétrie au cours de la mesure d'activité locomotrice dans les conditions de stress de nouveauté et sur la totalité de la journée.

Les valeurs obtenues entre les deux souches de rats au cours des études réalisées pour un seul âge sur l'activité *in vivo* de la TH, sur la densité des fibres TH-immunopositives, sur l'expression des gènes codant pour GAP-43, GFAP, MAP2, NET, et DBH, et sur la durée des cycles éveil-sommeil, ont été comparées en utilisant un test  $t$  de Student.

## ***Résultats - Discussions***

---

# **I- MISE EN PLACE DU PHENOTYPE TYROSINE HYDROXYLASE DANS LE NOYAU DU FAISCEAU SOLITAIRE AU COURS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL CHEZ LE RAT : COMPARAISON AVEC LE LOCUS COERULEUS.**

La plasticité neuronale du phénotype tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme limitante dans la chaîne de biosynthèse des catécholamines (Nagatsu et al., 1964), est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions vitales, comme le maintien des états de vigilance, l'adaptation aux phénomènes de stress ou encore la fonction cardiovasculaire. Dans le cadre des régulations à long terme, cette plasticité s'exprime notamment par la modulation des quantités intracellulaires d'ARNm-TH et/ou de protéine TH, au sein des structures catécholaminergiques centrales (Kumer et Vrana, 1996). En particulier, au niveau du locus coeruleus (LC), qui est la principale structure noradrénergique cérébrale, cette plasticité a été observée non seulement dans le cadre de différents paradigmes pharmacologiques (comme le traitement au RU24722, à la réserpine et à la parachlorophénylalanine) (Debure et al., 1994) ou physiopathologiques (dénervation ou inactivation sérotoninergiques) (Lewis et al., 1976 ; Crespi et al., 1980 ; McRae-Degeurce et al., 1982 ; Debure et al., 1994), mais aussi de manière physiologique, au cours du développement postnatal (Bezin et al., 1994a,b,c, 1997). En effet, une forte augmentation de la présence de protéine TH est observée dans la région du LC au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale (Bezin et al., 1994b,c).

La plasticité du phénotype TH en réponse à un traitement pharmacologique serait soumise à une forte sélectivité anatomique. Par exemple, dans le cas du traitement au RU 24722 chez le rat, les quantités d'ARNm-TH et de protéine TH ne sont pas modifiées dans la substance noire dopaminergique (Labatut et al., 1988), alors qu'elles augmentent dans des proportions similaires dans le LC et dans le noyau du faisceau solitaire (NTS), le premier relais de l'arc baroréflexe (Labatut et al., 1988 ; Debure et al., 1992,1994 ; Schmitt et al., 1993 ; Garcia et al., 1994, 1996). Compte tenu de cette similitude de réponse entre le LC et le NTS en réponse au RU 24722, nous avons recherché si le NTS pouvait être soumis au même phénomène de plasticité du phénotype TH que celui observé dans le LC au cours du développement postnatal.

---

La première partie de ce travail de thèse a donc consisté à évaluer l'expression du gène codant pour la TH au niveau de ces deux structures au cours du développement postnatal. Les quantités d'ARNm-TH et de protéine TH ont été mesurées au niveau du NTS et du LC chez des rats (Sprague Dawley ; Iffa Credo, France) âgés de 2, 3, 4, 7 et 12 semaines postnatales. Nous avons également choisi de mesurer durant cette période la concentration tissulaire en noradrénaline présente dans les deux structures, afin d'avoir un index de la neurotransmission noradrénergique locale.

### ***I-1. Protocole expérimental***

La mesure des quantités d'ARNm-TH et de protéine TH ainsi que de la concentration tissulaire en noradrénaline ont nécessité l'emploi de différentes techniques de détection biochimique. Les tissus nerveux servant à ces dosages ont été prélevés par la technique de « punch » et homogénéisés dans de l'eau. Pour chaque échantillon tissulaire prélevé, cet homogénat a pu servir à la détermination des quantités d'ARNm-TH et de protéine TH ainsi qu'à la détermination de la concentration tissulaire en noradrénaline. La mesure de l'expression de l'ARNm codant pour la TH a été réalisée par RT-PCR en « point final », en utilisant la GAPDH comme gène invariant, sur 3 à 4 échantillons de LC et de NTS. Afin d'obtenir un profil développemental fiable, chaque échantillon a été quantifié deux fois. Les valeurs représentées sur les graphiques ont été exprimées en pourcentage de la valeur mesurée à 2 semaines, afin de pouvoir juger des variations de quantités d'ARNm-TH au cours du développement dans les deux structures. La quantité de protéine TH a été mesurée par une technique de détection immunoradiographique sur homogénat tissulaire ou « dot blot ». La concentration tissulaire des catécholamines a été dosée par la technique d'HPLC-ED. L'ensemble des protocoles utilisés a été plus amplement décrit dans le chapitre dédié aux matériels et méthodes (chapitre II).



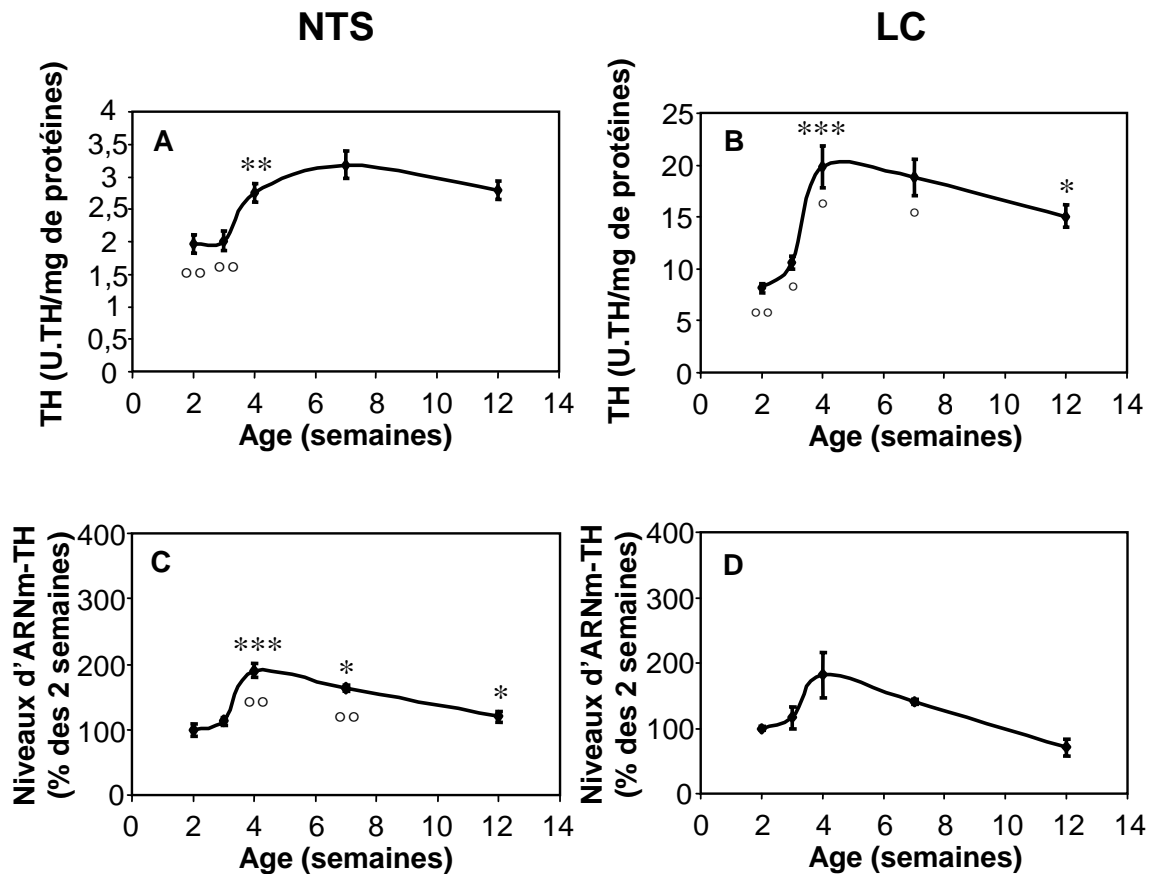
## I-2. Résultats

### I-2.1. Mise en place de l'expression de la TH dans le NTS et le LC

#### I-2.1.1. Quantité de protéine TH

La quantité de TH varie significativement entre 2 et 12 semaines ( $p < 0,001$  ; ANOVA I) dans le NTS (Figure III-1A). Elle augmente spécifiquement entre 3 et 4 semaines, d'environ 40 %, avant de se stabiliser au-delà de ce stade du développement.

La quantité de TH varie significativement ( $p < 0,001$  ; ANOVA I) entre 2 et 12 semaines dans le LC (Figure III-1B). Elle augmente entre 3 et 4 semaines, d'environ 87 %, et atteint un plateau transitoire à 4 semaines. Ensuite, la quantité de TH diminue légèrement (d'environ 20 %) jusqu'à 12 semaines.



**Figure III-1 : Mise en place ontogénique de l'expression du gène codant pour la TH dans le NTS et le LC des rats contrôles.**

La quantité de tyrosine hydroxylase (TH) a été mesurée dans le NTS (A) et dans le LC (B) au cours du développement postnatal grâce à la technique des « dots blots ». Les niveaux d'ARNm codant pour la TH (ARNm-TH) ont été mesurés dans le NTS (C) et le LC (D) par la technique de RT-PCR en « point final ». Les valeurs obtenues pour chaque âge ont été exprimées en pourcentage de la valeur moyenne obtenue à 2 semaines. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=9$  à  $10$  pour la protéine TH ;  $n=3$  à  $4$  pour l'ARNm-TH) de la valeur obtenue pour chaque rat à chaque âge. Les variations de quantité de protéine TH et de niveau d'ARNm-TH au cours du développement postnatal ont été testées à l'aide de l'ANOVA I suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. Comparaison entre un âge et l'âge précédent : \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; Comparaison entre un âge et 12 semaines : °° $p < 0,001$ , °°° $p < 0,001$ .

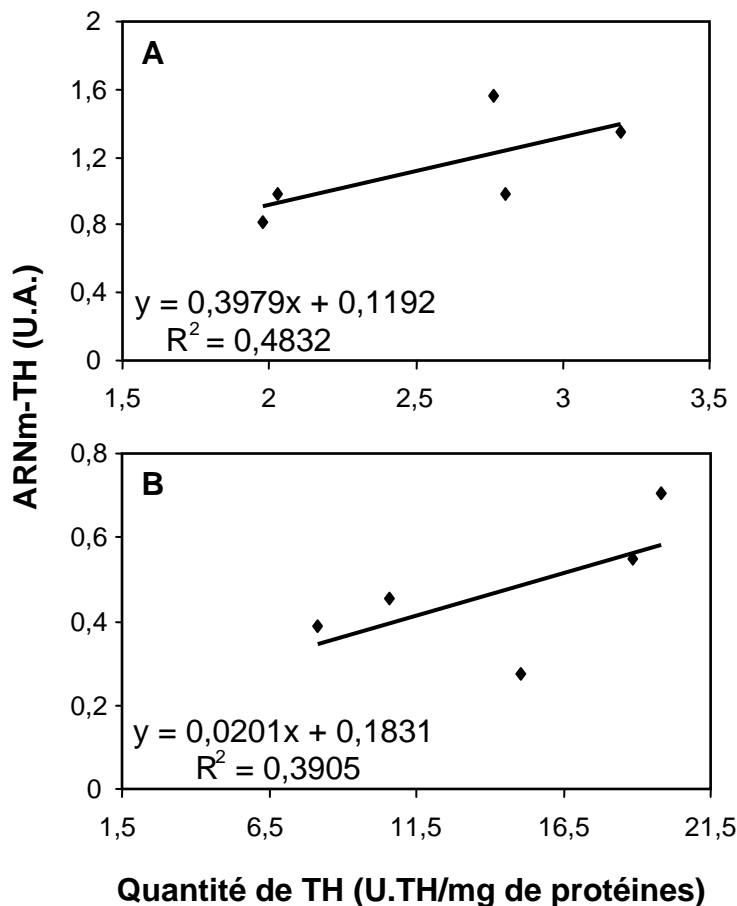
### I-2.1.2. Quantité d'ARNm-TH

Comme pour la quantité de protéine TH, la quantité d'ARNm-TH varie très significativement ( $p < 0,001$  ; ANOVA I) au cours du développement postnatal dans le NTS (Figure III-1C). En effet, elle augmente d'environ 90 % entre 2 et 4 semaines, avec une hausse très prononcée, d'environ 60 %, entre 3 et 4 semaines. La quantité d'ARNm-TH atteint un pic transitoire vers 4 semaines, avant de diminuer d'environ 37 % entre 4 et 12 semaines.

L'analyse statistique de l'évolution postnatale de la quantité relative d'ARNm-TH dans le LC ne montre pas de variation significative au cours du développement (Figure III-1D).

### I-2.2. Relation entre l'expression de l'ARNm-TH et la quantité de protéine TH dans le NTS et le LC au cours de la période postnatale

La mise en relation de l'expression de l'ARNm-TH et la quantité de protéine TH dans le NTS (Figure III-2A) ainsi que dans le LC (Figure III-2B) démontre qu'il n'existe aucune corrélation entre ces deux variables au cours de la période postnatale.



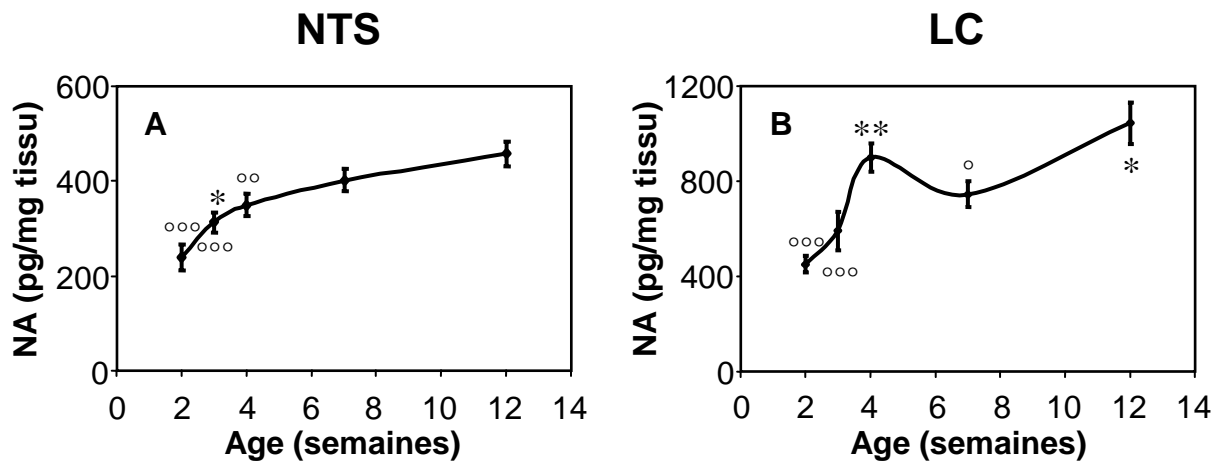
**Figure III-2 : Mise en relation de la quantité de protéine TH et du niveau d'ARNm-TH dans le NTS et le LC des rats contrôles au cours de la période postnatale.**

Les valeurs moyennes de quantité de protéine TH sont comparées celles de l'ARNm-TH détectées au niveau du NTS (A) et du LC (B) au cours du développement postnatal. Les valeurs utilisées ont été présentées sur les figures III-1. La droite de corrélation linéaire obtenue pour chaque structure est inscrite en bas à gauche des figures.

### I-2.3. Mise en place de la concentration tissulaire en noradrénaline dans le NTS et le LC

Le profil ontogénique de la concentration tissulaire de noradrénaline au niveau du NTS (Figure III-3A) montre une variation très significative ( $p < 0,001$  ; ANOVA I) au cours du développement postnatal. En effet, la concentration en noradrénaline tissulaire augmente d'environ 50 % entre 3 et 4 semaines, âge à partir duquel un plateau est atteint.

Le profil ontogénique de la concentration tissulaire de noradrénaline au niveau du LC (Figure III-3B) montre une variation très significative ( $p < 0,001$  ; ANOVA I) au cours du développement postnatal. En effet, la concentration en noradrénaline tissulaire augmente d'environ 52 % entre 3 et 4 semaines, âge pour lequel un plateau est atteint.



**Figure III-3 : Mise en place ontogénique de la concentration tissulaire en noradrénaline dans le NTS et le LC des rats contrôles.**

La concentration tissulaire en noradrénaline (NA) a été dosée par la technique d'HPLC-ED dans le NTS (A) et le LC (B). Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=9$  à  $10$ ) de la valeur obtenue pour chaque rat à chaque âge. Les variations de concentration au cours du développement postnatal ont été testées à l'aide de l'ANOVA I suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. Comparaison entre un âge et l'âge précédent : \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; Comparaison entre un âge et 12 semaines : ° $p < 0,05$ , °° $p < 0,01$ , °°° $p < 0,001$ .

---

### ***I-3. Discussion***

Les catécholamines synthétisées par les neurones du NTS sont impliquées dans la régulation centrale de la fonction cardiovasculaire (De Jong et Nijkamp, 1976 ; Granata et Woodruff, 1982). Localement, la synthèse des catécholamines par les neurones du NTS est largement modulée par la quantité de TH présente dans la structure. Des travaux antérieurs avaient montré, aussi bien dans le LC noradrénergique (Debure et al., 1994) que dans la partie adrénérgique du NTS (Garcia et al., 1994), que la quantité de la protéine TH présente le NTS peut être soumise à des régulations importantes, et en particulier au niveau des prolongements neuronaux. En effet, en réponse au traitement pharmacologique par le RU 24722, la quantité de TH augmente fortement dans le LC et le NTS, le supplément de protéine TH se répartissant localement dans les prolongements dendritiques et axonaux. Cette stratégie cellulaire rappelle singulièrement celle mise en évidence dans le LC au cours du développement postnatal (Bezin et al., 1994c, 1997). En effet, la quantité de protéine TH augmente considérablement au niveau du LC au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale, et ceci principalement dans les prolongements dendritiques et axonaux présents dans le neuropile péricoeruléen.

L'objectif de cette partie du travail de thèse était de définir, à l'aide de dosages biochimiques, si la mise en place postnatale des différentes variables (quantités d'ARNm-TH et de protéine TH) caractérisant le phénotype TH au niveau du NTS était similaire à celle préalablement déterminée au niveau du LC (Bezin et al., 1994c).

#### **Profil postnatal de l'expression du gène TH : comparaison entre le NTS et le LC.**

Nos résultats mettent en évidence que la quantité de protéine TH augmente très fortement dans le NTS au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale, de façon tout à fait similaire au profil établi dans le LC. En outre, nos résultats obtenus par la méthode des « dots blots » sur homogénats tissulaires dans le LC corroborent ceux préalablement obtenus par la technique d'immunoautoradiographie de coupes cérébrales (Bezin et al., 1994c). En revanche, il existe une différence entre les deux structures dans l'évolution postnatale de la quantité d'ARNm-TH. En effet, bien que présentant un profil de variation identique entre le LC et le NTS, la quantité d'ARNm-TH augmente significativement dans le NTS de manière transitoire au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine, alors qu'au niveau du LC aucune variation significative de la quantité d'ARNm-TH n'est décelée.

Les amplitudes des variations de quantité d'ARNm-TH observées dans ces deux structures ne suffisent pas à expliquer la très forte augmentation de protéine TH se déroulant à la 4<sup>ème</sup> semaine, puisque nous n'avons pu mettre en évidence aucune corrélation significative entre ces deux variables au cours du développement postnatal. En outre, cette augmentation serait indépendante d'une variation du nombre de cellules exprimant la TH dans les deux structures. En effet, ce nombre ne varie pas après le second jour postnatal dans le NTS (Zhang et Ashwell, 2001), et ne fait que diminuer au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine dans le LC (Bezin et al., 1994a).

### **Support anatomique de l'augmentation de la quantité de TH pendant la 4<sup>ème</sup> semaine.**

Dans le territoire défini par la présence de la protéine TH et révélé par immunoautoradiographie, la densité des périkarya exprimant le phénotype TH est d'environ 2 800 / mm<sup>3</sup> dans le NTS et de 28 000 / mm<sup>3</sup> dans le LC (Garcia et al., 1994 ; Bezin et al., 1994a). En outre, le volume de l'ensemble des périkarya représente au plus 5% du territoire du LC qu'ils délimitent à l'âge adulte (Bezin et al., 1994a), et, si l'on considère la totalité de l'aire de répartition de la TH dans la région du LC (LC plus neuropile péricoeruléen), ce pourcentage descend à 0,4%. Ainsi, les variations importantes de la quantité de protéine TH mesurées dans le NTS et la région du LC ne peuvent être localisées, pour être réellement visibles, dans un volume aussi réduit que celui représenté par les périkarya. C'est donc essentiellement dans les dendrites, axones de passage et terminaisons axonales que le supplément de protéine TH se répartit. Il se pourrait même que ces variations soient essentiellement localisées dans les dendrites, car la quantité de protéine TH présente dans les fractions synaptosomales ne représenterait que 6% de la quantité de protéine TH mesurée dans la région du LC (Gillon et al., 1993 ; Bezin et al., 1994c).

Ainsi, il se pourrait qu'au niveau du NTS et du LC, le supplément de protéine TH observé au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale se répartisse vers des prolongements dendritiques et/ou axonaux, qui étaient jusqu'alors soit peu concentrés, soit vides de protéine TH. Pour les neurones du LC, ce phénomène coïncide avec la fin de la période de synaptogenèse (Lauder et al., 1974). La noradrénaline libérée par les neurones du LC ayant vraisemblablement un rôle trophique nécessaire au développement des aires cibles, il se pourrait que l'aboutissement de la différenciation de ces aires de terminaisons entraîne une modification du transport de la TH, qui serait alors dirigée préférentiellement vers les dendrites des neurones coeruléens. Pour les neurones du NTS, il se pourrait que la protéine TH soit non seulement dirigée après la 4<sup>ème</sup> semaine vers les prolongements (dendritiques et

axonaux) présents dans la structure, mais aussi vers les prolongements axonaux innervant d'autres territoires, en particulier le neuropile péricoeruléen.

#### ***I-4. Conclusions***

Notre étude a permis de caractériser, pour la première fois, la mise en place du phénotype TH dans le NTS au cours de la période postnatale, et de révéler que la 4<sup>ème</sup> semaine est une étape clé dans la maturation de cette structure cérébrale. En effet, tout comme pour le LC à la même période, la quantité de TH augmente considérablement, et il est vraisemblable que cette augmentation soit soutenue par le transport privilégié de la protéine TH vers les compartiments dendritiques et axonaux présents dans le NTS.

Les mécanismes et les facteurs impliqués dans la plasticité du phénotype TH observée dans le LC et le NTS restent encore à préciser. Certains indices décrits dans la littérature suggèrent que les angiotensines cérébrales pourraient être impliquées dans la maturation du phénotype TH au niveau de ces deux ensembles neuronaux. Cette hypothèse s'est dégagée sur la base d'études jusqu'alors réalisées uniquement *in vitro* (voir pour revue Gelband et al., 1997). En effet, l'angiotensine II (Ang II), qui est une molécule de la famille des angiotensines, stimule l'expression et le transport neuritique de la TH dans des neurones noradrénergiques en culture, par la stimulation des récepteurs de type 1 à l'Ang II (Yu et al., 1996 ; Lu et al., 1998). Ces récepteurs sont exprimés *in vivo* au niveau du NTS et du LC chez le rat au cours du développement postnatal. Afin d'observer si ces facteurs sont impliqués dans la mise en place postnatale du phénotype TH, nous avons choisi d'étudier la souche de rats transgéniques TGR(ASrAOGEN)680 (TGR), qui représentent le seul modèle animal existant à l'heure actuelle d'inactivation chronique du système angiotensinergique **spécifiquement au niveau cérébral** (Schinke et al., 1999).

---

## **II- MISE EN PLACE DU PHENOTYPE TYROSINE HYDROXYLASE DANS LE NOYAU DU FAISCEAU SOLITAIRE AU COURS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL CHEZ LE RAT TGR (ASrAOGEN)680.**

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence que l'établissement postnatal du phénotype TH au niveau du NTS est caractérisé, comme il avait été décrit précédemment au niveau du LC, par une forte augmentation de la quantité de TH au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine. Ce phénomène serait notamment dû à une modification des modalités du transport neuritique de la TH, favorisant l'adressage et ainsi la concentration de la protéine dans les prolongements des neurones catécholaminergiques localisés dans ces deux structures. Toutefois, les mécanismes et facteurs potentiellement mis en jeu dans le contrôle de ce phénomène restent inconnus.

Parmi les facteurs vraisemblablement impliqués dans la maturation neuronale du phénotype TH, notre attention s'est particulièrement portée sur les angiotensines cérébrales. Certaines études réalisées *in vitro* sur des neurones noradrénergiques en culture ont pu mettre en évidence que l'angiotensine II (Ang II), qui est un peptide actif formé par la dégradation de l'angiotensinogène (AOGEN), est un fort inducteur de l'expression du gène codant pour la TH (Yang et al., 1996) et du transport neuritique de la protéine (Lu et al., 1998). Les effets de cette angiotensine sur le phénotype TH des neurones noradrénergiques en culture implique la stimulation des récepteurs de types AT1, qui *in vivo* sont exprimés à la fois par les cellules du NTS et du LC. Le récent développement d'une souche de rat transgénique, le rat TGR(ASrAOGEN)680 (TGR), ayant la particularité d'être soumis à une inhibition chronique de la synthèse de l'AOGEN spécifiquement au niveau cérébral (Schinke et al., 1999), permet d'évaluer *in vivo* l'implication des angiotensines cérébrales sur la maturation centrale du phénotype TH. D'un point de vue fonctionnel, ces rats sont sujets à l'âge adulte à une diminution de la pression artérielle et une augmentation de la sensibilité du baroréflexe cardiaque (Schinke et al., 1999 ; Baltatu et al., 2001). Ces perturbations cardiovasculaires sont typiques d'une quantité élevée de noradrénaline au niveau du NTS (De Jong et Nijkamp, 1976 ; Granata et Woodruff, 1982), et pourraient ainsi résulter d'une altération de l'établissement du phénotype TH dans cette structure chez les rats TGR.

Afin d'évaluer l'implication des angiotensines cérébrales dans la mise en place postnatale du phénotype TH au niveau du NTS, les variables initialement étudiées chez les animaux contrôles (quantités de protéine et d'ARNm-TH, concentration tissulaire de noradrénaline) ont été mesurées chez les rats TGR aux mêmes stades du développement. Nous avons complété ces études biochimiques par des expérimentations réalisées *in situ*, sur coupes de cerveau, afin de pouvoir étudier les soutiens anatomiques/cellulaires de la mise en place du phénotype TH chez ces rats.

### ***II-1. Protocole expérimental***

Les mesures des quantités d'ARNm-TH et de protéine TH ont été réalisées respectivement à l'aide d'une technique de RT-PCR en « point final » et d'une technique de détection immunoautoradiographique sur homogénat tissulaire ou « dot blot ». La concentration tissulaire des catécholamines a été dosée par une technique d'HPLC-ED.

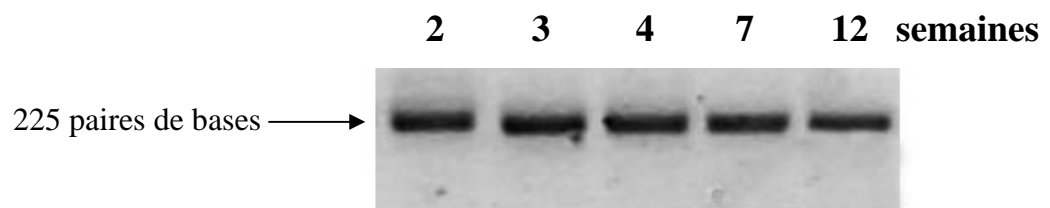
La détection *in situ* de la protéine TH a été réalisée sur des coupes de cerveaux perfusés avec une solution de paraformaldéhyde à 4%, à l'aide d'une technique immunohistochimique colorimétrique. La densité des éléments TH-immunopositifs dans les aires cérébrales d'intérêt a été estimée par la quantification de la surface totale occupée par les éléments dont l'intensité de marquage est supérieure à celle du bruit de fond de la coupe.



## II-2. Résultats

### II-2.1. Présence de l'ARN-antisens au cours du développement postnatal dans le NTS des rats TGR(ASrAOGEN)680

Avant d'avancer plus profondément dans notre problématique, nous avons dans un premier temps vérifié, par RT-PCR en « point final », la présence de l'ARN-antisens dans le NTS des rats TGR aux différents stades postnatals étudiés. L'ARN-antisens est détecté au niveau du NTS des rats transgéniques à 2, 3, 4, 7 et 12 semaines, indiquant que le transgène est exprimé durant la période postnatale étudiée (Figure III-4).



**Figure III-4. : Expression de l'ARNm-antisens au cours du développement postnatal chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 au niveau du NTS.**

L'ARN codant pour l'antisens de l'angiotensinogène a été rétro-transcrit en ADN à partir d'échantillons d'ARN totaux extraits d'homogénats de NTS de rats âgés de 2, 3, 4, 7 et 12 semaines, puis amplifié par la technique de PCR en « point final ». Les produits d'amplification par PCR ont migré par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium. Le gel a ensuite été numérisé sous rayonnement ultra-violet grâce à un système d'analyse de gels. L'ARN-antisens semble être exprimé dans le NTS à tous les stades étudiés.

### II-2.2. Mise en place de l'expression de la TH dans le NTS des rats TGR

#### II-2.2.1. Quantité de protéine TH

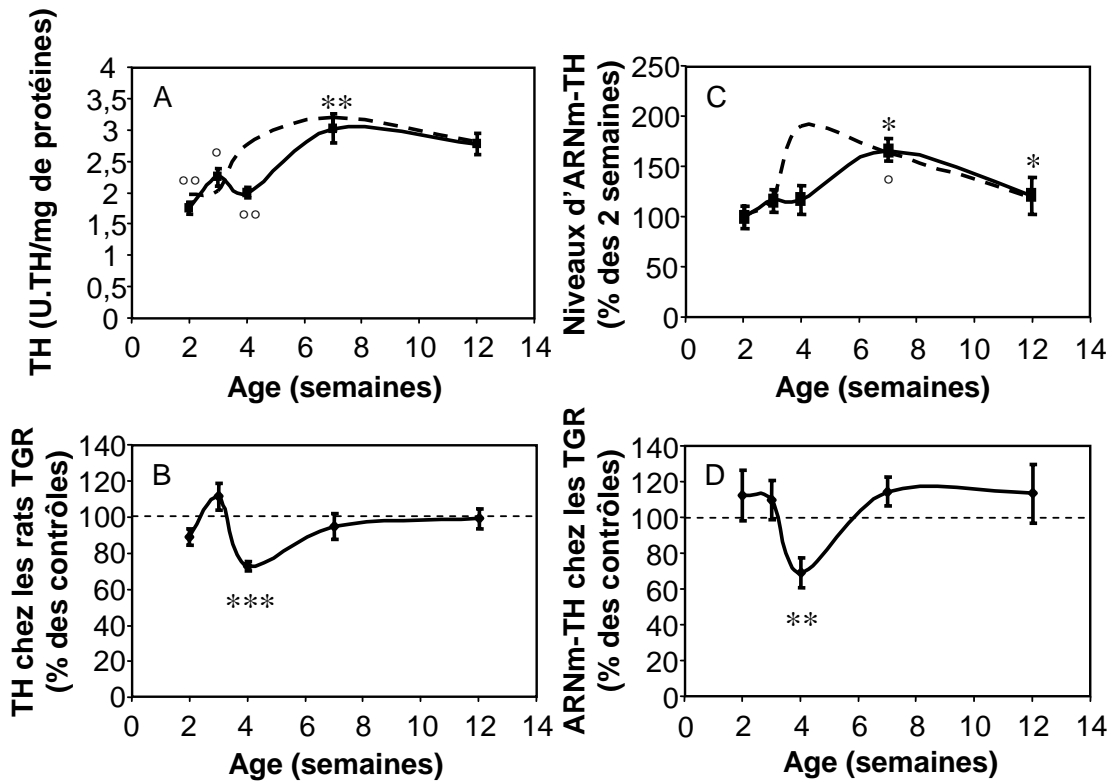
La quantité de TH varie significativement entre 2 et 12 semaines ( $p < 0,001$  ; ANOVA I) dans le NTS des rats TGR (Figure III-5A). Elle augmente spécifiquement entre 4 et 7 semaines, d'environ 51 %, avant de se stabiliser au-delà de ce stade du développement.

Les profils de mise en place ontogénique de la quantité de protéine TH sont significativement différents ( $p < 0,045$  ; ANOVA II) entre les rats témoins et les rats TGR. Les différences observées sont par ailleurs bien délimitées temporellement ( $p < 0,033$  ; interaction entre la souche de rat et le stade du développement ; ANOVA II) : la quantité de TH dans le NTS des rats TGR est diminuée d'environ 28 % à 4 semaines (Figure III-5B).

#### II-2.2.2. Quantité d'ARNm-TH

Comme pour la quantité de protéine TH, la quantité d'ARNm-TH varie significativement ( $p < 0,039$  ; ANOVA I) au cours du développement postnatal dans le NTS

des rats TGR (Figure III-5C) : elle augmente d'environ 43 % entre 4 et 7 semaines. La quantité d'ARNm-TH atteint un pic transitoire vers 7 semaines, avant de diminuer d'environ 28 % entre 7 et 12 semaines.



**Figure III-5 : Mise en place ontogénique des quantités de protéine et d'ARNm-TH dans le NTS des rats TGR(ASrAOGEN)680.**

A. La concentration tissulaire en tyrosine hydroxylase (TH) a été mesurée dans le NTS au cours du développement postnatal chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 (TGR) (trait plein) grâce à la technique de quantification sur tache. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  SEM (n=9 à 10) de la valeur obtenue pour chaque rat à chaque âge. Une trace de la courbe observée chez les rats contrôles, présentée sur la figure III-1A, est représentée en trait pointillé. Les variations postnatales de la quantité de protéine TH ont été testées à l'aide de l'ANOVA I suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. Comparaison entre un âge et l'âge précédent : \*\*\*p<0,001; Comparaison entre un âge et 12 semaines : °p<0,05, °°p<0,01.

B. Les valeurs présentées en A ont été exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour les rats contrôles aux mêmes âges. Les différences entre les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été testées à l'aide de l'ANOVA II suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \*\*\*p<0,001.

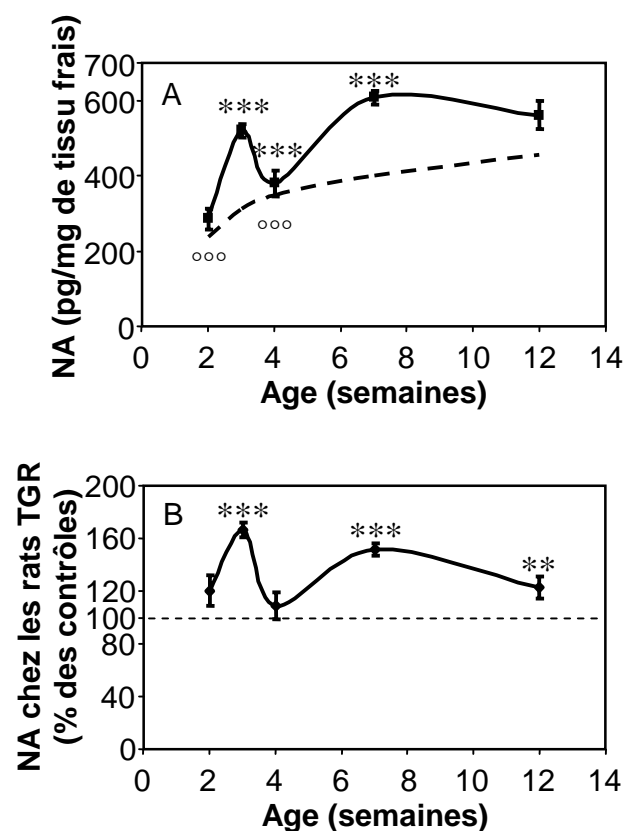
C. Le niveau d'ARNm-TH a été mesuré dans le NTS au cours du développement postnatal chez les rats TGR (trait plein) grâce à une technique de RT-PCR en point final. Les valeurs pour chaque âge ont été exprimées en pourcent de la valeur moyenne obtenue à 2 semaines. Chaque point correspond à la moyenne  $\pm$  SEM (n=3 à 5) de la valeur obtenue pour chaque rat à chaque âge. Une trace de la courbe observée chez les rats contrôles, présentée sur la figure III-1C, est représentée en trait pointillé. Les variations postnatales de la quantité d'ARNm-TH ont été testées à l'aide de l'ANOVA I suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. Comparaison entre un âge et l'âge précédent : \*p<0,05; Comparaison entre un âge et 12 semaines : °p<0,05.

D. Les valeurs présentées en C ont été exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour les rats contrôles aux mêmes âges. Les différences entre les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été testées à l'aide de l'ANOVA II suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \*\*p<0,01.

Des différences de quantités d'ARNm-TH bien délimitées temporellement sont observées entre les deux souches de rats ( $p < 0,045$  ; interaction entre la souche de rat et le stade du développement ; ANOVA II), bien que le faible nombre d'échantillons traités ne permette pas statistiquement de déceler des différences entre les profils de mise en place ontogénique des deux souches de rats ( $p < 0,928$  ; ANOVA II). En effet, la quantité d'ARNm-TH dans le NTS des rats TGR est diminuée d'environ 31 % à 4 semaines par rapport aux valeurs contrôles (Figure III-5D). Cette diminution est du même ordre que celle observée en terme de quantité de protéine TH.

### II-2.3. Mise en place de la concentration tissulaire de noradrénaline dans le NTS des rats TGR

Le profil ontogénique de la concentration tissulaire de noradrénaline au sein du NTS des rats TGR (Figure III-6A) varie significativement ( $p < 0,001$  ; ANOVA I) au cours du développement postnatal. En effet, il est caractérisé par deux phases d'augmentation : une phase précoce entre 2 et 3 semaines, au cours de laquelle la concentration tissulaire en noradrénaline augmente d'environ 81 %, et une phase plus tardive entre 4 et 7 semaines, au cours de laquelle la concentration tissulaire en noradrénaline augmente d'environ 60 %. Ces deux phases sont séparées par une période durant laquelle la concentration tissulaire en noradrénaline diminue. La concentration tissulaire en noradrénaline semble se stabiliser au-delà de 7 semaines.



**Figure III-6 : Mise en place ontogénique de la concentration en noradrénaline dans le NTS des rats TGR(ASrAOGEN)680.**

A. La concentration en noradrénaline (NA) a été mesurée dans le NTS au cours du développement postnatal chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 (TGR) (trait plein) grâce à une technique d'HPLC-ED. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=8$  à  $10$ ) de la valeur obtenue pour chaque rat à chaque âge. Une trace de la courbe observée chez les rats contrôles, présentée sur la figure III-3A, est présentée en trait pointillé. Les variations postnatales de la concentration en noradrénaline ont été testées à l'aide de l'ANOVA I suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. Comparaison entre un âge et l'âge précédent : \*\*\* $p < 0,001$ ; Comparaison entre un âge et 12 semaines : °°° $p < 0,001$ .

B. Les valeurs présentées en A ont été exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour les rats contrôles aux mêmes âges. Les différences entre les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été testées à l'aide de l'ANOVA II suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ .

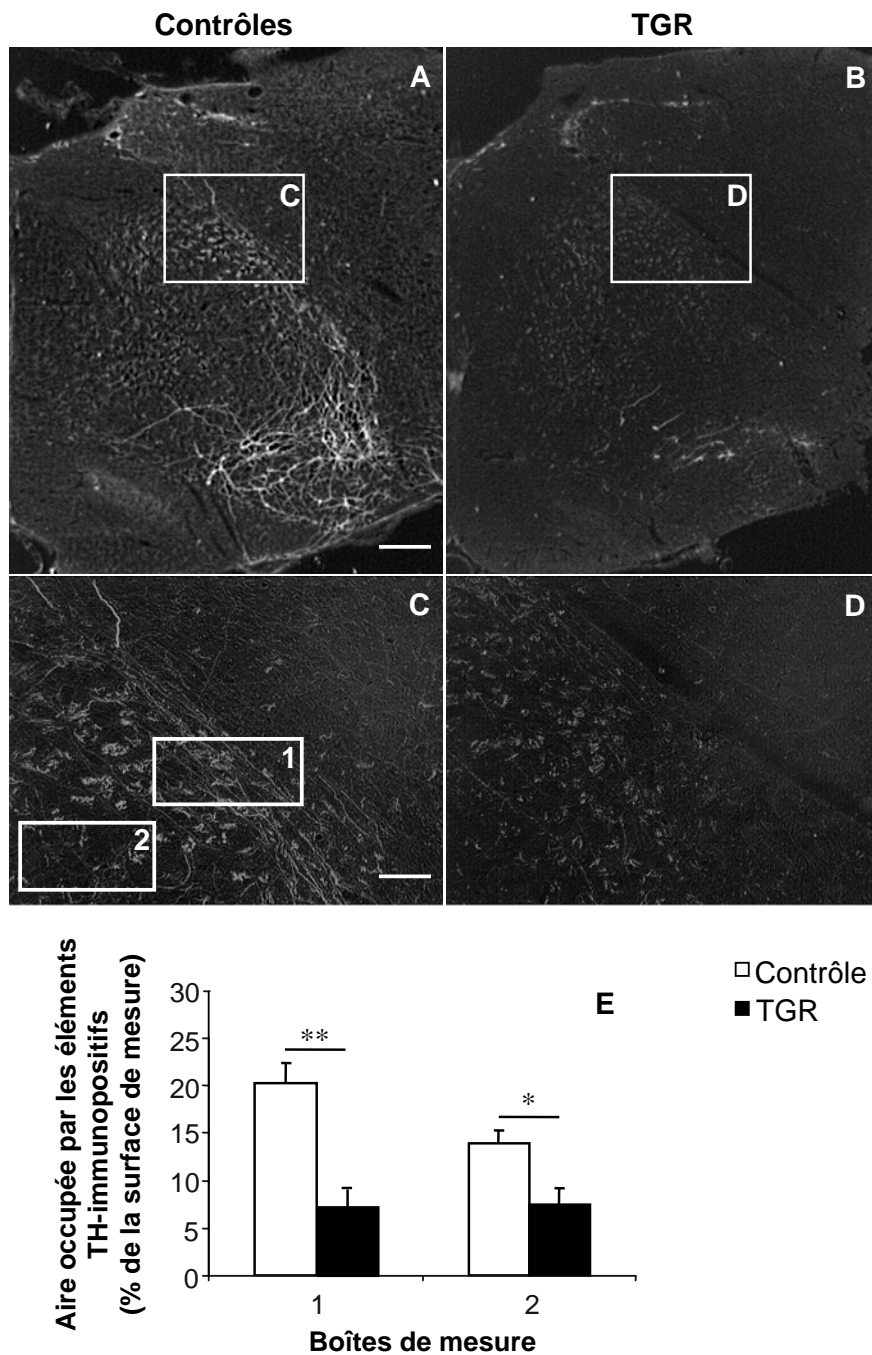
Les profils de mise en place ontogénique de la concentration tissulaire de noradrénaline observés chez les deux souches de rats sont significativement différents ( $p < 0,001$  ; ANOVA II). Les différences observées sont par ailleurs bien délimitées temporellement ( $p < 0,001$  ; interaction entre la souche de rat et le stade du développement ; ANOVA II). En effet, la concentration tissulaire de noradrénaline dans le NTS des rats TGR est augmentée d'environ 66, 51 et 23 % respectivement à 3 semaines, 7 et 12 semaines (Figure III-6B).

#### **III-2.4. Répartition de la TH dans les différents compartiments des neurones du NTS des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines**

La détection *in situ* de la protéine TH a été réalisée à 4 semaines dans le NTS des deux souches de rats, étant donné qu'une forte réduction de la présence de la protéine a été observée à ce stade du développement chez les rats TGR.

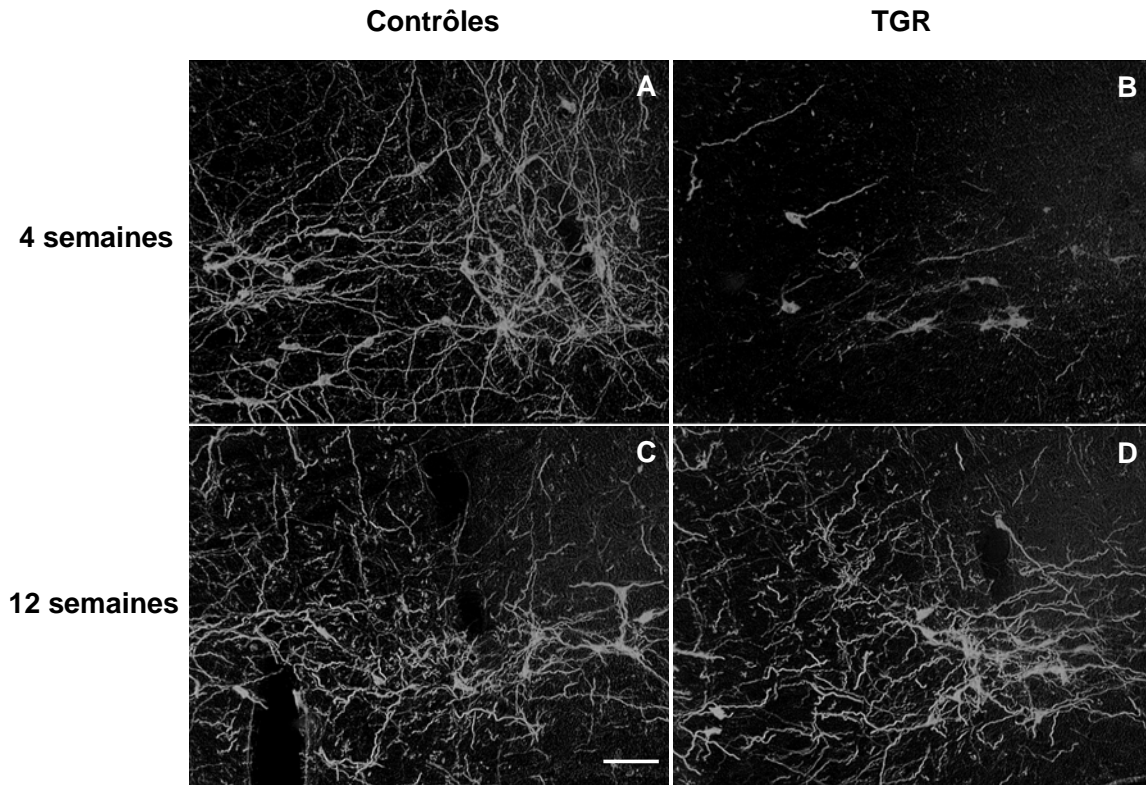
Chez les rats contrôles, le marquage TH-immunopositif observé dans la région du NTS à 4 semaines est localisé non seulement dans des corps cellulaires de neurones mais également dans des prolongements dendritiques et axonaux (Figure III-7A, C). Chez les rats transgéniques, le marquage immunohistochimique de la TH est principalement localisé au niveau du NTS dans les corps cellulaires des neurones et très peu dans le compartiment neuritique (Figure III-7B, D). D'un point de vue qualitatif, une très forte diminution de la densité de fibres immunomarquées pour la TH est observée dans la région du noyau réticulaire intermédiaire chez les rats TGR en comparaison avec les conditions contrôles (Figure III-7C, D). Cette observation est confirmée par la mesure de la densité d'éléments TH-immunopositifs contenus dans cette région de la medulla oblongata (Figure III-7E), qui dévoile chez les rats TGR une diminution de l'ordre de 56 % par rapport aux valeurs mesurées chez les rats contrôles.

Le groupe catécholaminergique A1/C1 est situé dans une région ventrolatérale de la medulla oblongata (VLM). Chez les rats contrôles, la protéine TH est localisée à la fois dans les corps cellulaires et les prolongements des neurones situés au sein de la VLM (Figure III-8A). Chez les rats TGR, la protéine TH n'est localisée au sein de cette structure quasiment qu'au niveau des corps cellulaires des neurones (Figure III-8B).



**Figure III-7 : Détection immunohistochimique de la protéine TH dans la région du NTS chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines.**

Au niveau du NTS, le marquage immunohistochimique de la TH est observé chez les rats contrôles (A) dans les périkarya et les prolongements neuronaux, contrairement aux rats transgéniques (TGR) chez lesquels le marquage est très faible dans les prolongements neuronaux (B). Un agrandissement de la portion ventrale à la région du NTS chez les rats contrôles (C) et les rats TGR (D) permet d'observer une très forte diminution du marquage TH-immunopositif dans les prolongements neuronaux chez les rats transgéniques, observation confirmée par la mesure de la densité d'éléments TH-immunopositifs présents dans les zones 1 et 2 (E). Les résultats exposés en E correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=3$ ) de la surface occupée par les éléments dont l'intensité de marquage est supérieure à la valeur du bruit de fond de la coupe, rapportée à la surface de la boîte de mesure. Les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été comparées à l'aide d'un test  $t$  de Student. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ . Barres d'échelle = 500  $\mu$ m (A, B) et = 100  $\mu$ m (C, D).



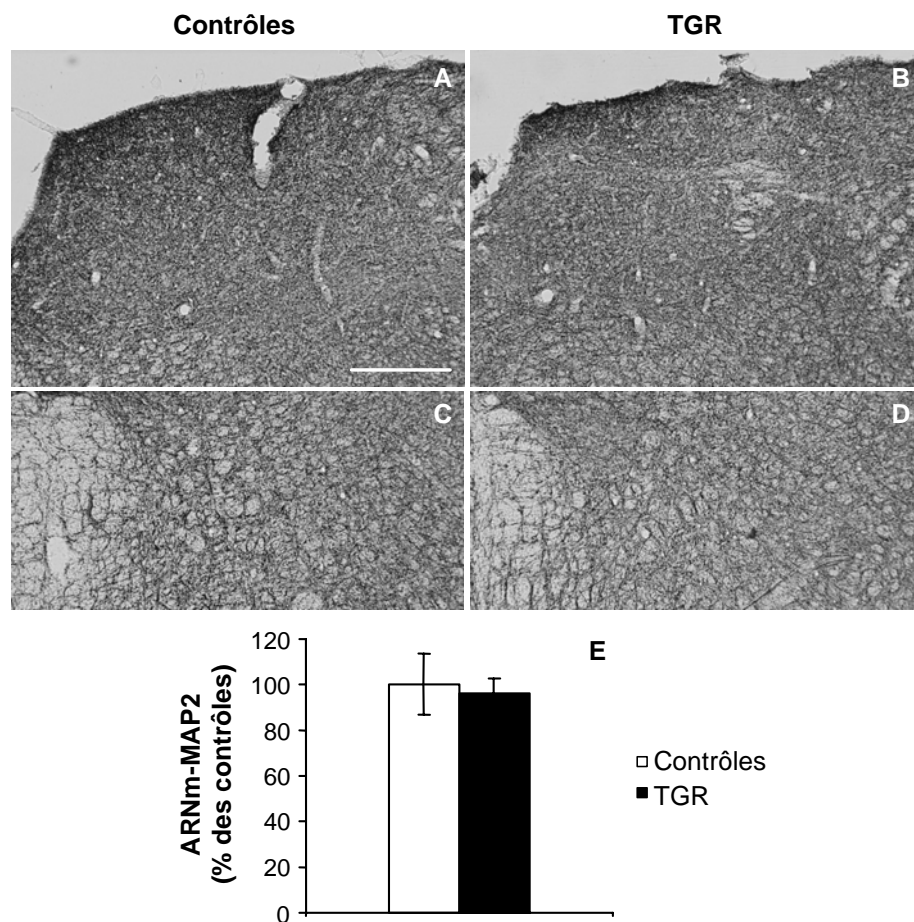
**Figure III-8 : Détection immunohistochimique de la protéine TH dans la région de A1/C1 chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 et 12 semaines.**

Au niveau de la VLM, le marquage immunohistochimique de la TH est observé à 4 semaines chez les rats contrôles (A) dans les péricarya et les prolongements neuronaux, contrairement aux rats transgéniques (TGR) chez lesquels le marquage est pratiquement exclusivement localisé dans les péricarya (B). A l'âge adulte (12 semaines), la distribution de la TH dans les prolongements neuronaux chez les rats TGR (D) est quasiment similaire à celle observée chez les contrôles (C). Barre d'échelle = 100  $\mu$ m.

### **II-2.5. Etude de la répartition et de l'expression de la protéine « microtubule associated protein 2 » au niveau du NTS des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines**

Parmi les hypothèses pouvant expliquer la forte diminution de la présence de protéine TH dans les prolongements neuronaux dans la région du NTS à 4 semaines, il est possible d'imaginer que l'expression du transgène au cours de la période postnatale ait modifié la différenciation des neurones et inhibé, par exemple, l'émission de leurs prolongements. Dans ce cas, la forte réduction de la présence de la TH observée dans les prolongements neuronaux chez ces rats résulterait de l'absence de ce compartiment cellulaire. Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé la répartition et l'expression d'une protéine spécifique des prolongements neuronaux. Nous avons choisi d'étudier la présence *in situ* dans la région du NTS de la protéine « microtubule associated protein 2 » (MAP2), qui est le marqueur dendritique et axonal le plus communément utilisé, à l'aide d'une technique de marquage

immunohistochimique colorimétrique. Nous avons également dosé par RT calibrée et PCR quantitative (voir la section « Matériel et Méthodes ») l'expression de l'ARNm-MAP2. La détection immunohistochimique de MAP2 chez les rats contrôles et les rats TGR à 4 semaines révèle un marquage très dense et distribué dans l'intégralité la medulla oblongata. D'un point de vue qualitatif, aucune différence en termes de densité ou de répartition du marquage de la protéine MAP2 n'est observée entre les deux souches de rats aussi bien dans la zone des corps cellulaires des neurones catécholaminergique du NTS (Figure III-9A, B) que dans la zone ventrale du NTS contenant une forte densité de prolongements catécholaminergiques (cf Figure III-9C, D). Ce résultat est corroboré par l'absence de différence de quantité d'ARNm-MAP2 entre les deux souches de rats (Figure III-9E).



**Figure III-9 : Expression de la « microtubule associated protein 2 » (MAP2) au niveau du NTS des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines.**

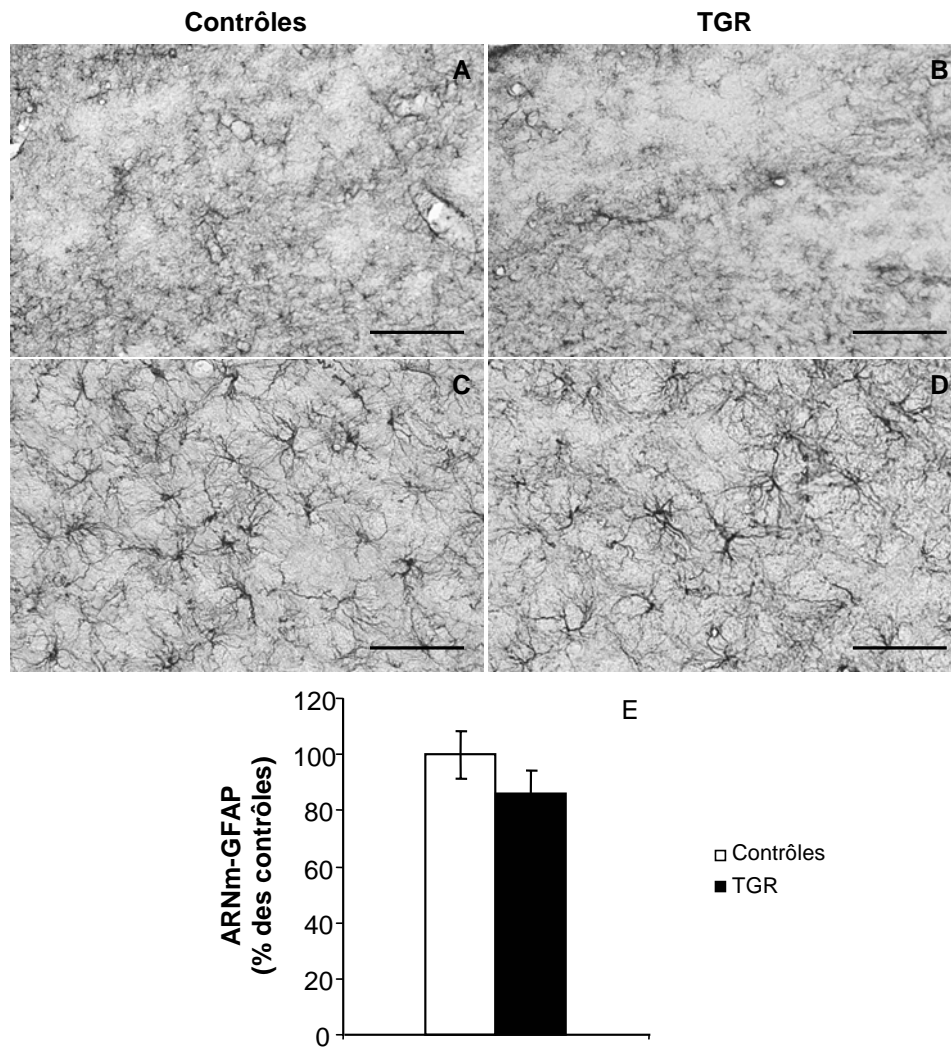
La protéine MAP2, qui est un marqueur spécifique des neurones, et en particulier des corps cellulaires et des dendrites des neurones, a été détectée au niveau du NTS des rats contrôles (A, C) et transgéniques (TGR) (B, D) grâce à une technique de détection immunohistochimique. L'observation qualitative du marquage obtenu au niveau de la zone des corps cellulaires des neurones du NTS chez les rats contrôles (A) et les rats TGR (B) ne met pas en évidence de différence de la densité et de la répartition du marquage, que se soit au niveau de la zone des somas des neurones du NTS (A, B) ou de la région du noyau réticulaire intermédiaire (C, D). En outre, la quantité d'ARNm codant pour la MAP2, exprimée en pourcentage de la valeur moyenne calculée chez les rats contrôles, est identique chez les deux souches de rats (E). Barre d'échelle : 500  $\mu$ m.

---

**II-2.6. Etude de la répartition et de l'expression de la protéine «glial fibrillary acidic protein» au niveau du NTS des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines**

Il est possible que l'expression du transgène puisse modifier la différenciation des astrocytes au cours de la période postnatale chez les rats TGR. Ce phénomène pourrait expliquer la forte diminution de la présence de protéine TH dans les prolongements neuronaux dans la région du NTS à 4 semaines chez les rats TGR. En effet, il est maintenant largement établi que les astrocytes sont de véritables soutiens métaboliques et trophiques pour les neurones ; une altération de cette population cellulaire pourrait ainsi être à la base d'une modification des processus permettant le transport des protéines dans les prolongements neuronaux. Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé la répartition et l'expression d'une protéine spécifique des astrocytes. Nous avons choisi d'étudier la présence *in situ* dans la région du NTS de la protéine « glial fibrillary acidic protein » (GFAP), à l'aide d'une technique de marquage immunohistochimique colorimétrique. Nous avons également dosé par RT conventionnelle et PCR en « point final » (voir la section « Matériel et Méthodes ») l'expression de l'ARNm-GFAP. La détection immunohistochimique de GFAP chez les rats contrôles et les rats TGR à 4 semaines révèle un marquage très dense et spécifique d'un seul type cellulaire. Aucune différence qualitative de la densité ou de la répartition du marquage de la protéine GFAP n'est observée entre les deux souches de rats dans la zone des corps cellulaires des neurones catécholaminergique du NTS (Figure III-10A, B). L'observation des cellules immunomarquées pour la protéine GFAP à plus fort grossissement ne montre pas de différence morphologique majeure entre les rats contrôles (Figure III-10C) et les rats TGR (Figure III-10D). Ce résultat est corroboré par l'absence de différence de quantité d'ARNm-GFAP entre les deux souches de rats (Figure III-10E).





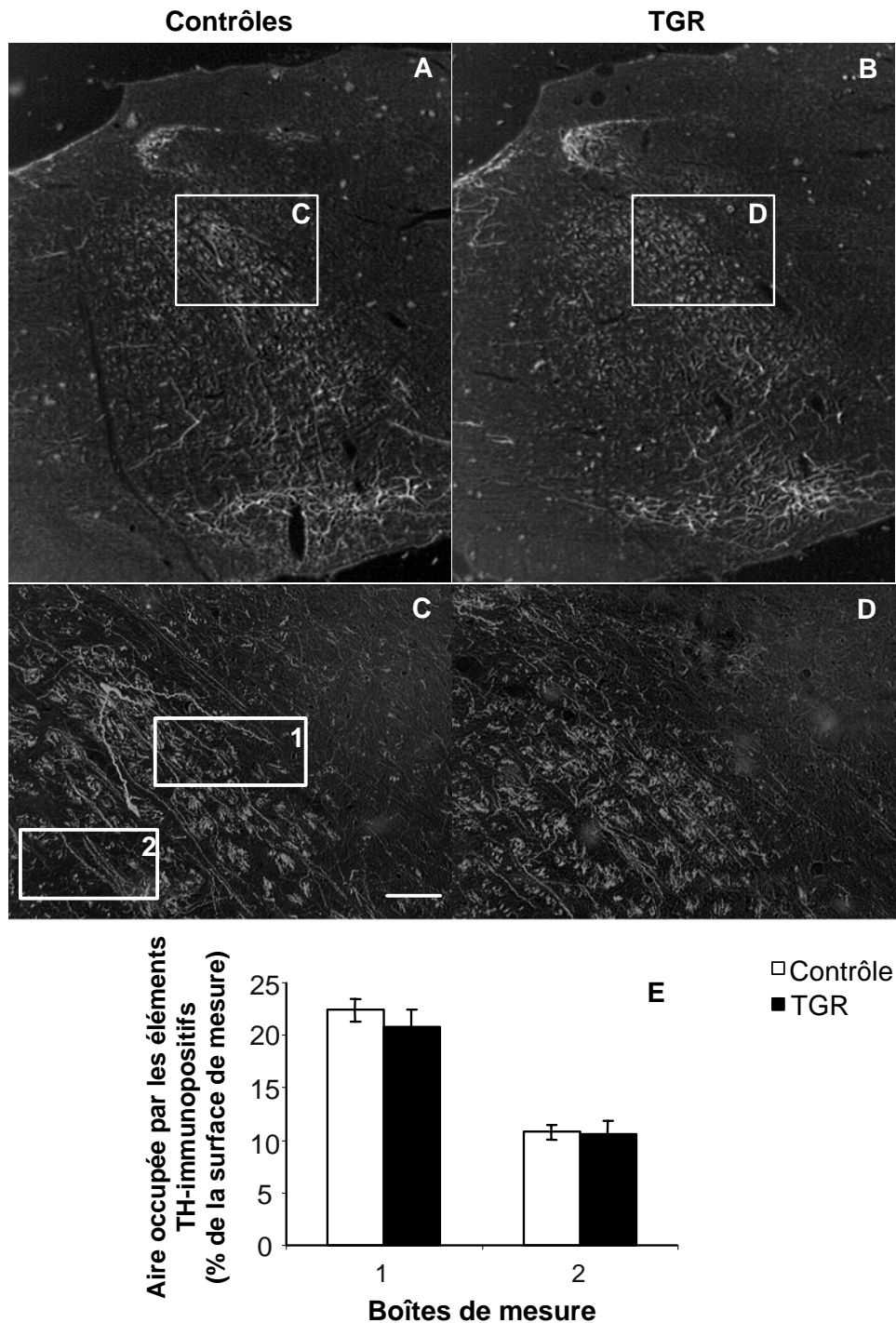
**Figure III-10 : Expression de la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP) au niveau du NTS des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines.**

La protéine GFAP, un marqueur spécifique des cellules astrocytaires, a été détectée au niveau du NTS des rats contrôles (A, C) et transgéniques (TGR) (B, D) par détection immunohistochimique. D'un point de vue qualitatif, le marquage obtenu au niveau de la zone des corps cellulaires des neurones du NTS n'est pas différent entre les deux souches de rats (A, B). Par ailleurs, un agrandissement des cellules marquées pour la GFAP ne met pas en évidence de différences morphologiques marquantes entre les rats contrôles (C) et les rats TGR (D). De plus, la quantité d'ARNm codant pour la GFAP, exprimée en pourcentage de la valeur moyenne des contrôles, est identique chez les deux souches de rats (E). Barres d'échelle : 500 µm (A, B), 100 µm (C, D).

### III-2.7. Distribution cellulaire de la TH dans le NTS des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 12 semaines

Chez les rats contrôles et les rats TGR, le marquage TH-immunopositif observé dans la région du NTS à 12 semaines est localisé non seulement dans les corps cellulaires neuronaux mais également dans des prolongements dendritiques et axonaux (Figure III-11A-D). D'un point de vue strictement qualitatif, il ne semble pas exister de différences entre les deux souches de rats aussi bien dans la distribution que la densité des éléments TH-immunopositifs (Figure III-11A-D). Cette observation est confirmée par la similitude existant

entre les deux souches de rats en termes de distribution et de densité des prolongements TH-immunopositifs présents dans la région du noyau réticulaire intermédiaire (Figure III-11E). Il semble donc qu'une restauration complète de la distribution et de la densité des éléments TH-immunopositifs se soit mise en place après la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale dans la région du NTS des rats transgéniques.



**Figure III-11 : Détection immunohistochimique de la protéine TH dans la région du NTS chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 12 semaines.**

Au niveau du NTS, le marquage immunohistochimique de la TH est observé chez les rats contrôles (A) et les rats transgéniques (TGR) (B) dans les périkarya et les prolongements neuronaux. Un agrandissement de la portion ventrale à la région du NTS chez les rats contrôles (C) et les rats TGR (D) permet de confirmer cette observation. La mesure de la densité d'éléments TH-immunopositifs présents dans les zones 1 et 2 visualisées sur l'image C montre que la valeur moyenne de ce paramètre  $\pm$  SEM (n=3) est identique chez les deux souches de rats (E).

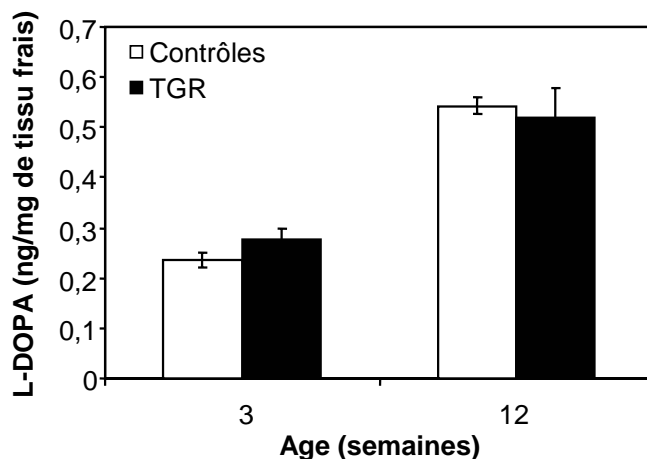
Comme au niveau du NTS, une restauration complète de la distribution et de la densité des éléments TH-immunopositifs est observée chez les rats TGR adultes, par comparaison avec les rats contrôles, au niveau de la medulla ventrolatérale (Figure III-8C,D).

### III-2.8. Mesure de l'activité enzymatique *in vivo* de la TH au niveau du NTS des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 3 et 12 semaines

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence qu'il existe une forte augmentation de la concentration tissulaire de noradrénaline dans le NTS chez les rats TGR par rapport à leurs contrôles à 3, 7 et 12 semaines. Ces perturbations apparentes de la neurotransmission noradrénergique locale ne semblent pas être en relation avec une modification de l'expression de la TH, mais pourraient néanmoins résulter d'une modification de l'activité enzymatique de la protéine chez les rats TGR. Afin de tester cette hypothèse, nous nous sommes placés aux âges encadrant ces perturbations, à 3 et 12 semaines, et avons mesuré cette variable chez les deux souches de rats.

Des rats contrôles et transgéniques ont été traités par voie intra-péritonéale (100 mg/kg) au NSD-1015 (3-hydroxybenzylhydrazine dihydrochloride ; Sigma), qui est un inhibiteur de la de la DOPA décarboxylase (DDC), afin de mesurer l'activité de la protéine TH *in vivo*. Chez ces rats, une accumulation de L-DOPA est observée dans les structures catécholaminergiques, strictement dépendante de l'activité spécifique de la TH jusqu'à la 30<sup>ème</sup> minute post-injection (Lachuer et al, 1991). Les rats servant à ces expérimentations ont ainsi reçu une injection intra-péritonéale unique d'une solution de NSD-1015 puis ont été décapités 20 minutes après l'injection.

Nous avons mis en évidence que l'activité spécifique *in vivo* de la TH est identique entre les deux souches de rats à 3 semaines et à 12 semaines (Figure III-12).



**Figure III-12 : Activité enzymatique *in vivo* de la TH au niveau du NTS chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 3 et 12 semaines.**

L'amplitude de l'accumulation tissulaire de L-DOPA, mesurée chez des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 3 et de 12 semaines par HPLC-ED, 20 minutes après une injection intra-péritonéale de NSD-1015, constitue un reflet fiable de l'activité enzymatique de la TH. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM (n= 5 à 7) de la concentration tissulaire de L-DOPA mesurée.

---

### ***II-3. Discussion***

Le phénotype TH est soumis à une forte plasticité au cours du développement postnatal, et ceci durant une fenêtre temporelle bien définie : la 4<sup>ème</sup> semaine. En effet, nous avons pu montrer une forte augmentation de la présence de protéine TH dans le NTS durant cette période. Ce phénomène se déroulerait non pas dans les corps cellulaires des neurones du NTS, mais dans les prolongements neuronaux catécholaminergiques localisés à proximité de ces neurones. La 4<sup>ème</sup> semaine postnatale semble ainsi représenter une étape clé de la mise en place du phénotype TH dans cette structure. Parmi les acteurs participant potentiellement à ce phénomène, nous avons privilégié la piste du système angiotensinergique cérébral. En effet, une série d'études assez récentes, réalisées *in vitro* sur des neurones noradrénergiques en culture provenant d'hypothalamus et de troncs cérébraux de rats nouveaux-nés, a mis en évidence que l'Ang II représente un puissant inducteur non seulement de l'expression de la TH, de la dopamine- $\beta$ -hydroxylase et du transporteur de la noradrénaline (Yu et al., 1996 ; Lu et al., 1996), mais également du transport de ces protéines dans les prolongements neuritiques des neurones noradrénergiques (Lu et al., 1998 ; Yang et al., 2002).

Au cours de cette étude, nous avons montré que l'invalidation spécifique de la synthèse des angiotensines cérébrales chez le rat est associée à une inhibition de l'augmentation de la présence de la protéine TH et de l'ARNm-TH observée au niveau du NTS dans les conditions contrôles durant la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale. Par ailleurs, nos résultats montrent très clairement que se sont les prolongements neuronaux catécholaminergiques qui sont touchés spécifiquement par ce phénomène.

#### **Considérations à propos de la souche de rat étudiée**

Afin d'étudier l'implication du système angiotensinergique cérébral sur la plasticité du phénotype TH chez le rat au niveau du NTS, nous avons choisi d'étudier le rat TGR(ASrAOGEN)680 (TGR). Cette souche de rat représente le seul modèle animal existant à l'heure actuelle d'invalidation spécifique du système angiotensinergique cérébral. Dans le cadre de notre étude, nous avons pour la première fois mis en évidence que le transgène antisens de l'AOGEN (AS) est exprimé tout au long du développement postnatal au niveau du NTS chez ces rats. Ainsi, notre observation suggère que l'inhibition de la synthèse de l'AOGEN astrocytaire serait en place chez ces rats dès le développement postnatal précoce. Ce résultat est cohérent avec le fait que la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP), activant la transcription du transgène, est exprimée dès la fin du développement embryonnaire chez le rat (Sancho-Tello et al., 1995). Toutefois, seule une mesure de la concentration en

angiotensines pourra conclure sur la capacité de l'expression du transgène à inhiber la synthèse de ces peptides au niveau du NTS durant la période postnatale. Malheureusement, très peu de laboratoires sont capables de doser les angiotensines dans le tissu cérébral, et il n'existe par ailleurs que très peu d'anticorps commercialisés.

Les rats TGR adultes présentent certains signes d'une altération du contrôle central de la fonction cardiovasculaire. En effet, ces rats sont caractérisés par une pression artérielle diminuée de manière chronique, ainsi qu'une sensibilité du baroréflexe cardiaque augmentée (Schinke et al., 1999 ; Baltatu et al., 2001). Ces modifications profondes de la fonction cardiovasculaire peuvent être expérimentalement induites par une injection de noradrénaline dans le NTS chez le rat (De Jong et Nijkamp, 1976), ce qui suggère que les altérations de la fonction cardiovasculaire observées chez ce rat à l'âge adulte seraient en partie liées à une présence augmentée de noradrénaline dans le NTS, phénomène que nous avons pu mettre en évidence au cours de ce travail de thèse (un excédent d'environ 20 % de noradrénaline tissulaire à l'âge adulte).

### **Altérations de la mise en place postnatale du phénotype TH chez les rats TGR(ASrAOGEN)680**

L'augmentation de la quantité de protéine TH et de la quantité d'ARNm-TH, se déroulant initialement dans le NTS chez les animaux contrôles entre 3 et 4 semaines, n'est observée chez les rats TGR qu'entre 4 et 7 semaines. L'appauvrissement en protéine TH dans le NTS des rats TGR âgés de 4 semaines qui résulte de ce phénomène pourrait ainsi être la conséquence soit d'une diminution globale de l'expression du gène codant pour la TH, soit d'une répression totale de ce gène dans certaines cellules du NTS.

Nous avons également mis en évidence au cours de cette étude que la diminution de la présence de TH observée à 4 semaines chez les rats TGR par rapport aux conditions contrôles est localisée spécifiquement dans les prolongements neuritiques présents dans la région du NTS, plus précisément au niveau du noyau réticulaire intermédiaire. Dans cette région cérébrale sont observés des prolongements neuronaux très nombreux, notamment issus des neurones du NTS et orientés en direction de la medulla ventrolatérale (VLM). Le même type d'altération de la distribution neuronale de la TH a été observé dans la VLM à ce stade du développement chez les rats TGR. Ces observations suggèrent l'hypothèse selon laquelle le processus de transport de la protéine TH dans les prolongements des neurones catécholaminergiques pourrait être inhibé chez les rats TGR à 4 semaines. Cette hypothèse est fortement étayée par les études réalisées par Raizada et collaborateurs, montrant que les

angiotensines sont de forts inducteurs du transport de la TH dans les prolongements des neurones noradrénergiques en culture (Lu et al., 1998).

D'un point de vue strictement technique, il est très difficile d'étudier le phénomène de transport de la protéine TH dans les prolongements des neurones du NTS *in vivo*. En effet, s'il est vrai qu'un double marquage « protéine TH / marqueur général des prolongements neuronaux » dans la région du NTS est envisageable, la densité des prolongements neuronaux présents dans le NTS et ses aires de terminaison est trop intense pour pouvoir analyser finement la répartition et la densité des éléments doublement marqués. Cette difficulté est très bien illustrée par le marquage intense des éléments neuronaux contenant la protéine MAP2 à 4 semaines dans la région bulbaire. Une technique qui pourrait néanmoins aider à répondre à cette question serait l'injection locale de biocytine, qui est un marqueur du transport antérograde. L'injection de ce traceur dans un seul neurone du NTS, préalablement repéré électrophysiologiquement par rapport à sa fréquence électrique de décharge spontanée, pourrait permettre d'observer le processus de transport protéique dans les prolongements des neurones chez les deux souches de rats. Néanmoins, cette technique est très difficile à mettre en place et manque encore de reproductibilité.

A l'âge adulte, il semble qu'un certain nombre de facteurs endogènes au NTS aient permis de restaurer le phénotype TH dans le NTS et la VLM chez les rats TGR adultes. Ces facteurs restent toutefois à définir. Par ailleurs, malgré l'apparente restauration du phénotype TH que nous avons observée dans la région du NTS chez les rats TGR, l'intégrité du système de neurotransmission noradrénergique bulbaire reste à évaluer à l'âge adulte.

### **Altérations de la mise en place postnatale du phénotype noradrénergique chez les rats TGR(ASrAOGEN)680**

Un fort excédent de noradrénaline a été observé à 3, 7 et 12 semaines au niveau du NTS des rats TGR, par rapport aux conditions contrôles. Ce phénomène n'est lié ni à une altération des niveaux d'ARNm-TH et de protéine TH, ni à une altération de l'activité enzymatique de la protéine TH (à 3 et 12 semaines). L'excédent de noradrénaline tissulaire mesuré dans le NTS des rats TGR ne serait donc pas directement lié à une altération du phénotype TH à ces stades du développement, et pourrait ainsi être la conséquence d'une diminution de la clairance du neurotransmetteur, et/ou d'une augmentation de la libération ou du stockage de ce dernier par rapport aux conditions contrôles.

Si l'excédent de noradrénaline observé chez les rats TGR adultes (12 semaines) correspond à une augmentation de la présence du neurotransmetteur dans le milieu extracellulaire, une modification de la stimulation des récepteurs adrénergiques exprimés par

les cellules du NTS pourrait se produire. Cette modification pourrait s'exprimer soit sous la forme d'une activation soutenue des récepteurs, soit par une désensibilisation de ces récepteurs à la noradrénaline, et donc sous la forme d'une diminution de la stimulation de ces derniers. Un tel phénomène pourrait dans ces deux cas provoquer une forte modification de l'activité des populations neuronales présentes dans le NTS, et ainsi altérer les fonctions physiologiques dont ils ont la charge, en particulier la fonction cardiovasculaire.

Il est maintenant accepté que le système angiotensinergique cérébral et le système noradrénergique localisés au sein du NTS sont étroitement impliqués dans la régulation centrale de la fonction cardiovasculaire. De récentes études réalisées *in vitro* suggèrent en réalité l'existence d'une synergie entre ces deux systèmes dans le cadre de la régulation de cette grande fonction physiologique. En effet, les neurones catécholaminergiques présents au niveau du NTS possèdent de grandes quantités de récepteurs AT<sub>1</sub> (Yang et al., 1997), dont l'activation entraînerait une augmentation de l'expression de la TH au niveau de cellules noradrénergiques (Yu et al., 1996), et très probablement une augmentation de la synthèse de noradrénaline. Ainsi, toute modification de la présence d'angiotensines dans la région de la medulla oblongata perturberait la quantité de noradrénaline produite au niveau du NTS, et modulerait ainsi la fonction cardiovasculaire (De Jong et Nijkamp, 1976 ; Korner et al., 1987). Notre étude met en évidence pour la première fois *in vivo* que l'appauvrissement central en angiotensines au cours du développement postnatal modifie la maturation du phénotype noradrénergique au niveau du NTS et serait liée au développement de pathologies cardiovasculaires, confortant les hypothèses formulées *in vitro*.

#### ***II-4. Conclusions***

La déplétion centrale en AOPEN est accompagnée d'une altération de la mise en place des phénotypes TH et noradrénergique chez le rat TGR au cours du développement postnatal dans la région du NTS.

L'altération du phénotype TH observée chez les rats TGR serait caractérisée par une inhibition durant la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale des processus d'expression et de transport neuritique de la protéine TH dans les prolongements des neurones catécholaminergiques du NTS. L'étude de la distribution et de l'expression de marqueurs spécifiques des neurones et des astrocytes à 4 semaines ne montrent pas de modifications chez les rats TGR, suggérant que ces altérations sont spécifiques des neurones catécholaminergiques, et pourraient donc

être directement liées à la déplétion centrale en angiotensines. Nos observations incitent donc à penser que les angiotensines seraient impliquées *in vivo* dans l'augmentation de la présence de la protéine TH observée dans le NTS chez le rat durant la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale, en stimulant l'expression du gène codant pour la TH, et en stimulant l'export de la protéine vers les neurites des neurones catécholaminergiques.

L'altération du phénotype noradrénergique est notamment caractérisée par un excédent de noradrénaline dans le NTS des rats TGR à l'âge adulte. Cette accumulation de noradrénaline pourrait être principalement localisée dans le compartiment extracellulaire du NTS et participer au dysfonctionnement de la fonction cardiovasculaire observé chez les rats TGR adultes. Toutefois, cette hypothèse reste à vérifier à l'aide d'une technique permettant de mesurer précisément les taux extracellulaires de noradrénaline, comme la microdialyse intracérébrale.

Notre étude a pu révéler que l'ontogenèse de la quantité de protéine TH est similaire au niveau du NTS et du LC chez le rat au cours de la période postnatale. Si, les mécanismes impliqués dans l'établissement postnatal du phénotype TH sont identiques dans les deux structures, il est alors largement envisageable que les fluctuations développementales des quantités d'ARNm- et de protéine- TH, ainsi que de la concentration tissulaire en noradrénaline, soient perturbées au niveau du LC chez les rats TGR, comme nous avons pu le montrer au niveau du NTS. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que le LC est une structure centrale exprimant une quantité très importante de récepteurs aux angiotensines (pour revue, voir Wright et Harding, 1997). De plus, il a pu être montré qu'une injection intracérébroventriculaire d'angiotensine II modifie le taux de renouvellement de la noradrénaline dans cette structure (Sumners et Phillips, 1983).



---

### **III- ALTERATION DE LA MISE EN PLACE ET DE LA MATURATION DU PHENOTYPE TYROSINE HYDROXYLASE DANS LES NEURONES COERULEENS DES RATS TGR (ASrAOGEN)680.**

L'inhibition de la synthèse astrocytaire d'AOGEN chez les rats TGR entraîne un retard dans l'augmentation de la quantité de TH dans le NTS, normalement observée chez les rats contrôles au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale. Etant donné que les étapes de la mise en place postnatale de la quantité de protéine TH sont similaires dans le NTS et le LC (voir partie I), il est probable qu'une altération de la mise en place du phénotype TH puisse également se produire au cours du développement postnatal au niveau du LC chez les rats TGR(ASrAOGEN)680.

Le LC s'avère être une structure particulièrement sensible aux angiotensines cérébrales. En effet, une injection intracérébroventriculaire d'angiotensine II (Ang II) modifie fortement le taux de renouvellement de la noradrénaline dans cette structure chez le rat adulte (Sumners et Phillips, 1983). Cette particularité lui est en partie conférée par la présence d'une forte densité de récepteurs AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> et probablement AT<sub>4</sub> aux angiotensines (Speth et al., 1991 ; Lenkei et al., 1998 ; von Bohlen und Halbach, 2003). La région du LC contient non seulement des récepteurs aux angiotensines, mais exprime aussi de l'AOGEN, le seul précurseur connu des angiotensines, et de l'Ang II, durant l'intégralité du développement postnatal (Meyer et al., 1990 ; Chai et al., 1993 ; Mungall et al., 1995). Ainsi, la maturation postnatale du phénotype TH pourrait être en partie contrôlée au niveau de cette structure, comme au niveau du NTS, par les angiotensines cérébrales produites localement.

Les études réalisées *in vitro* sur cultures de neurones noradrénergiques ont mis en évidence que l'Ang II stimule non seulement l'expression de la TH, de la dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH) et du transporteur membranaire de la noradrénaline (NET), mais également le transport neuritique de ces trois protéines clés du métabolisme noradrénergique (voir pour revue Gelband et al., 1997). Ce dernier phénomène est lié à la stimulation de la phosphorylation d'une protéine intracytoplasmique, la protéine myristoylée riche en alanine et substrat de la protéine kinase C (MARCKS) (Lu et al., 1998 ; Yang et al., 2002), qui est présente *in vivo* dans le SNC en particulier au niveau du LC (Ouimet et al., 1990 ; Hamada et

al., 2003). Si la déplétion centrale en angiotensines est liée à une altération de l'expression et du transport axonal et/ou dendritique de la TH au niveau du LC au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale, l'expression de la DBH et du NET, ainsi que la phosphorylation de MARCKS devraient probablement être également altérées.

Dans un premier temps, afin d'évaluer l'implication des angiotensines cérébrales dans la mise en place postnatale du phénotype TH au niveau du LC, les variables initialement étudiées chez les animaux contrôles (quantités de protéine et d'ARNm-TH, concentration tissulaire de noradrénaline) ont été mesurées chez les rats TGR aux mêmes stades du développement. Nous avons également mesuré l'expression des ARNm-NET et -DBH. Enfin, afin de spécifier les processus par lesquels la déplétion centrale en angiotensines modifie l'établissement du phénotype TH au niveau du LC, et sur la base des résultats acquis *in vitro*, nous avons analysé les distributions *in situ* des protéines TH et MARCKS-phosphorylée dans les neurones coeruleins, à certains stades critiques du développement.

### ***III-1. Protocole expérimental***

Les mesures des quantités d'ARNm-TH et de protéine TH au cours du développement ont été réalisées respectivement à l'aide d'une technique de RT-PCR en « point final » et de détection immunoradiographique sur homogénat tissulaire. La concentration tissulaire en noradrénaline a été dosée par une technique d'HPLC-ED.

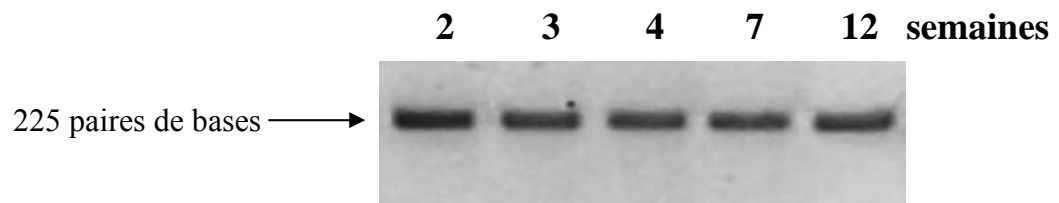
La détection et la quantification des ARNm-NET, -DBH au niveau du LC des rats ont été réalisées à l'aide de techniques de RT calibrée et de PCR en temps réel.

La détection *in situ* de la TH a été réalisée à l'aide d'une technique immunohistochimique colorimétrique. Une double détection immunohistofluorescente a été réalisée afin de détecter la présence de la protéine MARCKS sous sa forme phosphorylée dans les neurones exprimant la TH. Cette technique a nécessité l'utilisation d'anticorps secondaires fluorescents, afin de pouvoir aisément obtenir une superposition des marquages obtenus pour chaque protéine, à l'aide d'un microscope confocal.

### III-2. Résultats

#### III-2.1. Présence de l'ARN-antisens au cours du développement postnatal dans le LC des rats TGR(ASrAOGEN)680

L'ARN-antisens est détecté après RT-PCR en « point final » au niveau du LC des rats TGR à 2, 3, 4, 7 et 12 semaines, indiquant que le transgène est exprimé à tous les stades du développement postnatal étudiés (Figure III-13).



**Figure III-13. : Expression de l'ARN-antisens au cours du développement postnatal chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 au niveau du LC.**

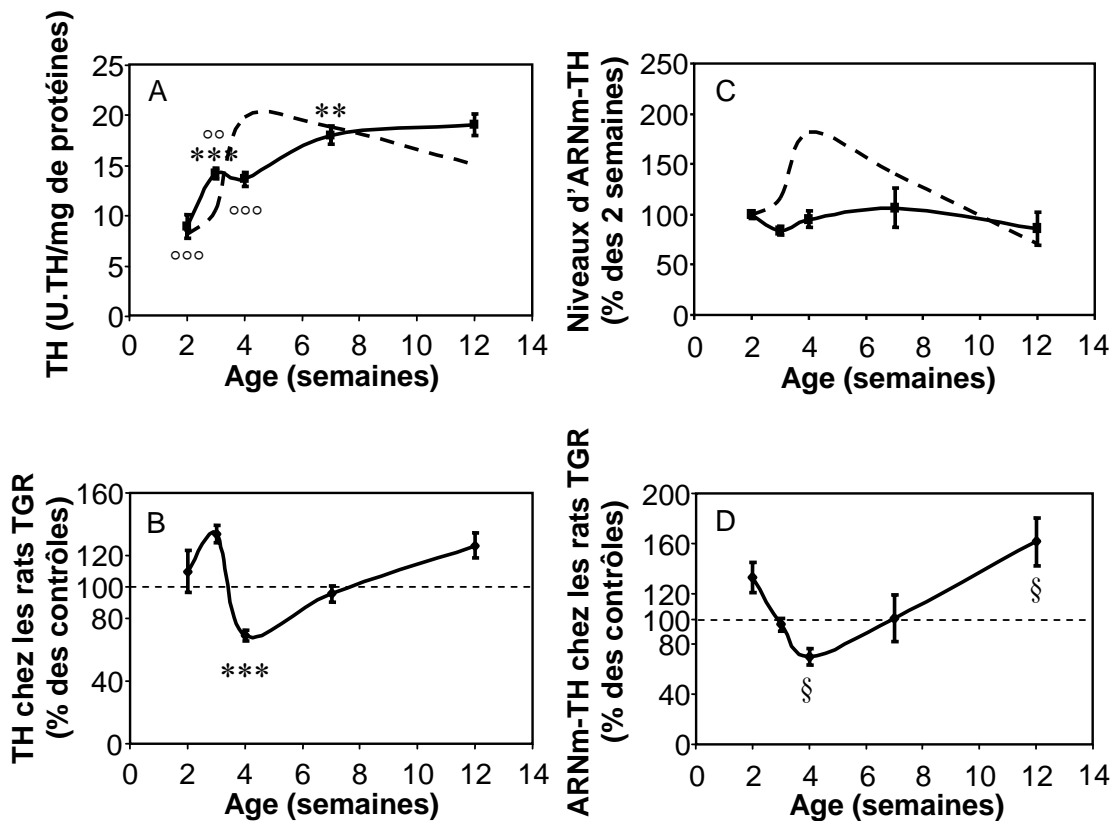
L'ARN codant pour l'antisens de l'angiotensinogène a été rétro-transcrit en ADN à partir d'échantillons d'ARN totaux extraits d'homogénats de LC de rats âgés de 2, 3, 4, 7 et 12 semaines, puis amplifié par la technique de PCR en « point final ». Les produits d'amplification par PCR ont migré par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium. Le gel a ensuite été numérisé sous rayonnement ultra-violet grâce à un système d'analyse de gels. L'ARN-antisens est exprimé dans le LC à tous les stades étudiés.

#### III-2.2. Mise en place de l'expression de la TH dans le LC

##### III-2.2.1. Quantité de protéine TH

La quantité de protéine TH varie significativement entre 2 et 12 semaines ( $p < 0,001$  ; ANOVA I) dans le LC des rats TGR (Figure III-14A). Elle augmente en deux temps : entre 2 et 3 semaines, sa valeur est multipliée par un facteur 1,6, et entre 4 et 12 semaines, par un facteur 1,3. Ces deux périodes, lors desquelles la quantité de TH augmente, sont séparées par un période de stabilité transitoire.

Les profils de mise en place ontogénique de la quantité de TH chez les deux souches de rats ne semblent pas statistiquement différents ( $p < 0,708$  ; ANOVA II). Néanmoins, des différences bien délimitées temporellement sont observées entre les deux souches de rats ( $p < 0,001$  ; interaction entre la souche de rat et le stade du développement ; ANOVA II). En effet, la quantité de TH dans le LC des rats TGR est diminuée d'environ 31 % à 4 semaines (Figure III-14B).



**Figure III-14 : Mise en place ontogénique des quantités de protéine et d'ARN messager TH dans le LC des rats TGR(ASrAOGEN)680.**

A. La concentration tissulaire en tyrosine hydroxylase (TH) a été mesurée dans le LC au cours du développement postnatal chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 (TGR) (trait plein) grâce à la technique de quantification sur tache. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  SEM (n=9 à 10) de la valeur obtenue pour chaque rat à chaque âge. Une trace de la courbe observée chez les rats contrôles, présentée sur la figure III-1B, est représentée en trait pointillé. Les variations postnatales de la quantité de protéine TH ont été testées à l'aide de l'ANOVA I suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. Comparaison entre un âge et l'âge précédent : \*\*\*p<0,001; Comparaison entre un âge et 12 semaines : °°p<0,01, °°°p<0,001.

B. Les valeurs présentées en A ont été exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour les rats contrôles aux mêmes âges. Les différences entre les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été testées à l'aide de l'ANOVA II suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \*\*\*p<0,001.

C. Le niveau d'ARNm-TH a été mesuré dans le LC au cours du développement postnatal chez les rats TGR (trait plein) grâce à une technique de RT-PCR en « point final ». Les valeurs pour chaque âge ont été exprimées en pourcentage de la valeur moyenne obtenue à 2 semaines. Chaque point correspond à la moyenne  $\pm$  SEM (n=3 à 5) de la valeur obtenue pour chaque rat à chaque âge. Une trace de la courbe observée chez les rats contrôles, présentée sur la figure III-1D, est représentée en trait pointillé. Les variations postnatales de la quantité d'ARNm-TH ont été testées à l'aide de l'ANOVA I suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls.

D. Les valeurs présentées en C ont été exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour les rats contrôles aux mêmes âges. Les différences entre les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été testées à l'aide de l'ANOVA II suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. Ce test n'a pu mettre en évidence une différence entre les deux souches de rats. Ce résultat semble dû à la faiblesse du nombre d'échantillons. Néanmoins, un test *t* de Student a permis de mettre en relief une différence significative entre les deux souches de rats à 4 et 12 semaines. §p<0,05.

### III-2.2.2. Niveau d'expression de l'ARNm-TH

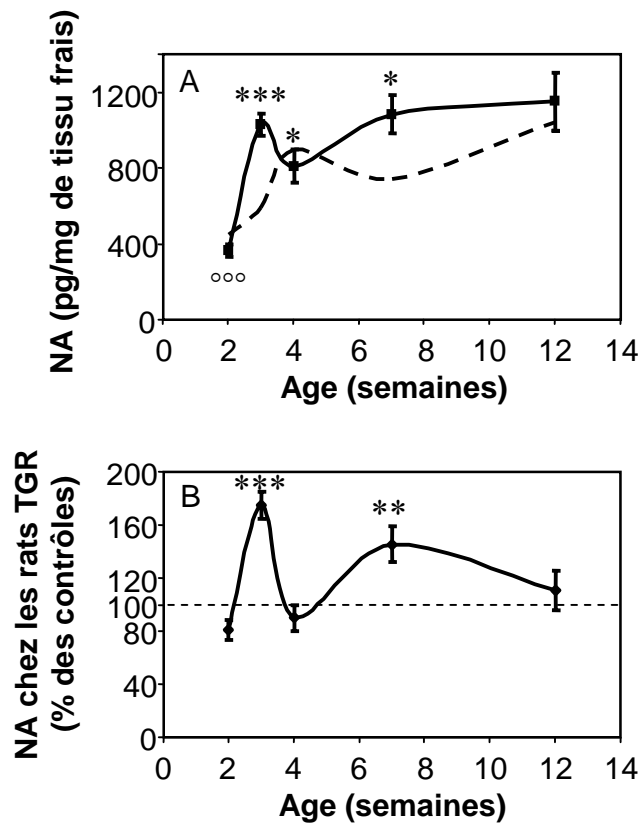
L'analyse statistique de l'évolution postnatale de la quantité d'ARNm-TH dans le LC ne montre pas de variation au cours du développement (Figure III-14C).

Les profils de mise en place ontogénique de la quantité d'ARNm-TH chez les deux souches de rats ne semblent pas significativement différents ( $p < 0,666$  ; ANOVA II) (Figure III-14D). Par ailleurs, il ne semble pas qu'il y ait de modifications temporellement définies de cette variable chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 ( $p < 0,192$  ; interaction entre la souche de rat et le stade du développement ; ANOVA II). Toutefois, le faible nombre d'échantillons ( $n=3-4$ ) pourrait expliquer le manque de significativité des différences, pourtant visuellement présentes, entre les valeurs obtenues pour les deux souches de rats. En ne tenant compte que des valeurs obtenues chez les rats contrôles et les rats transgéniques à 4 semaines, un test *t* de Student met en évidence une diminution significative ( $p < 0,047$ ) de la quantité d'ARNm-TH chez les rats TGR par rapport à leurs contrôles. Cette diminution est de l'ordre de 30 % comme cela a été observé précédemment à ce stade du développement pour la concentration tissulaire de TH. De plus, le test *t* de Student permet de mettre en évidence une quantité fortement augmentée d'ARNm-TH chez les rats TGR adultes, de l'ordre de 61 % ( $p=0,022$ ).

### III-2.3. Mise en place de la concentration tissulaire de noradrénaline dans le NTS des rats TGR

Le profil ontogénique de la concentration tissulaire de noradrénaline au niveau du LC (Figure III-15A) varie significativement ( $p < 0,001$  ; ANOVA I) au cours du développement postnatal. Il est caractérisé par deux phases d'augmentation : une phase précoce entre 2 et 3 semaines, lors de laquelle la concentration tissulaire en noradrénaline augmente d'environ 183 %, et une phase plus tardive entre 4 et 7 semaines, lors de laquelle la concentration tissulaire en noradrénaline augmente d'environ 34 %. Ces deux phases d'augmentation sont séparées par une période durant laquelle la concentration tissulaire en noradrénaline diminue de l'ordre de 22 %. La concentration tissulaire en noradrénaline se stabilise au-delà de la 7<sup>ème</sup> semaine.

Les profils de mise en place ontogénique de la concentration tissulaire de noradrénaline chez les deux souches de rats sont significativement différents ( $p=0,007$  ; ANOVA II). Les différences observées sont par ailleurs délimitées temporellement ( $p=0,002$  ; interaction entre la souche de rat et le stade du développement ; ANOVA II). En effet, la concentration tissulaire de noradrénaline dans le LC des rats TGR est augmentée d'environ 75 et 45 % respectivement à 3 semaines et 7 semaines (Figure III-15B) par rapport aux conditions contrôles.



**Figure III-15 : Mise en place ontogénique de la concentration en noradrénaline dans le LC des rats TGR(ASrAOGEN)680.**

A. La concentration en noradrénaline (NA) a été mesurée dans le LC au cours du développement postnatal chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 (TGR) (trait plein) grâce à une technique d'HPLC-ED. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  SEM (n=8 à 10) de la valeur obtenue pour chaque rat à chaque âge. Une trace de la courbe observée chez les rats contrôles, présentée sur la figure III-3B, est présentée en trait pointillé. Les variations postnatales de la concentration en NA ont été testées à l'aide de l'ANOVA I suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. Comparaison entre un âge et l'âge précédent : \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Comparaison entre un âge et 12 semaines :  $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$ .

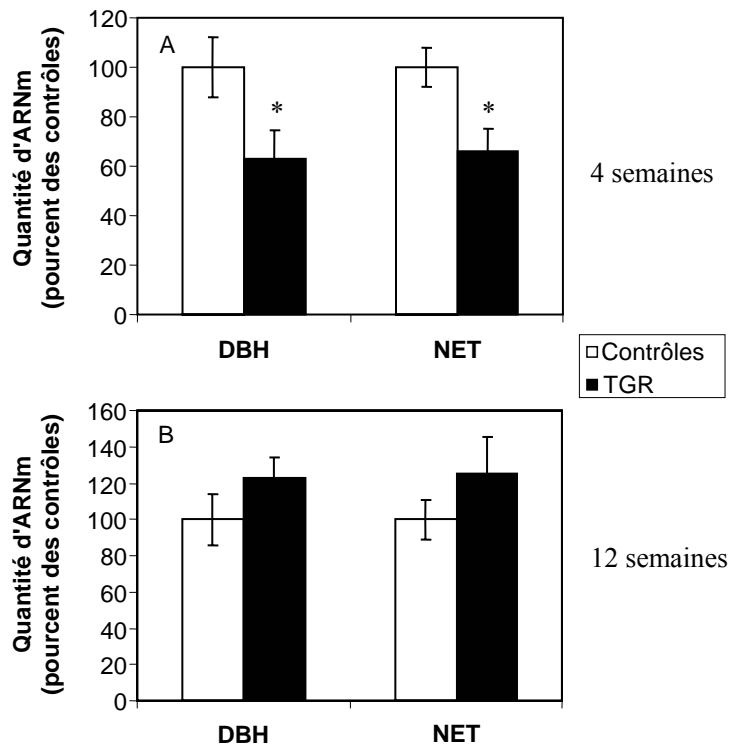
B. Les valeurs présentées en A ont été exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour les rats contrôles aux mêmes âges. Les différences entre les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été testées à l'aide de l'ANOVA II suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### III-2.4. Expressions des gènes codants pour la dopamine- $\beta$ -hydroxylase et le transporteur de la noradrénaline dans le LC des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 et 12 semaines

Les quantités d'ARNm codants pour la dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH) et le transporteur de la noradrénaline (NET) ont été mesurées au niveau du LC chez les deux souches de rats à 4 et 12 semaines, étant donné qu'une altération de l'expression de l'ARNm-TH a été observée chez les rats TGR à ces stades du développement.

Les quantités d'ARNm-DBH et -NET chez les rats TGR âgés de 4 semaines sont diminuées par rapport à leurs contrôles, respectivement 31 et 34 % ( $p < 0,05$  ; test *t* de Student) (Figure III-16A). Pour rappel, c'est à cet âge bien précis que la quantité d'ARNm-TH est diminuée chez les rats TGR d'environ 30 % (Figure III-14D).

A l'âge adulte, les quantités d'ARNm-DBH et -NET au niveau du LC des rats TGR semblent identiques à celles mesurées chez les rats contrôles (Figure III-16B), alors même qu'à cet âge, la quantité d'ARNm-TH est augmentée d'environ 62 % chez les rats TGR (Figure III-14D).



**Figure III-16 : Mesure des quantités d'ARNm codants pour la dopamine-β-hydroxylase et le transporteur de la noradrénaline dans le LC des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 et 12 semaines.**

Les quantités d'ARNm codants pour la dopamine-β-hydroxylase (DBH) et le transporteur de la noradrénaline (NET) dans le LC à 4 (A) et 12 (B) semaines ont été mesurées à l'aide d'une toute récente technique de transcription inverse calibrée, couplée à une amplification quantitative des ADN complémentaires. Les valeurs obtenues ont été exprimées en pourcentage de la valeur moyenne obtenue pour les rats contrôles à chaque âge. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM (n = 4-5) des valeurs converties en pourcentage des contrôles. Les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été comparées à l'aide d'un test *t* de Student. \**p* < 0,05.

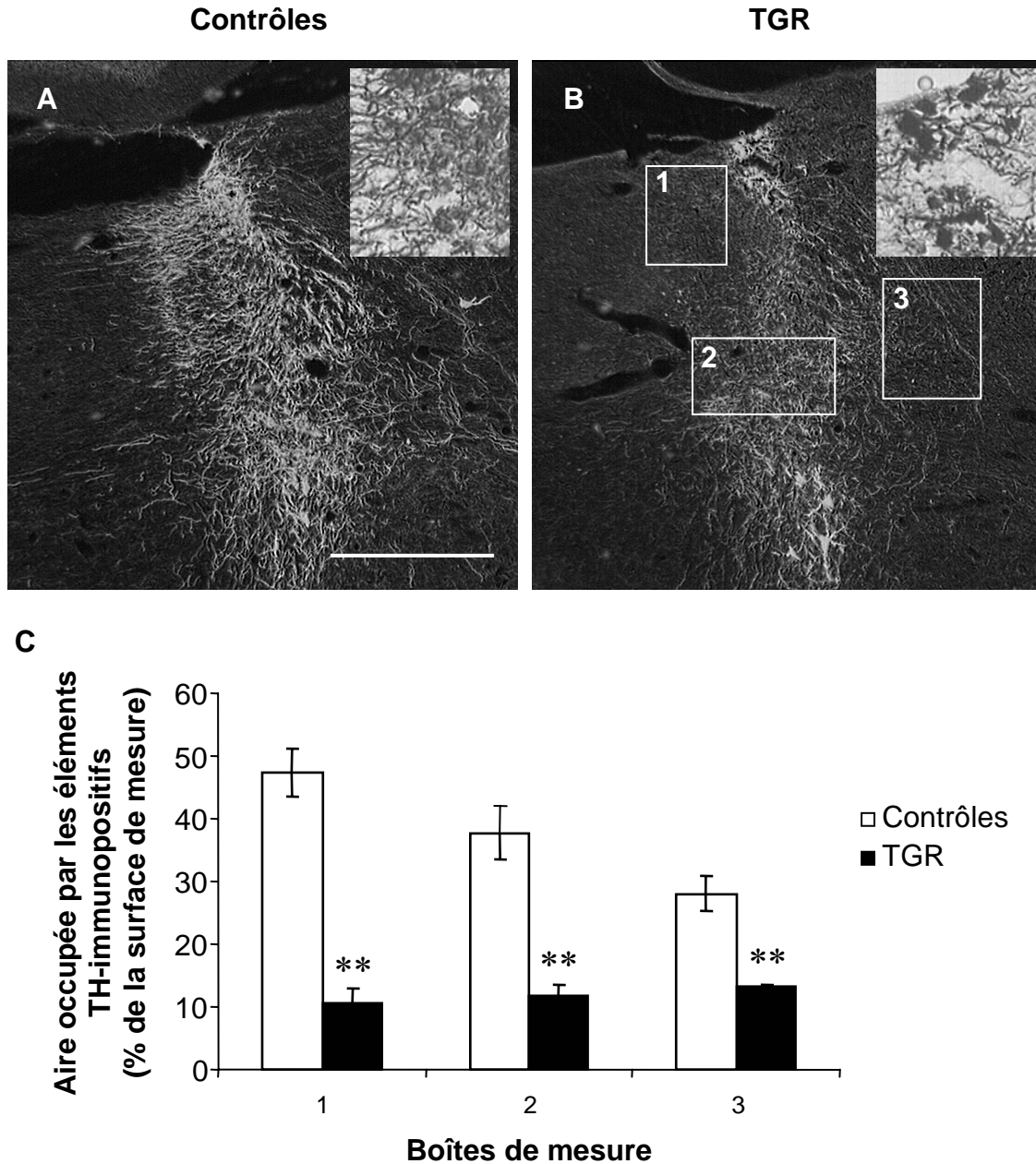
### III-2.5. Distribution de la TH dans les neurones du LC des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines

La détection *in situ* de la protéine TH a été réalisée à 4 semaines dans le LC des deux souches de rats, étant donné qu'une forte réduction de la présence de la protéine a été observée à ce stade du développement chez les rats TGR.

La protéine TH est observée au sein des neurones noradrénergiques du LC dans les conditions physiologiques « basales » dans trois compartiments cellulaires bien distincts : **les périkarya, les dendrites et les axones** (Pickel et al., 1975). Ces trois compartiments cellulaires sont très localisés dans le SNC. En effet, les périkarya TH-immunopositifs des neurones du LC sont observés dans la région pontique, en bordure du 4<sup>ème</sup> ventricule, et forment l'aire périkaryale du LC (APK). Les dendrites TH-immunopositifs des neurones du LC sont principalement localisés dans et en périphérie de l'APK, et délimitent une zone cérébrale très reproductible entre individus, appelée l'aire péricoeruléenne du LC (APC). Enfin, les axones TH-immunopositifs des neurones du LC sont observables dans différentes zones cérébrales précises, qui sont les aires de projection de ces neurones.

Au cours de notre étude, nous avons détecté la protéine non seulement au niveau de l'APK et l'APC, mais également au niveau de certaines aires de terminaison des neurones du LC, afin de pouvoir juger de la distribution de la protéine TH dans l'intégralité des

compartiments cellulaires des neurones du LC. Nous avons choisi d'observer la présence et la densité des éléments TH-immunopositifs au niveau de la couche moléculaire des cortex frontal et cingulaire, ainsi que le gyrus dentelé, qui sont des aires de projections principales des neurones coeruleins (Loughlin et Fallon, 1985 ; Jones, 1991).



**Figure III-17 : Détection immunohistochimique de la protéine TH dans la région du LC chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines.**

Au niveau du LC, le marquage immunohistochimique de la TH est observé chez les rats contrôles (A) dans les péricarya (encadré en haut à droite) et les prolongements neuronaux, contrairement aux rats transgéniques chez lesquels le marquage est principalement localisé dans les péricarya (B ; encadré en haut à droite). Une très forte diminution du marquage TH-immunopositif est observée dans les prolongements neuronaux chez les rats TG aussi bien de manière qualitative, que de manière quantitative par la mesure de la densité d'éléments TH-immunopositifs présents dans les zones 1, 2 et 3 (C). Les résultats exposés en C correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM (n=3) de la surface occupée par les éléments dont l'intensité est supérieure à la valeur du bruit de fond de la coupe, rapportée à la surface de la boîte de mesure. Les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été comparées à l'aide d'un test *t* de Student. \*\* $p < 0,01$ . Barre d'échelle = 500  $\mu$ m.



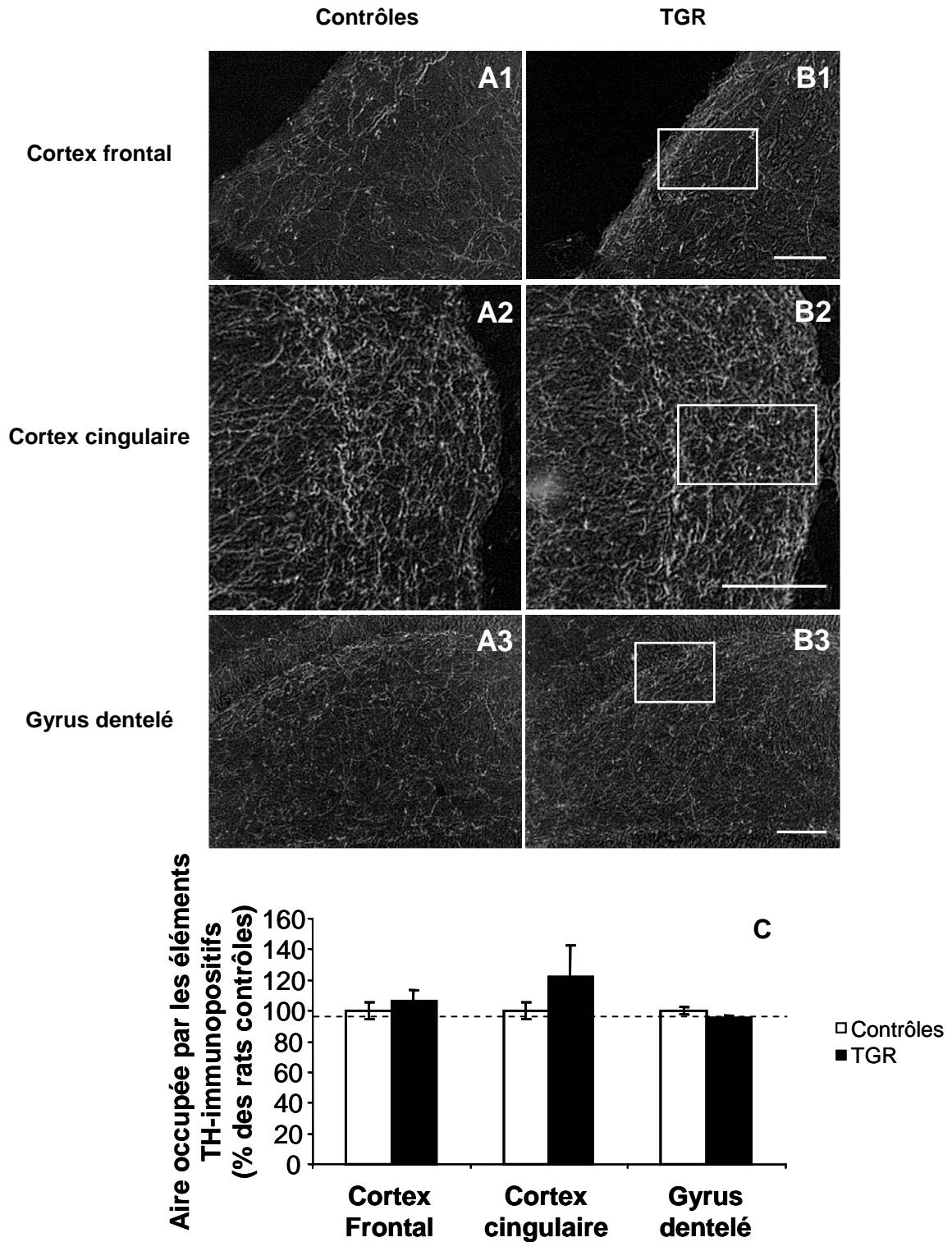
---

**III-2.5.1. Dans la région du LC**

Chez les rats contrôles, le marquage TH-immunopositif observé dans la région du LC à 4 semaines est localisé non seulement dans les corps cellulaires des neurones, mais également dans les prolongements neuronaux situés dans le neuropile péricoeruléen (Figure III-17A). Chez les rats TGR, le marquage immunohistochimique de la TH au niveau du LC est principalement localisé dans les corps cellulaires des neurones (Figure III-17B). D'un point de vue qualitatif, une très forte diminution de la densité de fibres immunomarquées pour la TH est observée chez les rats TGR (Figure III-17B) dans différentes régions pontiques contenant de grandes quantités de prolongements provenant des neurones du LC chez les rats contrôles (Figure III-17A). Cette observation est confirmée par la mesure de la densité d'éléments TH-immunopositifs dans ces zones (Figure III-17C), qui est diminuée en moyenne de 66 % par rapport aux valeurs mesurées chez les rats contrôles. Il est important de noter que le signal TH-immunopositif semble beaucoup plus concentré dans les corps cellulaires des neurones du LC chez les rats TGR par rapport aux contrôles (voir encadrés sur les figures III-17A et III-17B).

**III-2.5.2. Dans les aires de terminaison axonales des neurones du LC: le gyrus dentelé, et les cortex frontal et cingulaire**

La densité de prolongements TH-immunopositifs a également été appréhendée au niveau de certaines aires du SNC, principalement connues comme étant des aires de terminaisons pour les prolongements axonaux catécholaminergiques exclusivement d'origine coeruléenne. Les prolongements neuronaux observés au niveau du gyrus dentelé, et des couches moléculaires des cortex frontal et cingulaire sont presque exclusivement d'origine coeruléenne. Le marquage de la protéine TH dans ces régions démontre une forte innervation TH-immunopositive. Comme il peut être observé, il n'existe pas de différence nette de densité et de répartition de ces prolongements entre les rats contrôles et les rats TGR dans le cortex frontal (Figure III-18A1, B1), le cortex cingulaire (Figure III-18A2, B2) et le gyrus dentelé (Figure III-18A3, B3).

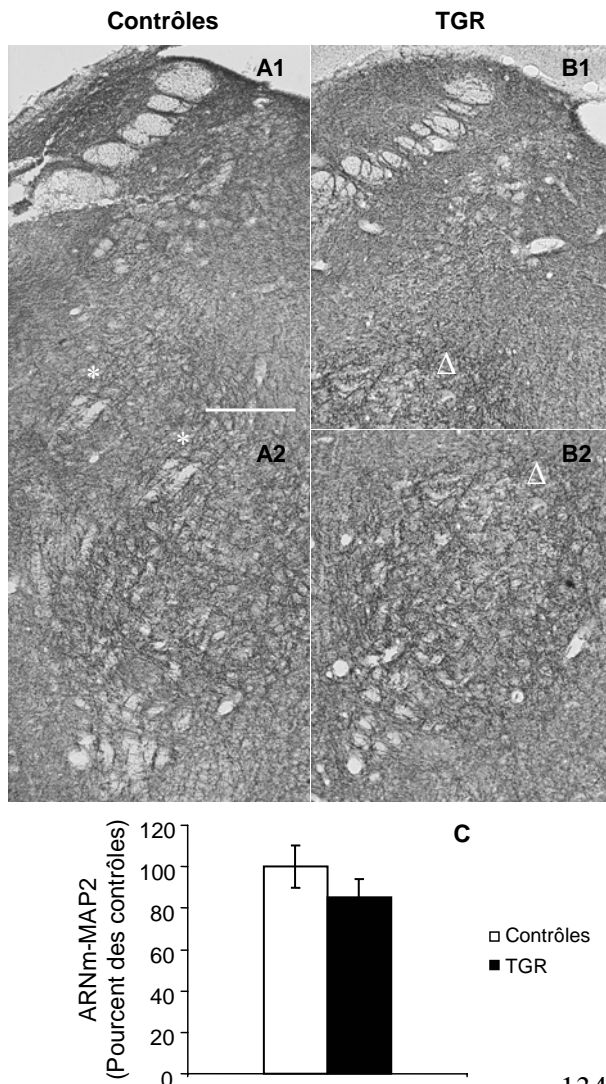


**Figure III-18 : Détection immunohistochemique de la protéine TH dans le cortex frontal, le cortex cingulaire et le gyrus dentelé chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines.**

Le marquage immunohistochemique de la TH est observé chez les rats contrôles (A) et les rats transgéniques (TGR) âgés de 4 semaines (B) exclusivement dans les prolongements neuronaux catécholaminergiques au niveau de la couche moléculaire du cortex frontal (A1, B1), du cortex cingulaire (A2, B2) et du gyrus dentelé (A3, B3). La distribution et la densité des éléments TH-immunopositifs est identique entre les deux souches de rats quelle que soit la structure considérée, observation confirmée par la mesure de la densité d'éléments TH-immunopositifs (C). Les résultats exposés en C correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM (n=4) de la surface occupée par les éléments dont l'intensité est supérieure à la valeur du bruit de fond de la coupe, rapportée à la surface de la boîte de mesure et exprimée en % des valeurs contrôles. Barres d'échelle : 100  $\mu$ m.

### III-2.6. Etude de la répartition et de l'expression de la protéine « microtubule associated protein 2 » au niveau du LC des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines

Comme pour le NTS, l'altération de la présence de la TH observée dans les prolongements neuronaux au niveau du LC des rats TGR à 4 semaines pourrait résulter d'une altération de la maturation de la population neuronale dans cette structure cérébrale. La détection immunohistochimique de MAP2 à 4 semaines dans le LC révèle un marquage d'une forte densité à la fois chez les rats contrôles et les rats TGR. Aucune différence qualitative de la densité ou de la répartition du marquage de la protéine MAP2 n'est observée entre les deux souches de rats que se soit dans la zone des corps cellulaires des neurones catécholaminergique du LC (Figure III-19A1,B1) ou dans une zone ventrale au LC contenant une forte densité de prolongements catécholaminergiques (Figure III-19A2,B2). Ce résultat est corroboré par l'absence de différence de quantité d'ARNm-MAP2 entre les deux souches de rats (Figure III-19C). Ces observations suggèrent que la diminution de la présence de la TH dans les prolongements neuritiques dans la région du LC n'est pas due à une altération de la maturation de la population neuronale chez les rats TGR.



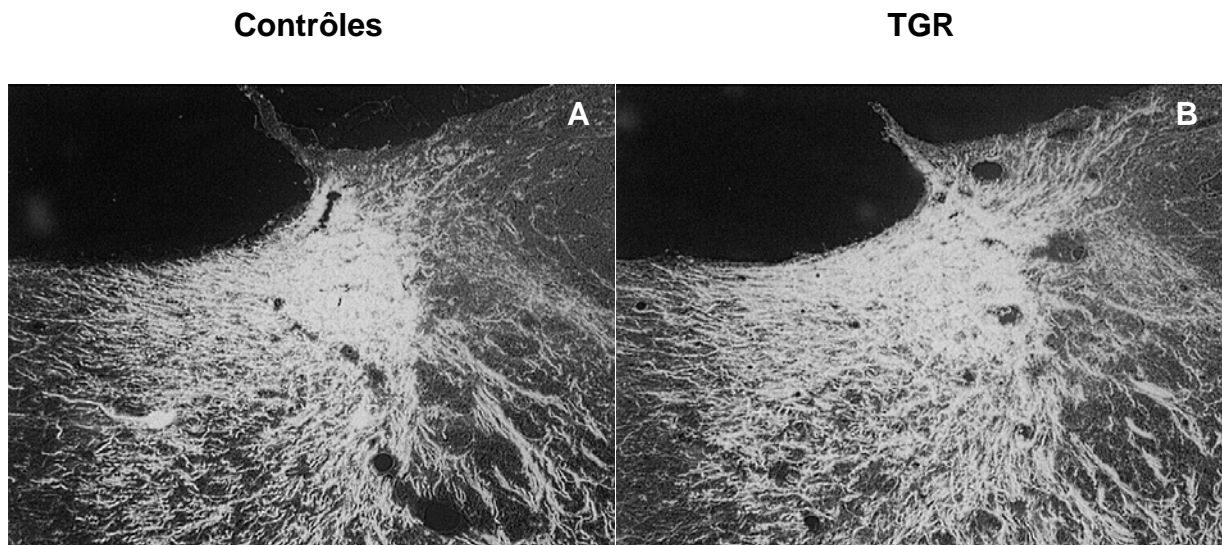
**Figure III-19 : Expression de la protéine « microtubule associated protein 2 » (MAP2) au niveau du LC des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines.**

La protéine MAP2, qui est un marqueur spécifique des neurones et en particulier de leurs prolongements, a été détectée au niveau du LC des rats contrôles (A) et transgéniques (TGR) (B) grâce à une technique de détection immunohistochimique colorimétrique. L'observation qualitative du marquage obtenu dans la région des péricarya du LC (A1, B1) ou à un niveau plus ventral (se repérer à l'aide de l'astérisque et du triangle), au niveau du neuropile péricoeruléen (A2, B2) ne met pas en évidence de différence nette de la densité et de la répartition du marquage entre les deux souches de rats. L'intégrité apparente des cellules MAP2-immunopositives est par ailleurs corroborée par le fait que la quantité d'ARNm codant pour la MAP2, mesurée à l'aide d'une technique de RT calibrée couplée à une technique de PCR quantitative et exprimée en pourcentage de la valeur moyenne calculée chez les rats contrôles, est identique chez les deux souches de rats (C). Barre d'échelle : 500  $\mu$ m (A1, B1), 250  $\mu$ m (A2, B2).

### III-2.7. Distribution de la TH dans les neurones LC des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 12 semaines

#### III-2.7.1. Dans la région du LC

Chez les rats contrôles et les rats TGR, le marquage TH-immunopositif observé dans la région du LC à 12 semaines est localisé dans les corps cellulaires des neurones, et également dans les prolongements neuritiques (Figure III-20). Il semblerait, d'un point de vue purement qualitatif, que le signal TH-immunopositif soit réparti de façon identique chez les deux souches de rats dans les différents compartiments des neurones du LC.

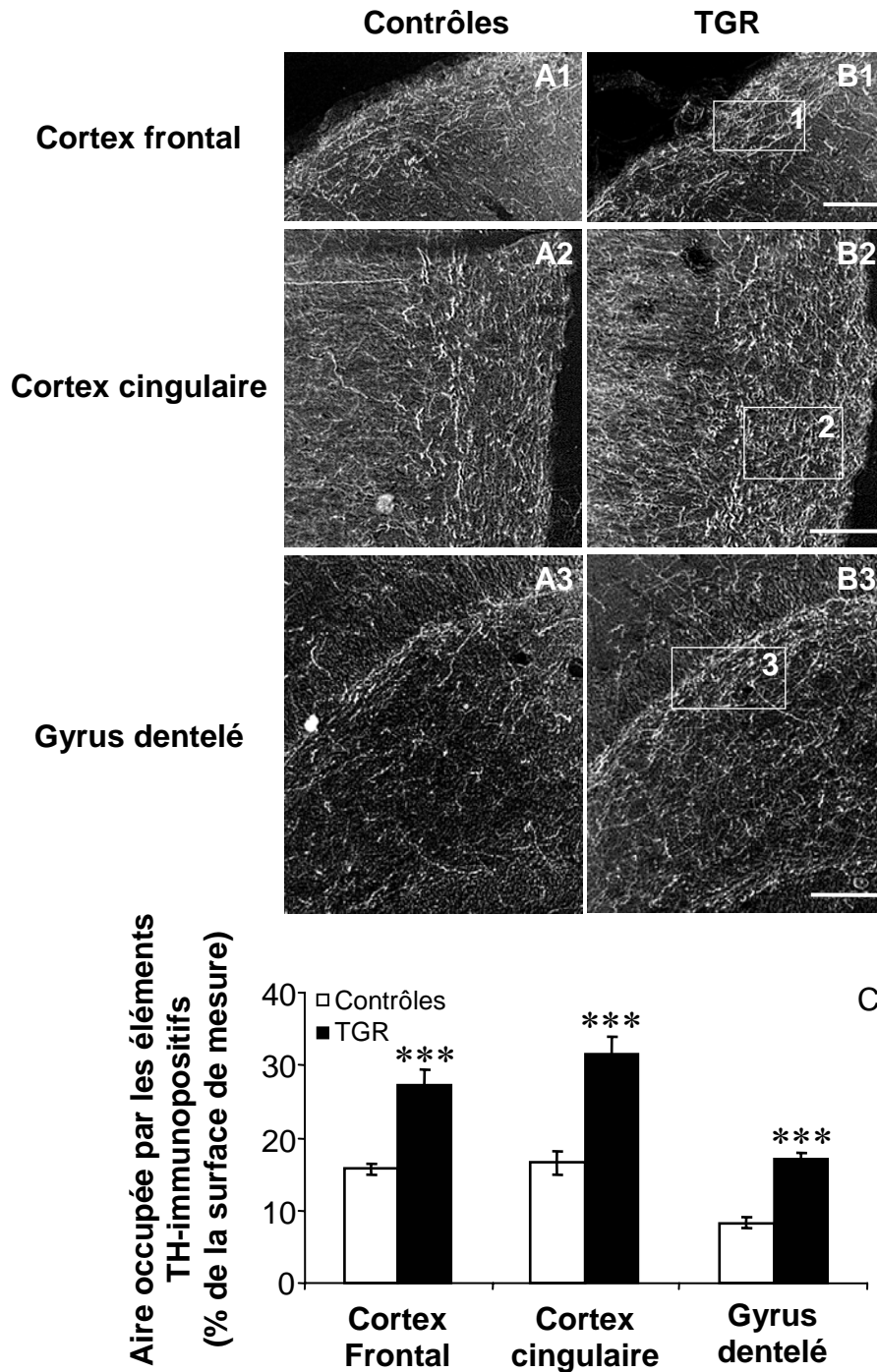


**Figure III-20 : Détection immunohistochimique de la protéine TH dans la région du LC chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 12 semaines.**

Au niveau du LC, le marquage immunohistochimique de la TH est observé chez les rats contrôles (A) et les rats transgéniques (TGR) (B) dans les périkarya et les prolongements neuronaux. De manière qualitative, la répartition de la protéine TH n'est pas différente entre les deux souches de rats.

#### III-2.7.2. Dans la région du cortex frontal, du cortex cingulaire et du gyrus dentelé

La densité du marquage TH-immunopositif est de manière qualitative très fortement augmentée dans le, cortex frontal (Figure III-21A1, B1), le cortex cingulaire (Figure III-21A2, B2) et le gyrus dentelé (Figure III-21A3, B3) chez les rats TGR adultes, par comparaison avec leurs contrôles. La densité de l'innervation TH-immunopositive est augmentée d'environ 74, 91 et 101 % respectivement au niveau du cortex frontal, du cortex cingulaire et du gyrus dentelé (Figure III-21C) après quantification de la densité des éléments marqués pour la TH.



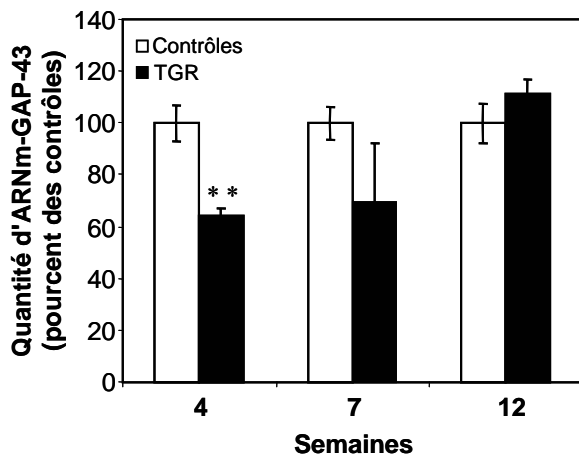
**Figure III-21 : Détection immunohistochimique de la protéine TH dans le cortex frontal, le cortex cingulaire et le gyrus dentelé chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 12 semaines.**

Le marquage immunohistochimique de la TH est observé chez les rats contrôles (A) et les rats transgéniques (TGR) (B) âgés de 12 semaines, exclusivement dans les prolongements neuronaux catécholaminergiques au niveau de la couche moléculaire du cortex frontal (A1, B1), du cortex cingulaire (A2, B2) et au niveau du gyrus dentelé (A3, B3). La mesure de la densité d'éléments TH-immunopositifs (C), réalisée dans des boîtes de mesures (1, 2 et 3) localisées en blanc dans chaque structure, a permis de mettre en évidence une très forte augmentation de l'innervation catécholaminergique de ces aires de terminaisons des neurones du LC chez les rats TGR par rapport aux contrôles. Les résultats exposés en C correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM (n=4) de la surface occupée par les éléments dont l'intensité est supérieure à la valeur du bruit de fond de la coupe, rapportée à la surface de la boîte de mesure. Les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été comparées à l'aide d'un test *t* de Student. \*\*\**p*<0,01. Barres d'échelle : 100  $\mu$ m.

### III-2.8. Expression du gène codant pour la « growth associated protein 43 » dans le LC des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4, 7 et 12 semaines

La quantité d'ARNm codant pour la « growth associated protein 43 » (GAP-43) a été mesurée au niveau du LC chez les deux souches de rats à 4, 7 et 12 semaines. La protéine résultant de la transcription de ce gène participe notamment aux phénomènes de croissance axonale au cours du développement et de bourgeonnement axonal dans certaines conditions physiopathologiques (Emery et al., 2003). Cette étude a ainsi été réalisée afin d'observer si une altération de pousse axonale est présente chez les rats TGR au cours du développement et pourrait expliquer l'hyper-innervation TH-immunopositive observée chez ces rats à l'âge adulte.

La quantité d'ARNm-GAP-43 est diminuée chez les rats TGR en comparaison des contrôles de l'ordre de 35 % à 4 semaines ( $p=0,004$  ; Test  $t$  de Student). A 7 et 12 semaines, aucune différence significative n'est observée entre les deux souches de rats, bien que la quantité d'ARNm-GAP-43 est diminuée d'environ 30 % chez les rats TGR à 7 semaines par rapport aux valeurs contrôles (Figure III-22).



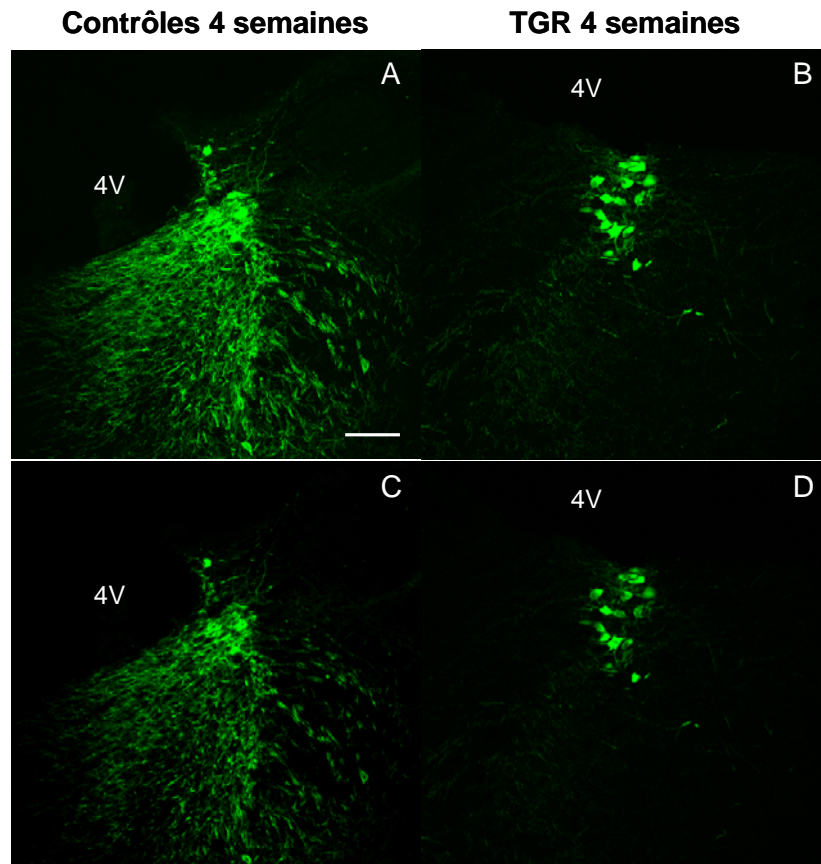
**Figure III-22 : Mesure de la quantité d'ARNm codant pour la « growth associated protein 43 » dans le LC des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4, 7 et 12 semaines.**

La quantité d'ARNm codant pour la « growth associated protein 43 » (GAP-43) a été mesurée à l'aide d'une technique de transcription inverse calibrée, couplée à une amplification quantitative des ADN complémentaires. Les valeurs obtenues ont été exprimées en pourcentage de la valeur moyenne obtenue pour les rats contrôles à chaque âge. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 4-5$ ) des valeurs converties en pourcentage des contrôles. Les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été comparées à l'aide d'un test  $t$  de Student. \*\* $p < 0.01$ .

### III-2.9. Localisations de la TH et de MARCKS-phosphorylée au niveau du LC chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines et 12 semaines

La double détection immunofluorescente des protéines MARCKS-phosphorylée et TH a été réalisée dans la région du LC chez les rats contrôles et TGR âgés de 4 et 12 semaines, au niveau de plans anatomiques adjacents à ceux traités précédemment pour la détection immunohistochimique colorimétrique simple de la TH (Figure III-17). Cette étape de notre travail a été réalisée afin d'observer si le processus de phosphorylation de MARCKS est impliqué à ces stades du développement dans le transport intracellulaire de la TH dans les neurones du LC.

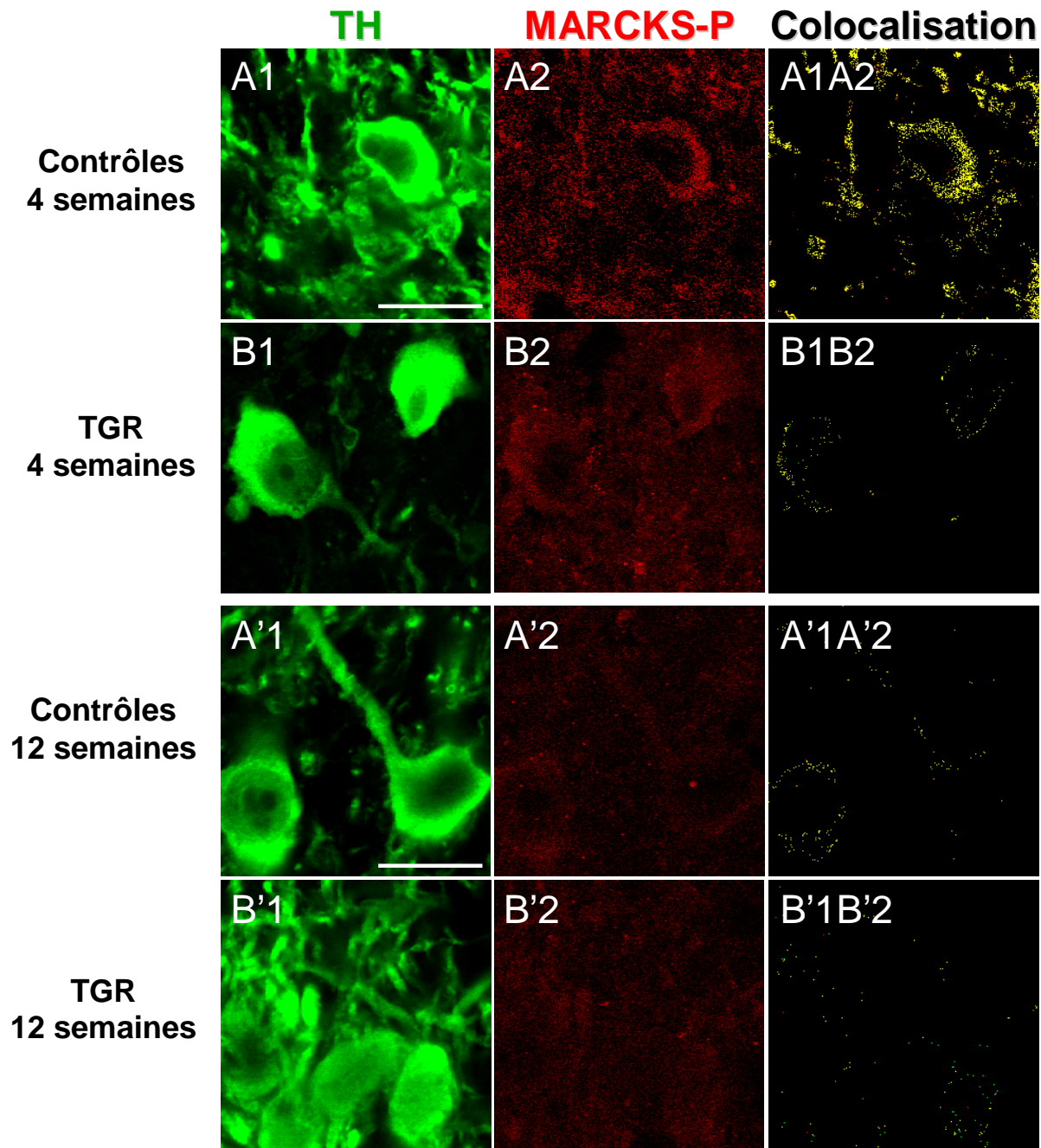
Avant même d'analyser la répartition de MARCKS-phosphorylée, nous nous sommes assurés que la répartition du marquage immunofluorescent de la TH au niveau du LC était similaire à celle observée après détection immunohistochimique colorimétrique de la protéine chez les rats contrôles et TGR âgés de 4 et 12 semaines. Ainsi, nous avons observé et compilé le signal fluorescent TH-immunopositif sur l'intégralité de l'épaisseur de chaque coupe à l'aide du microscope confocal (Figure III-23A, B), afin de nous mettre dans les mêmes conditions d'observation qu'en immunohistochimie colorimétrique. Nous avons pu effectivement mettre en évidence que les deux types de détections donnent des résultats similaires (comparer pour exemple les figures III-17A, B avec respectivement les figures III-23A, B). Nous avons ensuite repéré sur chaque coupe la profondeur pour laquelle l'intensité du marquage de la TH est la plus forte (Figure III-23C, D). C'est ce niveau de profondeur de coupe (épaisseur = 1  $\mu\text{m}$ ) qui a été choisi afin de réaliser l'analyse conjointe des marquages TH et MARCKS phosphorylée (Figure III-24).



**Figure III-23 : Choix du niveau de profondeur de coupe pour l'analyse confocale du double marquage TH/MARCKS-phosphorylée chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680.**

Une compilation est dans un premier temps réalisée à l'aide d'images prises sur une épaisseur de 17  $\mu\text{m}$  (1 image/ $\mu\text{m}$ ) à partir des coupes de LC traitées pour la détection immunofluorescente de la TH, dans cet exemple collectées respectivement chez des rats contrôles (A) et TGR (B) âgés de 4 semaines. Après s'être assuré que le marquage total ainsi obtenu coïncide avec celui observé précédemment en immunohistochimie colorimétrique, le niveau de profondeur de coupe pour lequel l'intensité de marquage de la TH est maximale est fixé (en C pour les contrôles et D pour les TGR), et servira par la suite à l'analyse confocale des marquages de la TH et de MARCKS-phosphorylée. Barre d'échelle = 100  $\mu\text{m}$ . Abréviations : 4V, 4<sup>ème</sup> ventricule.





**Figure III-24 : Colocalisation de la TH et de la forme phosphorylée de la protéine « myristoylated alanin-rich C kinase substrate » (MARCKS-P) dans les neurones du LC chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 et 12 semaines.**

Les protéines TH (A1, B1, A'1, B'1) et MARCKS-P (A2, B2, A'2, B'2) ont été détectées sur une même coupe de cerveau chez les rats contrôles (A) et transgéniques (TGR) (B) à 4 semaines (A1, B1, A2, B2) et 12 semaines (A'1, A'2, B'1, B'2), à l'aide d'une technique immunohistofluorescente utilisant des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome : Alexa488 pour la TH (vert) et cyanine3 pour MARCKS-P (rouge). Après superposition des signaux obtenus pour la TH et pour MARCKS-P (A1A2, B1B2, A'1A'2, B'1B'2), un traitement d'image permet de visualiser la colocalisation des deux protéines par une coloration jaune. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.



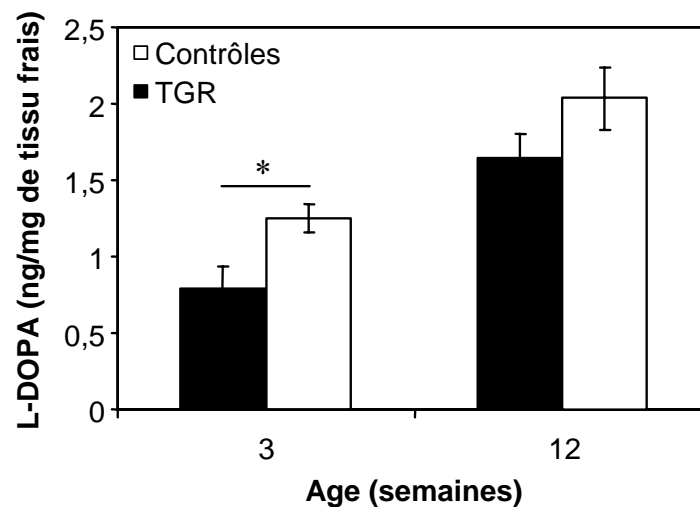
Chez les rats contrôles âgés de 4 semaines, le signal obtenu pour MARCKS-phosphorylée, discret et « ponctué » (Figure III-24A2), contraste avec le marquage uniforme obtenu pour la protéine TH (Figure III-24A1), localisé aussi bien dans le cytoplasme périkaryal qu'au niveau des prolongements neuronaux. La superposition des deux marquages permet de co-localiser les deux protéines étudiées, aussi bien au niveau périkaryal que dans les prolongements neuronaux dont la taille évoque celle des troncs dendritiques. Chez les rats TGR âgés de 4 semaines, l'immunomarquage de la TH (Figure III-24B1) est principalement localisé au niveau des corps cellulaires des neurones, et très légèrement au niveau de leurs prolongements. La présence de MARCKS-phosphorylée dans les neurones coeruleus n'est pratiquement pas observable (Figure III-24B2). La superposition des deux marquages révèle ainsi que les cellules TH-immunopositives du LC ne contiennent pratiquement pas de MARCKS sous sa forme phosphorylée chez ces rats (Figure III-24B1B2). Ainsi, nous avons pu i), mettre en évidence que la présence de la TH dans les prolongements dendritiques est associée à celle de MARCKS-phosphorylée à 4 semaines dans le LC des rats contrôles, ii), confirmer que les prolongements neuronaux localisés dans la région du LC sont très appauvris en TH chez les rats TGR à 4 semaines en comparaison des rats contrôles, et iii), mettre en évidence que les neurones catécholaminergiques localisés dans la région du LC chez les rats TGR à 4 semaines sont pratiquement dépourvus de MARCKS-phosphorylée, contrairement à ce qui est observé chez leurs contrôles.

Chez les rats contrôles âgés de 12 semaines, la détection immunohistofluorescente de la TH (Figure III-24A'1) permet d'observer la présence de la protéine dans les corps cellulaires et les prolongements neuronaux. MARCKS-phosphorylée n'est pratiquement pas observée dans cette région (Figure III-24A'2). La superposition des deux marquages révèle ainsi que les cellules TH-immunopositives du LC des rats contrôles ne contiennent pratiquement pas de MARCKS sous sa forme phosphorylée à 12 semaines, contrairement à ce qui est observé chez ces rats à 4 semaines (Figure III-24A1A2). De même que pour les rats SD à 12 semaines, les rats TGR âgés de 12 semaines ne présentent qu'un très faible marquage MARCKS-phosphorylée dans le LC (Figure III-24B'2), la protéine TH étant présente aussi bien dans les corps cellulaires que dans les prolongements neuronaux (Figure III-24B'1). Ainsi, nous avons pu i), confirmer que la présence de TH est restaurée dans les prolongements des neurones du LC chez les rats TGR à l'âge adulte, et ii), mettre en évidence que la présence de MARCKS-phosphorylée n'est que très peu observée dans les neurones coeruleus chez les rats contrôles et les rats TGR âgés de 12 semaines.

### III-2.10. Mesure de l'activité enzymatique *in vivo* de la TH au niveau du LC des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 3 et 12 semaines

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence qu'il existe une forte augmentation de la concentration tissulaire de noradrénaline dans le LC chez les rats TGR par rapport à leurs contrôles à 3 et 12 semaines. Ces perturbations apparentes de la neurotransmission noradrénergique locale ne sont pas associées à une modification de l'expression de la TH, mais pourraient néanmoins résulter d'une modification de l'activité spécifique de la protéine chez les rats TGR. Afin de tester cette hypothèse, nous nous sommes placés à 3 et 12 semaines, et avons mesuré cette variable chez les deux souches de rats.

Nous avons mis en évidence que l'activité enzymatique *in vivo* de la TH (Figure III-25) est augmentée chez les rats transgéniques par rapport aux rats contrôles à 3 semaines ( $0,8 \pm 0,1$  (contrôles) vs.  $1,2 \pm 0,1$  (TGR) ng L-DOPA/mg tissu frais ;  $p < 0,05$ , test *t* de Student). A 12 semaines les valeurs d'activité enzymatique de la TH redeviennent similaires entre les deux souches de rats.

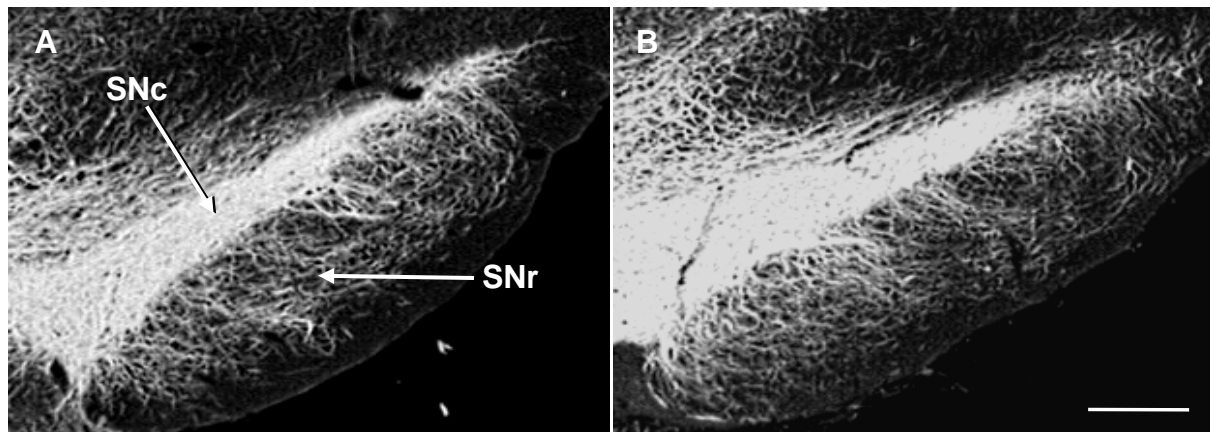


**Figure III-25 : Activité enzymatique *in vivo* de la TH au niveau du LC chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 3 et 12 semaines.**

L'amplitude de l'accumulation tissulaire de L-DOPA, mesurée chez des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 3 et de 12 semaines par HPLC-ED, 20 minutes après une injection intra-péritonéale de NSD-1015, constitue un reflet fiable de l'activité enzymatique de la TH dans le LC. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 5$  à  $7$ ) de la concentration tissulaire de L-DOPA mesurée. Les valeurs obtenues pour chaque souche de rat ont été comparées en utilisant un test *t* de Student. \* $p < 0,05$ .

### III-2.11. Détection immunohistochimique de la TH au niveau de la substance noire des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines

L'ensemble des résultats obtenus précédemment démontre une modification profonde de la présence de la protéine TH dans les prolongements (dendritiques) des neurones noradrénergiques du LC et des neurones (nor)adrénergiques du NTS chez les rats TGR à 4 semaines en comparaison des rats contrôles. Afin d'évaluer si cette altération est généralisée à l'ensemble des structures centrales exprimant la TH, nous avons décidé d'observer à 4 semaines la distribution de la protéine dans la substance noire dopaminergique chez les deux souches de rats. Au niveau de cette structure, la TH est détectée à la fois dans les péricarya dopaminergiques délimitant la substance noire pars compacta, et les compartiments axonaux et dendritiques délimitant la substance noire pars reticulata (Figure III-26A). Cette distribution est similaire à celle observée au niveau des neurones du LC (Figure III-17A) et du NTS (Figure III-7A) à 4 semaines. La substance noire exprime les récepteurs AT<sub>1</sub> aux angiotensines ainsi que l'AOGEN au cours du développement postnatal (Mungall et al., 1995 ; Nuyt et al., 2001). Chez les rats TGR déplétés en angiotensines cérébrales à 4 semaines, le marquage TH-immunopositif (Figure II-26B) n'est pas différent de celui observé chez les rats contrôles au même âge (Figure III-26A).



**Figure III-26 : Détection immunohistochimique de la protéine TH dans la région du de la substance noire chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 âgés de 4 semaines.**

Au niveau de la substance noire (SN), le marquage immunohistochimique de la TH est observé chez les rats contrôles (A) et les rats transgéniques (TGR) (B) dans les péricarya au niveau de la SN pars compacta (SNc) et les prolongements neuronaux au niveau de la SN pars reticulata (SNr). De manière qualitative, la répartition de la protéine TH n'est pas différente entre les deux souches de rats. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

---

### *IV-3. Discussion*

Il y a un peu plus de 10 ans, la plasticité du phénotype TH a été révélée au cours de la période postnatale au niveau du LC chez le rat, par l'observation d'une augmentation croissante de la quantité de TH (Zyzek et al., 1990). Une étude plus poussée de ce phénomène a permis de préciser que la quantité d'enzyme augmente d'environ 105 % entre les 21<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> jours, représentant quasiment la seule variation importante du contenu en TH observée au niveau du LC durant l'intégralité de la période postnatale (Bezin et al., 1994b,c). Ainsi, cette période du développement constituerait une étape clé de l'établissement postnatal du phénotype TH au niveau du LC.

Dans la région du LC chez le rat adulte, la protéine TH est répartie entre deux compartiments cellulaires bien distincts : la zone strictement délimitée par les corps cellulaires des neurones noradrénergiques du LC, ou aire périkaryale (APK), et une aire fortement enrichie en prolongements dendritiques d'origine coeruleenne, dépassant largement les limites de l'APK, et appelée l'aire péricoeruleenne (APC) (Debure et al., 1994 ; Bezin et al., 1994c, 1997 ; 2000b). L'augmentation de la présence de TH qui a été observée dans le LC au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale est caractérisée par une forte augmentation des limites du marquage TH-immunopositif dans l'APC, sans qu'aucune modification des taux d'ARNm-TH n'ait été observée (Bezin et al., 1994b,c, 1997). Si cette stabilité de la concentration en ARNm-TH est accompagnée de celle de la synthèse de la protéine TH, il se pourrait alors que l'augmentation physiologique de la présence de TH observée dans l'APC au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale résulte d'une modification des modalités du transport neuritique de la TH dans les neurones du LC. Comme il a été proposé que la présence de la noradrénaline coeruleenne (et donc celle de la TH) est importante à des étapes clés du développement dans des tissus cibles des neurones du LC, il se pourrait alors qu'en dehors de ces étapes critiques la TH synthétisée au niveau des périkarya ne soit plus majoritairement transportée vers les aires de terminaison, mais qu'une partie soit réaiguillée vers le compartiment dendritique. Dans cette partie du travail de thèse, nous avons pu montrer que ces phénomènes de plasticité du phénotype TH qui ont lieu dans le LC au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale dépendent largement du contrôle exercé par les angiotensines cérébrales non seulement sur l'expression du gène (ARNm et protéine), mais également sur le transport de la protéine dans les prolongements neuronaux dendritiques. En outre, cette régulation par le système angiotensinergique cérébral serait spécifique des neurones (nor)adrénergiques, puisque nous n'avons observé aucune modification de la distribution de la protéine TH dans les neurones

dopaminergiques de la substance noire à ce stade du développement.

**Intervention ponctuelle du système angiotensinergique cérébral dans la maturation de l'expression génique des marqueurs du phénotype noradrénergique coerulein au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale**

Au niveau du LC des rats appauvris en angiotensines cérébrales, l'augmentation de la quantité de protéine TH, se déroulant initialement chez les animaux contrôles entre 3 et 4 semaines, n'est observée qu'entre 4 et 7 semaines. Ce retard est caractérisé par une nette diminution de la quantité de TH mesurée par « dot blot » dans le LC des rats TGR à 4 semaines par rapport aux conditions contrôles, et est accompagné par une diminution de la quantité d'ARNm-TH. Ainsi, il se pourrait que la diminution de la quantité de protéine TH observée chez les rats TGR à ce stade du développement soit liée à une répression du gène codant pour la TH. En outre, nous avons observé une diminution des taux d'ARNm-DBH et -NET chez les rats TGR à 4 semaines par rapport aux contrôles, résultats qui corroborent les études réalisées *in vitro* montrant que l'expression des gènes codant pour la TH, la DBH et le NET est stimulée par l'angiotensine II (Ang II) (voir pour revue Gelband et al., 1997). Le mécanisme par lequel l'expression de ces trois gènes est augmentée par les angiotensines fait intervenir une stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub>, qui active la phosphorylation des proto-oncogènes Ras et Raf-1, et active la « mitogen-activated protein kinase » (MAP kinase) (pour revue, voir Gelband et al., 1997). Ainsi, les altérations observées *in vivo* dans notre étude pourraient résulter d'une diminution de la stimulation des récepteurs à l'Ang II exprimés par les neurones du LC.

A l'âge adulte (12 semaines), la quantité de TH mesurée de manière globale dans la région du LC est similaire chez les deux souches de rats. Toutefois, la quantité d'ARNm-TH est fortement augmentée chez les rats TGR par rapport à ce qui est observé chez les rats contrôles. Il se pourrait alors que cette augmentation apparente du taux d'ARNm-TH dans le LC des rats TGR à 12 semaines soutienne une synthèse accrue de protéine TH par rapport aux rats contrôles, et que la protéine néosynthétisée soit rapidement dirigée vers les aires de terminaison des neurones du LC, cela afin d'équilibrer chez les rats TGR la quantité de protéine TH présente dans la région des corps cellulaires du LC (périkarya et dendrites) à celle présente chez les rats contrôles. Notre étude montre également que seule la quantité d'ARNm-TH est augmentée à 12 semaines chez les rats TGR par rapport aux conditions contrôles, les ARNm-DBH et -NET ayant recouvert un niveau d'expression équivalent à celui des contrôles. Cette sélectivité de réponse suggère que la déplétion en angiotensines

cérébrales très tôt au cours du développement entraîne chez l'adulte une activation du système noradrénergique coeruleen, où seule la TH, enzyme limitante de la biosynthèse de la noradrénaline, nécessiterait d'être régulée au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel. Enfin, l'étude développementale des variables biochimiques (TH, ARNm-TH) caractérisant le phénotype TH dans le LC chez les rats TGR suggère que les angiotensines cérébrales constituent une horloge physiologique permettant de positionner à 4 semaines le stade du développement postnatal à partir duquel la quantité de protéine TH doit commencer à augmenter dans la région du LC. Au-delà de ce stade, d'autres régulateurs plus tardifs permettraient de recouvrir des caractéristiques très proches de celles observées chez les animaux contrôles, indépendamment de la présence des angiotensines cérébrales.

### **Soutiens anatomiques des altérations du phénotype TH observées chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 à 4 semaines**

Nous avons pu mettre en évidence au cours de cette étude, à l'aide d'une technique de détection biochimique, une très forte diminution de la présence globale de protéine TH dans la région du LC chez les rats TGR spécifiquement à 4 semaines, en comparaison des contrôles. Forts des résultats acquis *in situ* au niveau du NTS, montrant une nette diminution de la présence de la protéine dans le neuropile, nous avons voulu observer si la distribution cellulaire de la TH était également modifiée au niveau du LC chez les rats TGR âgés de 4 semaines.

La détection immunohistochimique de la TH dans la région du LC montre que la présence de la protéine est réduite chez les rats TGR âgés de 4 semaines par rapport aux conditions contrôles, et corrobore nos mesures de la quantité de TH effectuées à l'aide d'une technique immunoautoradiographique chez ces rats au même âge. La résolution anatomique fine que nous procure l'immunohistochimie nous permet d'observer que la protéine TH détectée dans la région du LC est en réalité concentrée dans les corps cellulaires des neurones coeruleens et fortement diminuée au niveau de l'APC chez les rats TGR. Etant donné que 99% de la protéine TH détectée dans l'APC dans les conditions contrôles est contenue dans des prolongements dendritiques issus des neurones du LC (Bezin et al., 1994b,c), nos résultats suggèrent que l'appauvrissement en TH constaté dans la région du LC chez les rats TGR à 4 semaines serait principalement localisée au niveau de ce type de prolongements. Par ailleurs, notre étude a mis en évidence que la présence de la TH au niveau des prolongements axonaux coeruleens innervant la zone sous-granulaire de l'hippocampe, et les couches moléculaires des cortex frontal et cingulaire ne semble pas être modifiée chez les rats TGR, incitant à penser que seul le compartiment dendritique des neurones du LC est déplété en TH chez les rats TGR

à 4 semaines. Ainsi, la diminution de la présence de protéine TH dans les neurones du LC des rats TGR âgés de 4 semaines, résultant probablement d'une inhibition de l'expression de l'ARNm-TH, aurait pour conséquence i), de favoriser localement le confinement de la protéine dans les péricarya avec inhibition du transport dendritique de la protéine et ii), de favoriser le transport axonal de la protéine vers les aires de terminaisons des neurones du LC.

La distribution de la TH étant modifiée chez les rats déplétés en angiotensines à 4 semaines à la fois au niveau du NTS et du LC, qui sont des structures adrénérique (NTS) et noradrénériques (NTS et LC), la question se posait de savoir si ce phénomène était généralisé à l'ensemble des structures cérébrales exprimant la TH. L'étude que nous avons réalisée dans la substance noire s'est limitée à la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale et n'a révélé aucune altération de la distribution de la protéine TH entre les corps cellulaires et les prolongements des neurones dopaminergiques de cette structure chez les rats transgéniques en comparaison de leurs contrôles. L'ensemble de ces résultats suggère qu'à la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale, le contrôle exercé par le système angiotensinergique cérébral sur l'adressage de la protéine TH vers les prolongements des neurones catécholaminergiques ne ciblerait que les neurones (nor)adrénériques, épargnant les neurones dopaminergiques de la substance noire notamment.

### **Altérations différées du phénotype TH dans les aires de terminaison du LC chez les rats TGR à 12 semaines**

Nous avons préalablement émis l'hypothèse selon laquelle l'augmentation d'ARNm-TH observée à 12 semaines dans le LC des rats TGR par comparaison aux rats contrôles (alors que la quantité de protéine TH est rétablie entre les deux souches de rat dans la région du LC) permettrait de soutenir une synthèse plus importante de TH. La quantité de TH synthétisée qui serait alors excédentaire dans les péricarya des neurones coeruleus chez les rats TGR par rapport aux contrôles serait alors rapidement et exclusivement dirigée vers les aires de terminaison. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons recherché s'il existait des différences importantes de l'innervation TH-immunopositive dans des régions cibles du LC. Nous avons observé que la densité des fibres TH-immunoréactives est fortement augmentée chez les rats TGR à 12 semaines, notamment dans la couche moléculaire du cortex frontal et dans la couche sous-granulaire du gyrus dentelé, l'innervation catécholaminergique que reçoivent ces deux aires provenant exclusivement du LC. L'observation d'un tel phénomène peut correspondre à deux processus :

- Chez les rats contrôles à 12 semaines, il se pourrait que certaines terminaisons des neurones du LC soient très peu concentrées en protéine TH, et soient de ce fait

indéetectables par la technique immunohistochimique que nous avons employée. Si la synthèse de TH et son transport axonal sont effectivement augmentés chez les rats TGR, l'augmentation de la concentration de TH dans les terminaisons des neurones du LC permettrait peut-être de passer au-dessus du seuil de détection immunohistochimique.

➤ Il se pourrait aussi que l'augmentation de l'innervation TH-immunopositive observée chez les rats TGR soit consécutive à un processus de bourgeonnement des terminaisons axonales des neurones du LC lors de la période postnatale tardive. L'induction du gène codant pour GAP-43 ayant souvent été associée à la croissance axonale physiologique au cours du développement, ou physiopathologique dans des situations de régénérescence axonale (pour revue, voir Caroni, 1997), nous avons recherché si son expression était modifiée dans le LC des rats TGR. Nous n'avons pas observé de différences dans l'expression de l'ARNm-GAP-43 entre les rats TGR et contrôles à 12 semaines. En revanche, l'expression est plus faible chez les TGR à 4 semaines, résultat qui coïncide avec la mise en évidence que l'angiotensine II stimule l'expression de GAP-43 dans des cultures de neurones hypothalamiques (Yang et al., 2001). Comme la densité d'innervation TH-immunopositive est identique chez les rats TGR à celle des contrôles dans les aires de terminaison des neurones du LC (couche moléculaire des cortex frontal et cingulaire, couche sous-granulaire du gyrus dentelé), il semblerait alors que la pousse axonale des neurones du LC vers leurs territoires cibles soit peu affectée par la diminution de l'expression de l'ARNm-GAP-43, à moins qu'elle n'ait été compensée par une augmentation de la synthèse ou de la stabilité de la protéine GAP-43, ou par tout autre mécanisme suppléant à GAP-43. Bien que la concentration de l'ARNm-GAP-43 chez les rats TGR soit plus faible à 4 semaines que chez les contrôles, et que cela soit sans conséquence sur la densité de l'innervation TH-immunopositive dans les aires de terminaisons du LC durant cette période, il se pourrait que l'activation du gène GAP-43 permettant le rétablissement de l'expression de son ARNm chez les rats TGR vers des concentrations équivalentes à celles des rats contrôles au-delà de la 4<sup>ème</sup> semaine soit un signal suffisant pour induire un phénomène de bourgeonnement des terminaisons axonales des neurones du LC, observable dans notre étude dès 12 semaines.

Il sera bien entendu nécessaire de rechercher si d'autres marqueurs moléculaires du bourgeonnement axonal sont activés ou réprimés, notamment dans les aires de terminaisons du LC entre les 4<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> semaines.



### **Intervention de MARCKS-phosphorylée dans le transport axonal et dendritique de la TH, par l'intermédiaire des angiotensines cérébrales**

Des études récentes réalisées *in vitro* mettent en avant le rôle présumé de MARCKS dans le transport intracellulaire des protéines et organelles dans les neurones noradrénergiques (Lu et al., 1998 ; Wang et al., 2002). La protéine MARCKS « native » est liée à la face interne de la membrane plasmique des cellules et possède la capacité de lier les filaments d'actine, favorisant ainsi la formation d'un réseau cytosquelettique rigide (Blackshear, 1993). La phosphorylation de MARCKS par la protéine kinase C induit notamment une dissociation entre MARCKS, la membrane plasmique et l'actine. Ce phénomène produit une diminution de la viscosité intracellulaire probablement due à une réorganisation cytosquelettique. Au niveau de neurones noradrénergiques en culture, MARCKS est détectée dans les corps cellulaires et les varicosités neuritiques (Lu et al., 1998). La stimulation du processus de phosphorylation de MARCKS par la sous-unité  $\beta$  de la protéine kinase C (PKC $\beta$ ) induit une redistribution de MARCKS vers les prolongements neuritiques de ces neurones noradrénergiques (Lu et al., 1998). Ce phénomène est accompagné par le déclenchement d'une « migration » accrue de certaines protéines clés du métabolisme de la noradrénaline, et en particulier de la TH, vers les parties terminales des neurites, résultant très probablement d'un remodelage du réseau cytosquelettique neuritique. Toutefois, un tel processus n'avait jamais été confirmé *in vivo*, et aucune information n'était disponible en ce qui concerne le type (axonal et/ou dendritique) de prolongements neuronaux concernés par cette régulation.

MARCKS est présente au niveau du SNC dans les neurones et les cellules gliales (Ouimet et al., 1990). Au niveau des neurones, la protéine a été observée *in vivo* dans les axones, les terminales d'axones et les dendrites. Parmi les structures cérébrales au niveau desquelles MARCKS a pu être détectée, le LC contiendrait de fortes quantités de cette protéine. Toutefois, la répartition cellulaire de MARCKS n'a pas été observée dans le LC, ni son état de phosphorylation. Ce travail est le premier à révéler *in vivo* la localisation cellulaire de la protéine MARCKS sous sa forme phosphorylée. Au niveau du LC, nous avons pu détecter la présence de MARCKS-phosphorylée non seulement dans les corps cellulaires des neurones TH-immunopositifs, mais également dans leurs prolongements dendritiques et vraisemblablement axonaux, laissant supposer que la protéine phosphorylée a la capacité de réguler la compartimentation de la TH non seulement entre le soma et les axones, mais également entre le soma et les dendrites, des neurones coeruleins. Toutefois, ce rôle qu'aurait MARCKS-phosphorylée dans la compartimentation des enzymes clés du métabolisme noradrénergique au niveau des neurones du LC serait exercé uniquement à des étapes déterminantes, au moins au cours du développement postnatal :

- Dans le LC des rats contrôles âgés de 4 semaines, MARCKS-phosphorylée est localisée dans les corps cellulaires et les prolongements des neurones exprimant la TH. Chez les rats TGR, les prolongements des neurones localisés dans le LC se retrouvent fortement appauvris en TH, et la présence de MARCKS-phosphorylée est pratiquement inexistante. Ce résultat suggère fortement que le mécanisme de transport neuritique de la TH est inhibé à 4 semaines au niveau du LC des rats TGR, en réponse à une diminution de la phosphorylation de la protéine MARCKS. Cette diminution pourrait résulter d'une inhibition du processus de phosphorylation de MARCKS par la PKC $\beta$ , en réponse à une hypo-activation des récepteurs AT<sub>1</sub> due à la déplétion en angiotensines. Toutefois, bien qu'improbable, l'hypothèse selon laquelle la synthèse et non la phosphorylation de la protéine MARCKS pourrait être diminuée chez les rats TGR à 4 semaines par des phénomènes plus ou moins indépendants du système angiotensinergique ne peut être totalement exclue. Afin de décrire plus précisément la manière par laquelle le transport neuritique de la TH est inhibé dans les neurones du LC chez les rats TGR âgés de 4 semaines, la synthèse de la protéine MARCKS pourrait être appréhendée en comparant la présence *in situ* de la protéine MARCKS sous sa forme non-phosphorylée et le taux d'ARNm-MARCKS chez les deux souches de rats à 4 semaines. Le fait que la présence de TH ne soit pas modifiée dans les aires de terminaison des neurones du LC (riches en axones coeruleus) à 4 semaines chez les rats TGR par rapport aux contrôles, alors même que la présence de la protéine est très fortement réduite au niveau de l'APC du LC (riche en dendrites coeruleus), conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle le processus de phosphorylation de la protéine MARCKS ne jouerait un rôle dans le transport de la TH qu'au niveau des prolongements **dendritiques** des neurones du LC au cours de cette période du développement. Ainsi, la répartition de la TH entre les péricarya des neurones du LC et leurs dendrites serait régulée par des facteurs et des mécanismes différents de ceux impliqués dans la régulation de la répartition de la TH entre les péricarya et les axones. Notre étude suggère donc que les angiotensines cérébrales réguleraient le transport spécifiquement dendritique de la TH dans les neurones du LC durant la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale. Le mécanisme impliqué dans cette régulation dépendrait de l'interaction entre les angiotensines et les récepteurs AT<sub>1</sub>, et de la stimulation de la voie intracellulaire PKC $\beta$ /MARCKS, comme il a été suggéré par les études réalisées *in vitro*.
- A l'âge adulte, chez les rats contrôles, nous avons eu beaucoup de difficultés à détecter la protéine MARCKS-phosphorylée dans le LC. Ce résultat, associé au fait que la protéine native est bien présente dans les neurones du LC à cet âge (Ouimet et al., 1990), permet de

conclure que les mécanismes qui permettent la phosphorylation de MARCKS, notamment la voie d'activation par la PKC $\beta$ , sont peu sollicités dans ces neurones dans les conditions basales. En outre, ce résultat nous indique que chez le rat mature, le mécanisme contrôlant le transport dendritique et/ou axonal de la TH n'est plus dépendant des mécanismes cellulaires initiés par la phosphorylation de MARCKS, contrairement à ce que nous avons proposé au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale. Cette conclusion est notamment soutenue par les résultats obtenus chez les rats TGR, puisque la protéine TH est observée à l'âge adulte dans les prolongements dendritiques des neurones du LC, malgré l'absence de MARCKS-phosphorylée aussi bien dans le compartiment périkaryal que neuritique. Chez les rats TGR, nous ne pouvons toujours pas affirmer avec certitude que le mécanisme qui a permis l'initiation du transport de la TH dans les dendrites des neurones est indépendant de MARCKS-phosphorylée. Il est en effet possible que des facteurs autres que les angiotensines cérébrales aient stimulé chez ces rats la voie de phosphorylation de MARCKS dans une période que nous n'avons pas étudiée, et qui pourrait se situer entre les 4<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> semaines. Des études visant à identifier ces facteurs pourraient être menées dans le LC ou le NTS au-delà de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale, mais aussi dans la substance noire à la 4<sup>ème</sup> semaine. En effet, l'expression soutenue de ces facteurs dans les neurones dopaminergiques à 4 semaines pourrait court-circuiter l'absence des angiotensines cérébrales chez les rats TGR et permettre l'adressage de la protéine TH dans les prolongements dendritiques.

### **Altérations de la mise en place postnatale du phénotype noradrénergique chez les rats TGR(ASrAOGEN)680**

Au niveau du LC des rats TGR âgés de 3 et 7 semaines, un excédent de noradrénaline tissulaire a pu être mesuré par rapport aux conditions contrôles. Ce phénomène est lié chez les rats TGR âgés de 3 semaines à une augmentation de l'activité de la TH par rapport aux valeurs contrôles. Cette altération de l'activité de l'enzyme n'est cependant plus observée à l'âge adulte. Si ce phénomène est associé à une augmentation de la présence du neurotransmetteur dans le milieu extracellulaire, une modification de la stimulation des récepteurs adrénergiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ) présents sur les compartiments neuronaux somatiques et dendritiques localisés dans la région du LC pourrait se dérouler à ces stades du développement. Une « hyper »-stimulation ou encore une désensibilisation de ces récepteurs, créée par le surplus de neurotransmetteur présent dans le LC, pourrait modifier l'excitabilité des neurones coeruleins chez les rats TGR à ces stades du développement (Vachette et al., 1993, 1994). Ceci pourrait ainsi avoir comme conséquence d'altérer les fonctions

physiologiques prises en charge par le LC. Afin de juger d'un tel phénomène, l'activité des neurones du LC devra être mesurée chez les rats âgés de 3 et 12 semaines.

### ***III-4. Conclusions***

Comme au niveau du NTS, la déplétion centrale en AOPEN est accompagnée d'une altération de la mise en place des phénotypes TH et noradrénergique chez le rat TGR au cours du développement postnatal dans la région du LC.

L'altération du phénotype TH que nous avons observée chez les rats TGR est notamment caractérisée par une inhibition à la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale de l'expression de la protéine TH. De plus, durant cette période du développement, le transport dendritique de la protéine TH dans les neurones catécholaminergiques du LC est également fortement inhibé chez les rats TGR, très probablement en réponse à une forte diminution du processus de phosphorylation de la protéine MARCKS. Toutefois, la présence de TH dans les aires de terminaison du LC (cortex et hippocampe) est préservée chez ces rats, suggérant que le transport axonal de la protéine TH est indépendant de MARCKS-phosphorylée. L'étude de la distribution et de l'expression de la protéine MAP2 dans la région du LC à 4 semaines ne montre pas de modifications chez les rats TGR par rapport à leurs contrôles, signifiant que l'absence de phosphorylation de MARCKS n'affecterait pas la cytoarchitecture des neurones du LC, mais seulement les mécanismes cellulaires impliqués dans le transport dendritique de certaines molécules présentes dans le compartiment périkaryal, et en particulier les protéines clés associées au métabolisme noradrénergique. Nos observations incitent donc à penser que les angiotensines dérivées de l'AOPEN astrocytaire seraient impliquées *in vivo* dans l'augmentation physiologique de la présence de la protéine TH observée dans la région du LC chez le rat durant la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale en maintenant l'expression du gène codant pour la TH à un taux constant, et en stimulant le transport de la protéine vers les dendrites des neurones catécholaminergiques. Ainsi, c'est dans le cadre d'une étroite collaboration avec les astrocytes que se déroule cette étape clé de la mise en place du phénotype TH au niveau des neurones coeruleins. A l'âge adulte, nos résultats laissent à croire que les mécanismes qui contrôlent l'équilibre qu'il est nécessaire d'établir entre la synthèse et le transport de la protéine TH dans les différents compartiments neuronaux sont totalement indépendants de la présence locale des angiotensines cérébrales et des voies de signalisation qu'elles activent dans les neurones du LC, tout au moins dans les conditions basales. En revanche, il n'est pas

exclu que les angiotensines et la phosphorylation de MARCKS ne soient pas mises à contribution dans certaines situations de stress soutenu ou chronique notamment (Watanabe et al., 1998 ; Dumont et al., 1999), souvent associées à une régulation à long terme du phénotype TH dans les neurones coeruleins (Kumer et Vrana, 1996). Ainsi, la phosphorylation de MARCKS induite par la stimulation des récepteurs aux angiotensines permettrait de mobiliser les mécanismes permettant de contrôler l'afflux de TH dans les dendrites des neurones coeruleins aussi bien au cours du développement qu'à l'âge adulte.

Il semble que chez les rats TGR des alternatives moléculaires et cellulaires au système angiotensinergique cérébral se soient mises en place, afin de permettre à l'âge adulte de recouvrir des caractéristiques anatomo-biochimiques du phénotype TH dans la région du LC similaires à celles observées chez les rats contrôles. Toutefois, la modification de l'innervation TH-immunopositive des aires de terminaison des neurones du LC observée chez les rats TGR adultes dénote une maturation de ce réseau différente de celle des rats contrôles.

La présence d'une hyper-innervation TH-immunopositive chez ces rats TGR à l'âge adulte au niveau du gyrus dentelé et des cortex frontal et cingulaire conduit à se poser la question de savoir si ce phénomène est accompagné d'une altération de l'activité neuronale pourrait être observée dans ces aires cérébrales et pourrait résulter en un dysfonctionnement de différentes fonctions cognitives.

---

## **IV- ETUDE COMPORTEMENTALE DES RATS CONTROLES ET TGR(ASrAOGEN)680 ADULTES.**

Les différents points qui ont été abordés lors des précédents volets de ce travail de thèse ont mis en évidence une forte altération de la mise en place du phénotype TH au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale au niveau du LC chez les rats TGR déplétés en angiotensines cérébrales, suivie à l'âge adulte d'une maturation aberrante du phénotype TH dans les aires de terminaison des neurones du LC tels que l'hippocampe, le cortex frontal et le cortex cingulaire, au niveau desquels une impressionnante hyper-innervation TH-immunopositive est observée. Les répercussions fonctionnelles d'une telle hyper-innervation restaient à évaluer.

La libération de noradrénaline par les neurones du LC au niveau de l'hippocampe et du cortex serait impliquée respectivement dans le maintien de l'état d'éveil au cours du nyctémère (voir pour revue Berridge et Waterhouse, 2003) et la réponse locomotrice à un stress de nouveauté (Volley et al., 1988 ; Oknina, 1991 ; Pudovkina et al., 2001). Afin de juger si l'hyper-innervation TH-immunopositive observée chez les rats TGR adultes a des répercussions fonctionnelles, nous avons dans un premier temps mesuré la durée du cycle d'éveil et des cycles de sommeil (sommeil lent et sommeil paradoxal) à l'âge adulte chez les deux souches de rats, i) dans les conditions basales, et ii), durant les 24 heures suivant un stress de privation de sommeil de 10 heures. La deuxième étape a été réalisée à la lumière de certaines études indiquant que l'intégrité du système coeruleen est requise afin de compenser la privation de sommeil (Gonzales et al., 1996, 1998). Pour finir, la réponse locomotrice à un stress de nouveauté a été comparée entre les rats contrôles et TGR adultes.

---

### *IV-1. Protocole expérimental*

La mesure des différentes phases d'éveil et de sommeil a dans un premier temps été réalisée dans des conditions basales chez les rats libres de se mouvoir. La durée de ces différentes phases a été mesurée à partir de la deuxième semaine suivant l'implantation des électrodes intracrâniennes servant à visualiser les ondes électroencéphalographiques. Les enregistrements ont été effectués en continu durant 3 jours, afin de vérifier que les mesures ont atteint un équilibre et que les rats ont complètement récupéré de l'intervention.

L'activité locomotrice de rats adultes appartenant aux deux souches de rats a été mesurée durant les 20 premières minutes suivant leur introduction dans un environnement nouveau. Chez les rats, ce stress de nouveauté provoque dans les conditions contrôles notamment un comportement exploratoire caractérisé par différentes phases de locomotion. Une activité locomotrice intense s'établit de manière précoce, puis diminue au fil du temps. La mise en place de ces différentes phases locomotrices mettrait en jeu les connections coeruleo-hippocampiques et coeruleo-corticales (Volley et al., 1988 ; Oknina, 1991 ; Pudovkina et al., 2001). Durant cette étude, la durée de ces différentes phases locomotrices (déambulatoires : mouvements à l'avant, mouvements à l'arrière, va-et-vient ; non déambulatoires : redressements) a été mesurée. L'activité locomotrice déambulatoire totale, enregistrée en continu et sommée toutes les minutes, a été comparée entre les deux souches de rats. Dans un second temps, les mêmes rats ont été re-placés dans les mêmes cages durant 26 heures, afin d'observer leur activité locomotrice circadienne.

## *IV-2. Résultats*

### IV-2.1. Durées du cycle d'éveil et des cycles de sommeil chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 à l'âge adulte

#### IV-2.1.1. Dans les conditions de base

Les durées des cycles d'éveil et de sommeil lent ne sont pas différentes entre les deux souches de rats dans les conditions de base, que ce soit au cours de la période nocturne ou au cours de la période diurne (Figure III-27A). Alors que la durée du sommeil paradoxal au cours de la période nocturne est équivalente entre les rats contrôles et TGR, celle mesurée au cours de la période diurne est augmentée chez les rats TGR d'environ 65 % par rapport aux rats contrôles.

A	Eveil		Sommeil Lent		Sommeil Paradoxal	
	Nuit	Jour	Nuit	Jour	Nuit	Jour
Contrôles	532 ± 23	200 ± 22	169 ± 21	454 ± 22	19 ± 2	66 ± 4
TGR	554 ± 12	164 ± 7	167 ± 27	428 ± 20	19 ± 2	<b>109 ± 3***</b>

B	Eveil	Sommeil Lent	Sommeil Paradoxal
	Nuit + Jour	Nuit + Jour	Nuit + Jour
Contrôles	0,58 ± 0,03	1,37 ± 0,08	1,97 ± 0,22
TGR	0,56 ± 0,04	1,42 ± 0,04	<b>1,47 ± 0,08*</b>

**Figure III-27 : Etude de la durée des cycles éveil-sommeil chez les rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 adultes dans les conditions basales et durant les 24 heures consécutives à une privation de sommeil de 10 heures.**

Les durées (en minutes) des différentes phases d'éveil et de sommeils (lent et paradoxal) ont été mesurées en continu durant 24 heures dans les conditions physiologiques basales (A), et durant les 24 heures suivant une privation de sommeil de 10 heures (B). Dans les conditions physiologiques basales, les résultats ont été exprimés en moyenne des valeurs obtenues ± SEM (n=4). Les résultats obtenus durant les 24 heures suivant la privation de sommeil ont été exprimés en unité arbitraire, correspondant au ratio entre les durées obtenues post-stress (A) et celles obtenus pré-stress pour chaque phase. Cette valeur est un index de l'amplitude de la réaction des rats au stress appliqué. Les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été comparées à l'aide d'un test *t* de Student. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.



#### **IV-2.1.2. Après un stress de privation de sommeil**

Le « rebond » (augmentation de la durée) de sommeil paradoxal, classiquement décrit chez les animaux contrôles après une privation de sommeil, est observé chez les deux souches de rats (Figure III-27B). Cependant, l'amplitude de ce rebond est diminuée chez les rats TGR d'environ 25 % par rapport à leurs contrôles.

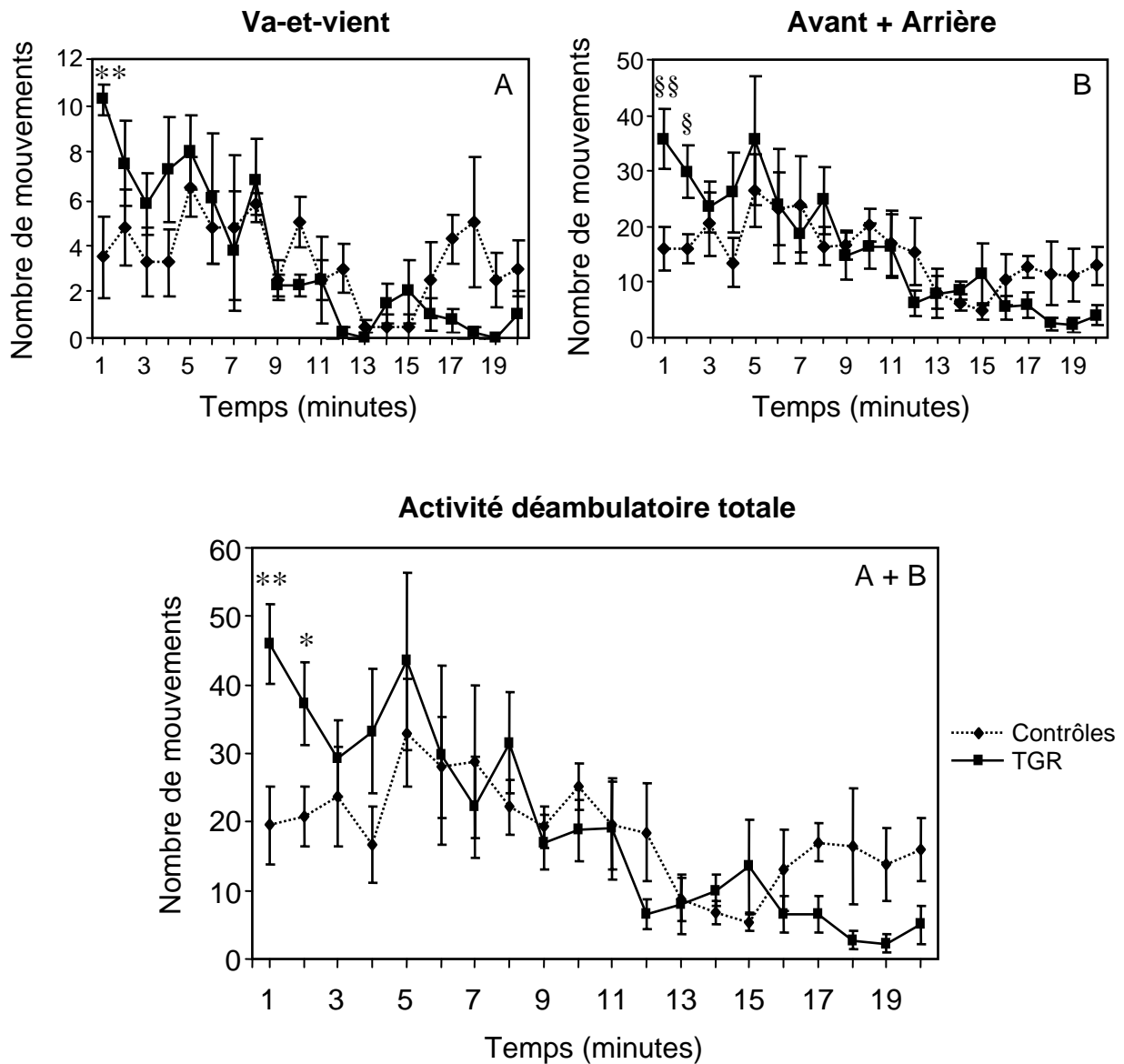
#### **IV-2.2. Etude du comportement locomoteur des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 à l'âge adulte**

##### **IV-2.2.1. Durant un stress de nouveauté**

Une différence de nombre de mouvements de va-et-vient bien délimitée temporellement est observée entre les deux souches de rats ( $p < 0,012$  ; interaction entre la souche de rat et le stade du développement ; ANOVA II), bien que le faible nombre d'échantillons traités ne permette pas statistiquement de déceler des différences entre les activités déambulatoires sur l'ensemble des 20 minutes ( $p < 0,803$  ; ANOVA II). En effet, le nombre de mouvements de va-et-vient réalisés par les rats TGR durant la première minute du protocole est environ 2 fois supérieur à celui des rats contrôles (Figure III-28A).

Les activités déambulatoires à l'avant et à l'arrière de la cage mesurées chez les deux souches de rats ne semblent pas significativement différentes ( $p < 0,625$  ; ANOVA II) (Figure III-28B). Par ailleurs, il ne semble pas qu'il y ait de modifications temporellement définies de cette activité chez les rats TGR ( $p < 0,083$  ; interaction entre la souche de rat et le stade du développement ; ANOVA II). Toutefois, le faible nombre d'animaux examinés ( $n=4$ ) pourrait expliquer le manque de significativité des différences, pourtant visuellement présentes, entre les valeurs obtenues pour les deux souches de rats. En ne tenant compte que des valeurs obtenues chez les rats contrôles et les rats TGR pour les deux premières minutes du protocole, un test *t* de Student met en évidence une augmentation significative du nombre de mouvements réalisés par les rats TGR. Cette augmentation est de l'ordre de 96 % ( $p < 0,006$ ) à la première minute et de 80 % ( $p = 0,022$ ) à la deuxième minute.

L'ensemble des modifications du comportement locomoteur résultent en une activité déambulatoire totale fortement augmentée chez les rats TGR adultes d'environ 136 % à la première minute et de 106 % à la deuxième minute (Figure III-28A+B) par rapport à leurs contrôles.

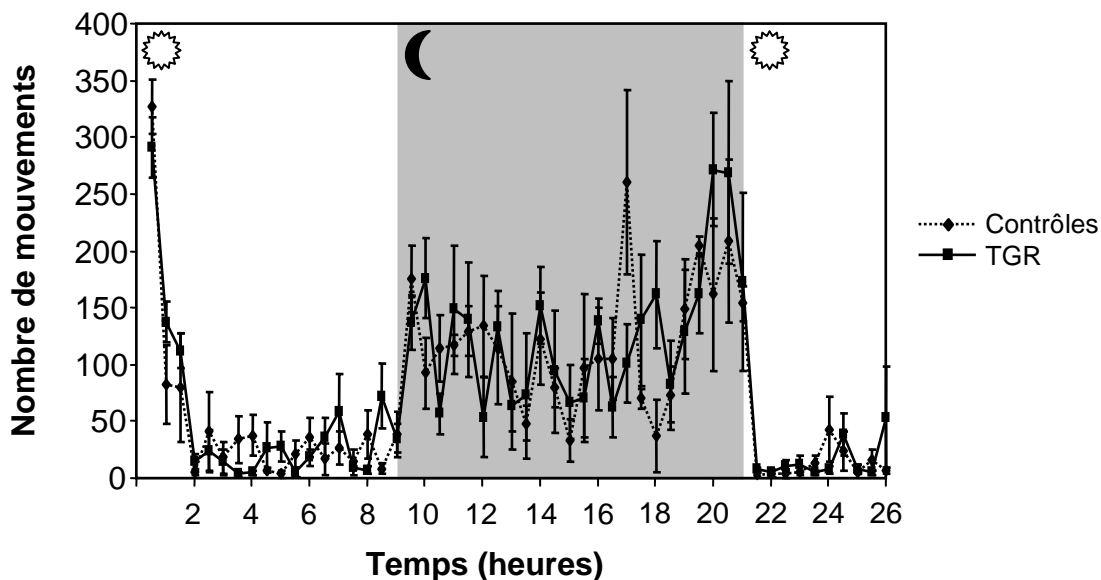


**Figure III-28 : Mesure de l'activité locomotrice des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 adultes en réaction à un stress de nouveauté.**

Les activités déambulatoires à l'avant de la cage et à l'arrière de la cage (A), l'activité déambulatoire de va-et-vient (B), et l'activité déambulatoire totale (A + B ; avant + arrière + va-et-vient) ont été mesurées en continu durant 20 minutes chez les rats contrôles et transgéniques (TGR) après leur introduction dans la cage d'actimétrie, qui représente la « condition nouvelle ». Les valeurs obtenues pour chaque variable ont été sommées toutes les minutes pour les deux groupes de rats. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SEM (n=4) de chaque variable sommée sur 1 minute. Les différences entre les valeurs obtenues pour les deux souches de rats ont été testées à l'aide de l'ANOVA II suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001. Un test t de Student met en relief une différence significative entre les deux souches de rats à 1 et 2 minutes en ce qui concerne l'activité déambulatoire à l'avant et à l'arrière de la cage. §p<0,05 ; §§p<0,01.

#### IV-2.2.2. Activité circadienne

Aucune modification de l'activité locomotrice déambulatoire totale n'a pu être mise en évidence ( $p=0,413$  ; ANOVA II), ni au cours de la période circadienne d'éclairement, ni au cours de la phase circadienne d'obscurité, chez les rats TGR adultes par rapport à leurs contrôles (Figure III-29).



**Figure III-29 : Mesure de l'activité déambulatoire circadienne des rats contrôles et TGR(ASrAOGEN)680 adultes.**

L'activité déambulatoire circadienne des rats contrôles et transgéniques (TGR) (à l'avant de la cage et à l'arrière de la cage + va-et-vient) a été mesurée en continu durant 26 heures (à partir de 10h00 du matin) après leur introduction dans la cage d'actimétrie, qui représente la « condition nouvelle ». Les valeurs obtenues pour chaque variable ont été sommées toutes les 30 minutes pour les deux groupes de rats. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=4$ ) de l'activité déambulatoire totale sommée sur 30 minutes. La phase circadienne d'obscurité est représentée en gris sur le graphique.

---

### *IV-3. Discussion*

Les études réalisées au cours de cette thèse ont révélé une hyper-innervation TH-immunopositive au niveau du gyrus dentelé, et des cortex frontal et cingulaire chez les rats TGR à l'âge adulte. L'origine de ce phénomène reste encore inconnu, mais pourrait résulter de l'altération précoce de la maturation du phénotype TH au niveau du LC. La fonctionnalité de cette hyper-innervation, en terme de synthèse et de libération de neurotransmetteur, reste également à démontrer, et le dosage de la noradrénaline extracellulaire par microdialyse devrait fournir quelques éléments de réponse. Afin de juger de la répercussion fonctionnelle de l'hyper-innervation TH-immunopositive présente dans ces aires de terminaison des neurones du LC chez les rats TGR adultes, nous avons décidé de mesurer certaines fonctions physiologiques dont la régulation dépend de la libération de noradrénaline par les voies coeruleo-corticales et coeruleo-hippocampiques. Notre étude a montré i), une altération de la durée des cycles d'éveil et de sommeil, ainsi que ii), une altération de la réponse locomotrice à un stress de nouveauté chez les rats TGR adultes, résultats qui suggèrent que la présence de noradrénaline au niveau de l'hippocampe et du cortex est modifiée chez ces rats par rapport à leurs contrôles.

La modulation du taux de décharge des neurones du LC est accompagnée d'une modification de l'activité des structures cérébrales sur lesquelles projettent ces derniers (Berridge et Waterhouse, 2003). Ce phénomène serait lié à une modulation de la présence de TH dans les neurones du LC, et en particulier au niveau de leurs prolongements axonaux et dendritiques.

La libération de la noradrénaline dans les aires de terminaison du LC permettrait de potentialiser l'activité électrique évoquée des neurones impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions sensorielles et cognitives. L'innervation noradrénergique (TH-immunopositive) issue des neurones du LC observée au niveau de l'hippocampe et du cortex serait particulièrement impliquée dans la régulation de la rythmicité des cycles d'éveil et de sommeils et la gestion des phénomènes de stress (voir pour revue Svensson, 1987 ; Aston-Jones et al., 1991 ; Berridge et Waterhouse, 2003).

### **Altérations de la durée des cycles d'éveil et de sommeils chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 à l'âge adulte**

Le LC participerait à la régulation de la durée des cycles d'éveil et de sommeils en partie en modulant l'activité des neurones localisés dans le thalamus et le néocortex. La noradrénaline libérée dans ces aires cérébrales augmenterait la réactivité des neurones aux stimuli sensoriels, favorisant ainsi l'établissement et le maintien de la phase d'éveil (voir pour revue Berridge et Waterhouse, 2003). Une étude très récente suggère que la libération de noradrénaline dans l'amygdale par les prolongements des neurones coeruleus pourrait également être mise en jeu dans la régulation des cycles d'éveil et de sommeil (Park, 2002). Les neurones coeruleus seraient aussi impliqués de manière moins directe dans la régulation des cycles d'éveil et de sommeils, en libérant de la noradrénaline au niveau de l'aire du septum médian et de l'aire préoptique médiane de l'hypothalamus. Les neurones localisés dans ces aires cérébrales projettent sur les neurones corticaux et hippocampiques mis en jeu dans l'établissement de la phase d'éveil.

Nous avons pu mettre en évidence que la durée du sommeil paradoxal au cours de la période diurne, période durant laquelle les rats ont une activité de sommeil intense, est fortement augmentée chez les rats TGR adultes en conditions basales. Ce résultat semble être en contradiction avec le rôle reconnu du LC dans le maintien de l'état d'éveil. Toutefois, lors de notre étude, nous n'avons pas réalisé un crible de l'intégralité des aires de terminaison des neurones du LC chez les rats adultes. Il est plausible qu'une altération de l'innervation TH-immunopositive coeruleus soit également présente dans d'autres aires cérébrales et participe aux dysfonctionnements que nous avons pu mettre en évidence. Par ailleurs, une compensation moléculaire et cellulaire à l'excès de noradrénaline pourrait s'être établie au cours des phases tardives du développement dans ces aires cérébrales et pourrait ainsi avoir modifié la relation qui existe dans les conditions de base entre la noradrénaline d'origine coeruleus et l'activité neuronale. Le fait qu'une augmentation de la quantité d'ARNm-TH soit observée dans le LC des rats TGR adultes suggère également que la présence de noradrénaline pourrait être augmentée dans l'environnement des neurones du LC, et incite à penser que l'activité des neurones du LC elle-même pourrait être modifiée chez ces rats. En effet, une augmentation de la quantité d'ARNm-TH peut être associée à une augmentation de la présence de TH sous sa forme catalytiquement active, et vraisemblablement de noradrénaline, dans l'APK et l'APC du LC sous certaines conditions, en particulier après traitement au Vindéburnol (Bezin et al., 2000b). Les résultats que nous avons obtenus à l'aide des techniques de quantification des protéines sur tache et d'HPLC-ED sur des homogénats de LC ne nous permettent pas de discriminer les différentes subdivisions du LC et ne nous

permettent donc pas de pouvoir mesurer de subtiles variations de quantité de TH et de noradrénaline dans des régions particulières de la structure. Si une présence excédentaire de noradrénaline est réellement observée au niveau du LC des rats TGR adultes, alors une inhibition de l'activité des neurones localisés dans la structure pourrait se dérouler par un phénomène d'auto-inhibition mettant en jeu les récepteurs  $\alpha$ -2 adrénergiques. Ce phénomène auto-inhibiteur pourrait ainsi participer à augmenter la durée des phases de sommeil chez ces rats. Cette hypothèse pourrait être testée en mesurant l'impact de l'infusion locale d'antagonistes des récepteurs  $\alpha$ -2 adrénergiques au niveau du LC (bilatéralement) chez les rats TGR adultes sur la durée des cycles d'éveil et de sommeils.

Une privation de sommeil chez le rat induit, au cours des 24 heures suivant cette privation, une augmentation de la durée du sommeil paradoxal. La destruction sélective des neurones du LC par administration d'une neurotoxine, le DSP-4, inhibe ce phénomène de rebond. Cette observation suggère que les neurones noradrénergiques du LC sont activement impliqués dans la compensation physiologique qui se produit suite à une modification profonde des cycles d'éveil et de sommeil (Gonzales et al., 1996). Plus particulièrement, il semble que les prolongements coeruleo-amygdaliens soient mis en jeu dans ce phénomène (Charifi et al., 2000).

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence que le rebond de sommeil paradoxal classiquement décrit chez le rat après une privation de sommeil de 10 heures se déroule également chez les rats TGR adultes. Toutefois, l'amplitude de la variation de la durée du sommeil paradoxal calculée entre les jours pré et post-privation est diminuée chez les rats TGR. L'interprétation d'un tel résultat est plus que difficile. Le fait que la durée basale du sommeil paradoxal soit supérieure chez les rats TGR adultes en comparaison de leurs contrôles pourrait expliquer pourquoi le rebond de sommeil paradoxal est inférieur chez ces rats. Par ailleurs, comme expliqué précédemment, l'excès de noradrénaline qui pourrait être présent dans la région du LC chez les rats TGR adultes par rapport aux contrôles pourrait diminuer l'activité des neurones du LC, et pourrait ainsi participer à diminuer le rebond de sommeil paradoxal après privation de sommeil chez ces rats.

### **Altérations du comportement locomoteur en réponse à un stress de nouveauté chez les rats TGR(ASrAOGEN)680 à l'âge adulte**

Le LC participerait également au traitement des informations relatives au stress, et en particulier au stress déclenché par la nouveauté. La destruction des neurones coeruleins, par choc électrolytique ou injection de 6-hydroxydopamine, induit une diminution des

comportements locomoteur et exploratoire chez les rats exposés à une condition nouvelle, résultant apparemment d'une modification de la gestion du stress (Velley et al., 1988 ; Oknina, 1991). L'implication du LC dans la gestion du stress se ferait probablement par l'intermédiaire de la libération de noradrénaline au niveau de l'hippocampe (Emoto et al., 1993), qui est impliqué chez le rat dans la détection de la nouveauté et qui dirige la réponse comportementale en fonction de la nature du stimulus et du degré de familiarité (Parkin, 1997 ; Knight et Nakada, 1998). De plus, il a récemment été mis en évidence qu'un stress de nouveauté produit une augmentation de la libération de noradrénaline par les prolongements coeruleo-corticaux et pourrait ainsi participer à renforcer l'état de vigilance des rats, dans le but d'assurer l'acquisition des informations sensorielles nécessaires à la gestion du stress.

Nous avons pu mettre en évidence au cours de cette étude que l'activité locomotrice des rats TGR adultes est augmentée par rapport à celle des rats contrôles durant les 2 premières minutes d'un protocole de stress de nouveauté. Le comportement anxieux serait donc plus fort chez les rats TGR, ce qui suggère qu'une libération excessive de noradrénaline pourrait avoir lieu chez ces rats dans l'hippocampe et le cortex. Cette augmentation de NA par rapport aux contrôles, si elle se produit vraiment, pourrait être en partie soutenue par l'hyperinnervation TH-immunopositive que nous avons mise en évidence dans l'hippocampe et le cortex.

### **Considérations à prendre en compte**

La déplétion centrale en angiotensines à 12 semaines pourrait être directement mise en jeu dans l'altération des différents comportements que nous avons étudiés : les angiotensines cérébrales, en particulier les angiotensines II et IV, sont fortement impliquées dans la modulation de différentes fonctions cognitives, telles que l'apprentissage et la mémorisation (voir pour revue Wright et Harding, 1997), et l'adaptation aux phénomènes de stress, de dépression et d'anxiété (voir pour revue Gard, 2002). Par ailleurs, si la noradrénaline joue un rôle important dans la régulation des grandes fonctions physiologiques, ce neurotransmetteur n'est toutefois pas le seul à être impliqué. En effet, la sérotonine, qui est un des neurotransmetteurs les plus représentés au niveau du SNC, est également impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, comme l'alternance des cycles d'éveil et de sommeil (Cespuglio et al., 1990) et l'adaptation aux phénomènes de stress (Hamon, 1994 ; Lanfumey et al., 2000). Une altération du système sérotoninergique pourrait ainsi également être responsable dans les dysfonctionnements comportementaux que nous avons mis en évidence chez les rats TGR adultes. Cette hypothèse, quoiqu'à vérifier, est notamment étayée par les études de Baltatu et coll. (2002) qui ont mis en évidence que l'expression de la

tryptophane hydroxylase, qui est l'enzyme limitante de la synthèse de la sérotonine, est inhibée chez les rats TGR adultes au niveau de la glande pinéale. Ces études suggèrent également que la quantité de mélatonine, une hormone fortement impliquée dans la régulation des cycles d'éveil et de sommeil, est diminuée chez les rats TGR adultes.

### ***IV-3. Conclusions***

L'hyper-innervation noradrénergique du gyrus dentelé et des cortex frontal et cingulaire observée chez les rats TGR à l'âge adulte est associée à l'altération de certains comportements et fonctions physiologiques. L'implication fonctionnelle de l'hyper-innervation noradrénergique que nous avons dévoilée dans ces altérations comportementales reste toutefois encore très imprécise.



## ***Discussion Générale – Conclusion***

Ce travail se place dans le contexte de l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires soutenant l'adaptation à long terme de la neurotransmission noradrénergique au niveau du SNC. Compte tenu de leur intervention dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, les neurones catécholaminergiques nécessitent d'adapter, aussi bien dans le court que dans le long terme, la synthèse et la libération de leur neurotransmetteur dans les territoires qu'ils innervent (pour revue, voir Kumer et Vrana, 1996). A court terme, les modifications de la synthèse des catécholamines reposent essentiellement sur la modulation de l'activité enzymatique spécifique de la tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme limitante de la chaîne de synthèse de la noradrénaline, de la dopamine et de l'adrénaline. Quand la synthèse des catécholamines doit être modifiée sur une échelle temporelle importante, les neurones catécholaminergiques doivent non seulement solliciter des mécanismes permettant d'assurer sur le long terme une synthèse soutenue de protéine TH, mais aussi une modulation fine des mécanismes intervenant dans la régulation du transport de cette protéine dans les différents prolongements des neurones. En effet, le corps cellulaire est le seul lieu de synthèse de la protéine TH, et son adressage vers les prolongements axonaux ou dendritiques doit être finement contrôlé pour maintenir un état de fonctionnement cohérent des neurones catécholaminergiques.

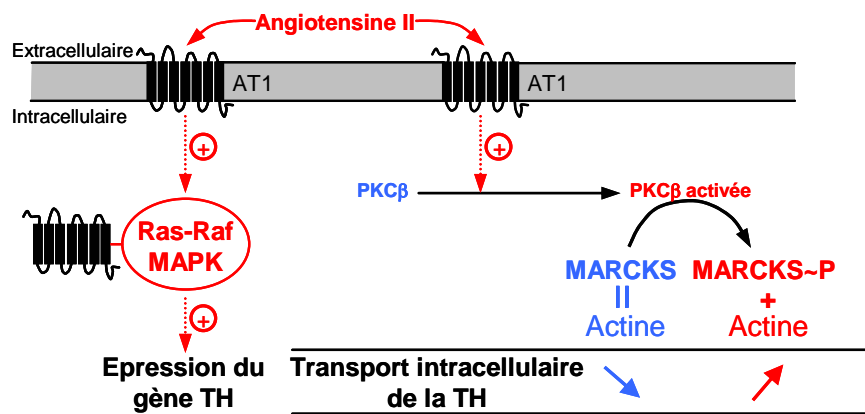
Au niveau du locus coeruleus (LC) par exemple, la noradrénaline peut être libérée par les dendrites des neurones coeruleus (pour revue, voir Singewald et Philippu, 1998), phénomène qui avait initialement été mis en évidence au niveau des neurones dopaminergiques de la substance noire (Nieoullon et al., 1977 ; Chéramy et al., 1981). Les récepteurs alpha-2 adrénergiques sont abondamment présents sur les dendrites des neurones noradrénergiques (Lee et al., 1998), et leur stimulation entraîne une inhibition de l'activité électrique des neurones du LC (Cedarbaum et Aghajanian, 1977). Etant donné qu'une large majorité des afférences aux neurones coeruleus contactent directement leurs dendrites, la libération dendritique locale de noradrénaline participerait à « filtrer » les informations arrivant au LC. Il apparaît ainsi que la noradrénaline libérée dans les aires de terminaisons dépend en partie de la libération dendritique de noradrénaline. Compte tenu du rôle majeur que joue la TH dans la régulation de la quantité de noradrénaline qui sera libérée, son adressage dans les dendrites pourrait représenter un processus essentiel déployé par les neurones coeruleus pour adapter, à moyen ou long terme, la libération de noradrénaline dans les aires de terminaisons.

L'existence de modulations de l'adressage de la TH dans les dendrites des neurones coeruleus a été mise en évidence pour la première fois chez le rat adulte, à la suite de la

stimulation de l'expression du gène TH par administration de RU 24722, de réserpine ou de para-chloro-phénylalanine (Debure, 1995). Ce phénomène a par la suite été retrouvé dans le NTS, toujours chez le rat adulte, après traitement au RU 24722 (Garcia et al., 1994). La question s'est alors posée de savoir quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires qui « orchestrent » l'adressage ordonné de la protéine TH entre les différents compartiments des neurones noradrénergiques, permettant ainsi, dans certaines situations, de diriger des quantités accrues de protéine TH dans le compartiment dendritique. Compte tenu de la complexité des perturbations métaboliques et d'expression génique qu'engendrent les différents modèles pharmacologiques qui avaient permis de révéler ce phénomène de plasticité, il semblait difficile, par une étude de pharmacologie comparée, d'identifier les facteurs spécifiquement impliqués dans la régulation de l'adressage dendritique de la protéine TH. Il était alors apparu essentiel d'exploiter un modèle physiologique où des variations similaires de l'adressage de la TH seraient observées, afin d'identifier les facteurs endogènes participant au contrôle de l'adressage dendritique de la protéine TH, et qui pourraient être « mobilisés » dans le cadre des réponses à ces traitements pharmacologiques chez l'animal adulte. Le modèle physiologique qui a été choisi pour rechercher ces facteurs a été celui du développement, puisqu'il avait été mis en évidence que l'adressage de la protéine TH dans les dendrites de neurones du LC avait lieu au cours d'une période bien délimitée du développement du rat : la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale (Bezin et al., 1994b,c, 1997), alors même que la protéine TH est présente très tôt au cours du développement dans les aires de terminaisons de ces neurones. En effet, la présence de TH dans les terminaisons axonales des neurones coeruleins est justifiée par le fait que la noradrénaline libérée participe à la maturation des tissus cibles (Parnavelas et Blue, 1982 ; Bear et Singer, 1986). Ainsi, la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale constitue pour le LC une période charnière, au cours de laquelle il devait être possible d'identifier des facteurs endogènes responsables de l'initiation de l'adressage de la protéine TH vers les prolongements dendritiques.

Dans la recherche des mécanismes permettant de contrôler l'adressage de la protéine TH, nous avons privilégié l'hypothèse d'un contrôle paracrine exercé par les angiotensines cérébrales. En effet, le LC est une structure cérébrale riche en angiotensinogène (AOGEN ; le précurseur des angiotensines), en angiotensine II (Ang II ; un peptide actif du système angiotensinergique cérébral), et en récepteurs aux angiotensines (voir le chapitre des Rappels bibliographiques). Une série d'études réalisées *in vitro* à partir de cultures de cellules noradrénergiques d'hypothalamus et de tronc cérébral prélevées chez des rats nouveau-nés montre que l'Ang II représente un puissant stimulateur de l'expression et du transport

neuritique de la protéine TH (pour revue, voir Gelband, 1997, Lu et al., 1998). Le contrôle qu'exerce l'Ang II sur l'expression de la TH fait intervenir une stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> aux angiotensines et l'activation de la voie de seconds messagers Ras-Raf-« mitogen activated protein kinase » (MAPKinase). Le contrôle qu'exerce l'Ang II sur le transport neuritique de la protéine TH fait également intervenir AT<sub>1</sub>, et met en jeu une activation de la protéine kinase C β (PKCβ), et la phosphorylation de son substrat fortement myristoylé MARCKS (Lu et al., 1998) (Figure 1). Le processus de phosphorylation de MARCKS apparaît strictement nécessaire à la stimulation du transport neuritique de la protéine TH *in vitro* et serait à la base d'une réorganisation du cytosquelette intracellulaire, permissive au phénomène de transports de protéines et d'organelles.



**Figure 1 : Stimulation de l'expression et du transport neuritique de la TH par l'angiotensine II *in vitro***

L'interaction entre l'angiotensine II et son récepteur de type 1 (AT<sub>1</sub>) entraîne au niveau de neurones noradrénergiques en culture une augmentation de l'expression du gène TH, par l'intermédiaire de l'activation de la voie de signalisation Ras-Raf-« mitogen activated protein kinase » (MAPK), et une augmentation du transport neuritique de la protéine par l'intermédiaire de l'activation de la phosphorylation de la « myristoylated alanine-rich C kinase substrate » (MARCKS) par la protéine kinase C β (PKCβ). La protéine MARCKS sous sa forme native stabilise le réseau d'actine cytoplasmique et rigidifie ainsi le milieu intracellulaire. La phosphorylation de MARCKS par la PKCβ déstabilise l'interaction qui existe entre MARCKS et l'actine et favorise ainsi les phénomènes de transport protéiques et d'organelles dans les neurites des neurones.

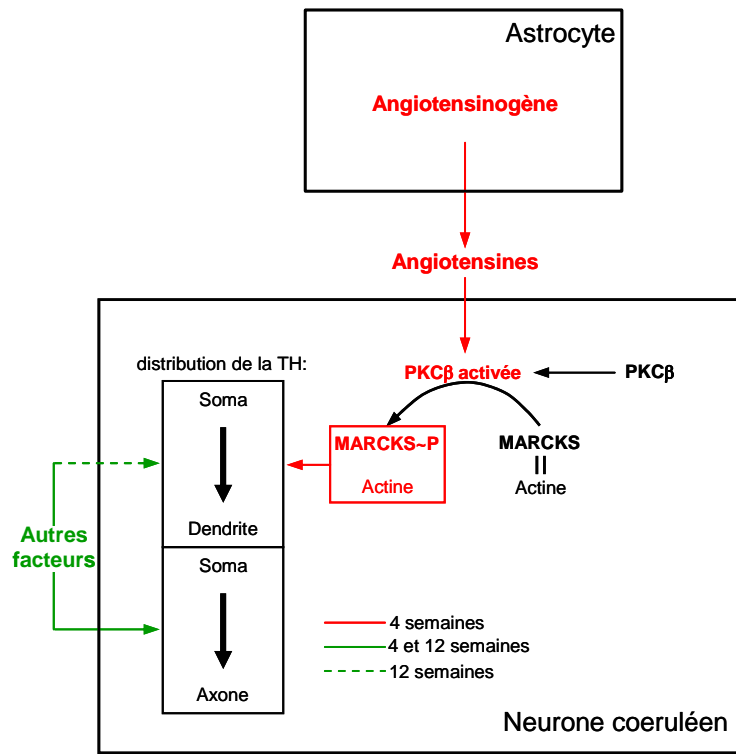
Afin de rechercher *in vivo* si les angiotensines cérébrales sont impliquées dans la régulation de l'adressage de la protéine TH dans les dendrites des neurones coeruleins, nous avons choisi d'étudier le seul modèle animal d'inactivation spécifique du système angiotensinergique cérébral : le rat TGR(ASrAOGEN)680 (TGR) (Schinke et al., 1999). Cette souche de rats est caractérisée par une inhibition de la synthèse d'AOGEN spécifiquement localisée au niveau des astrocytes, qui sont la principale source d'AOGEN au niveau cérébral.

Les différentes comparaisons que nous avons réalisées entre les rats TGR et leurs contrôles nous ont permis de déterminer que l'initiation du transport dendritique de la TH dans les neurones du LC au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale nécessite la stimulation du processus de phosphorylation de la protéine MARCKS par les angiotensines cérébrales. Ce processus n'est toutefois impliqué que pour le transport dendritique de la TH, et non pour son transport axonal, puisque la protéine TH est présente dans les aires de terminaisons du LC très tôt au cours du développement, afin que la noradrénaline libérée permette une maturation cohérente des tissus cibles (Parnavelas et Blue, 1982 ; Bear et Singer, 1986) (Figure 2). Chez les rats adultes, le processus de phosphorylation de MARCKS ne serait pas impliqué dans l'équilibre dynamique de la répartition intracellulaire de la TH, que ce soit au niveau des dendrites ou des axones des neurones du LC. En effet, bien que la TH soit présente dans les corps cellulaires et les dendrites des neurones du LC, ainsi que dans les aires de terminaison axonales de ces neurones, la forme phosphorylée de MARCKS est absente. Toutefois, le fait que la protéine MARCKS native soit présente dans les neurones du LC chez les rats adultes (Ouimet et al., 1990), ne permet pas d'écarter la possibilité que ce processus soit à nouveau sollicité dans le cadre d'une augmentation de la protéine TH dans les dendrites des neurones du LC, comme cela avait été observé à la suite du traitement par le RU 24722, la réserpine ou la para-chloro-phénylalanine (Debure, 1995).

Ainsi, notre étude met l'accent sur le fait que les angiotensines cérébrales sont impliquées dans l'adaptation de la neurotransmission noradrénergique coeruleenne au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale au niveau du LC. Etant donné que l'ensemble des angiotensines cérébrales dérive d'un précurseur unique qui est synthétisé au niveau des astrocytes, il semble évident que dorénavant, les cellules gliales localisées au niveau du LC ne peuvent plus être considérées comme étant de « simples » supports métaboliques pour les neurones. Au contraire, elles maintiendraient un dialogue dynamique avec cette population de neurones, modulant ainsi leur fonctionnalité.

Le mécanisme que nous proposons à la figure n° 2 ne serait pas spécifique des neurones du LC, mais serait également applicable aux neurones noradrénergiques et adrénérgiques du NTS et de la medulla ventro-latérale. En effet, nous avons mis en évidence dans cette thèse que la mise en place du phénotype TH dans le NTS suit un profil très similaire à celui du LC, et que l'augmentation de la quantité de TH dans cette structure se situe au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale. En outre, nous avons montré chez les rats TGR que cette augmentation de TH dans le NTS est retardée, et que le recouvrement des valeurs contrôles s'établit avec une cinétique similaire à ce que nous avons montré pour le LC. Ces

résultats suggèrent donc que le transport dendritique de la protéine TH dans les neurones noradrénergiques bulbaires ne serait dépendant de la présence de la protéine MARCKS phosphorylée qu'à la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale.



**Figure 2 : Schéma récapitulatif des acteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans la mise en place et la maturation du transport de la protéine TH dans les compartiments intracellulaires des neurones du LC.**

A 4 semaines, le transport dendritique de la protéine TH est pris en charge par le processus de phosphorylation de la protéine MARCKS, sous le contrôle des angiotensines cérébrales dérivées de l'angiotensinogène glial et de la protéine kinase Cβ (PKCβ). Le transport axonal de la TH serait pris en charge par des acteurs moléculaires n'appartenant pas au système angiotensinergique. A 12 semaines, la régulation du transport dendritique de la TH ne fait plus appel au système angiotensines/MARCKS et serait pris en charge, comme le transport axonal, par d'autres facteurs.

L'implication des angiotensines cérébrales dans l'expression du gène *th* et le transport dendritique de la TH à 4 semaines ne serait toutefois pas généralisée à l'ensemble des structures centrales catécholaminergiques. En effet, à 4 semaines, l'absence d'angiotensines n'a pas de répercussions visibles sur la distribution de la protéine TH au niveau de la substance noire, une structure dopaminergique majeure du SNC. Ainsi, il se pourrait que les angiotensines cérébrales, en contrôlant spécifiquement l'expression du gène *th* et l'adressage dendritique de la protéine TH dans les neurones (nor)adrénergiques, soient l'un des facteurs clés de la spécificité des réponses des neurones noradrénergiques du LC à certains stimuli pharmacologiques, tels que les traitements à la réserpine (Reis et al., 1974 ; Biguet et al., 1986) et au RU 24722 (Labatut et al., 1988), et à certains stimuli physiologiques, tel que le stress au froid (Richard et al., 1988). En effet, ces stimuli provoquent une augmentation

tonique de l'expression du gène *th* (ARNm-TH et protéine TH) au niveau du LC chez le rat adulte, sans modifications au niveau de la substance noire. Ainsi, stress au froid, traitement à la réserpine ou au RU 24722 pourraient dans un premier temps stimuler l'expression des protéines clés du système angiotensinergique au niveau des neurones noradrénergiques centraux, et du LC notamment, ce qui aurait pour conséquence de stimuler, dans un second temps, l'expression du gène *th* et l'adressage dendritique de la protéine TH dans ces neurones catécholaminergiques seulement.

L'étude comportementale des rats déplétés en angiotensines cérébrales montre que certaines fonctions, telles que la gestion du stress ou encore l'équilibre entre les durées des phases de sommeil et d'éveil, sont altérées à l'âge adulte. Ces fonctions mettent en jeu une libération de noradrénaline par les connexions coeruleo-corticales et coeruleo-hippocampiques (Oknina, 1991 ; Velly et al., 1988 ; Pudovkina et al., 2001 ; voir pour revue Berridge et Waterhouse, 2003), ce qui suggère que la neurotransmission noradrénergique coeruleenne est altérée chez ces rats à l'âge adulte. Ces altérations importantes de grandes fonctions vitales pourraient résulter soit de la déplétion en angiotensines, qui sont reconnues comme pouvant directement modifier l'activité électrique des neurones corticaux et hippocampiques (pour revue, voir Gard, 2002), soit résulter de l'hyper-innervation TH-immunopositive observée dans ces deux structures. De plus, les rats TGR développent à l'âge adulte certaines pathologies cardiovasculaires (Schinke et al., 1999 ; Baltatu et al., 2001), qui pourraient relever de l'augmentation de la noradrénaline tissulaire que nous avons mesurée chez ces rats.

Les observations réalisées à 4 semaines chez les rats TGR incitent à penser que le système noradrénergique central est également fortement altéré chez les rats déplétés en angiotensines cérébrales à ce stade du développement. En effet, la forte diminution de TH dans les prolongements dendritiques des neurones du LC, et très probablement dans les dendrites des neurones du NTS, suggère que la libération somato-dendritique de noradrénaline est fortement diminuée dans ces deux structures. Ainsi, l'ensemble des processus auto-inhibiteurs se déroulant au niveau du LC et du NTS dans les conditions contrôles à 4 semaines seraient absents chez les rats TGR, ce qui modifierait très probablement la quantité de noradrénaline libérée au niveau de leurs tissus cibles. Etant donné le rôle trophique que possède la noradrénaline au cours du développement, il est probable que la maturation des cellules et l'activité neuronale soient largement modifiées au niveau des aires de terminaison des neurones du LC et du NTS.

---

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence que le système angiotensinergique cérébral, grâce à une étroite collaboration neuro-astrocytaire, permettrait l'adaptation de la neurotransmission noradrénergique au niveau du LC et du NTS au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine postnatale. Une altération de ce système créerait de profonds remaniements du système nerveux central non seulement à cette période bien précise du développement, mais également à l'âge adulte. Différentes perspectives s'offrent à nous afin de compléter ce travail de thèse. La concentration en noradrénaline au niveau du NTS, du LC et de ses aires de terminaison, pourrait être mesurée à l'aide de la technique de microdialyse intracérébrale, afin d'observer une éventuelle altération des libérations somato-dendritiques et axonales de noradrénaline. Une étude de la présence des récepteurs adrénergiques dans ces différentes aires cérébrales pourrait venir en complément de l'étude des taux de noradrénaline. Enfin, il sera important de vérifier si la phosphorylation de la protéine MARCKS est sollicitée à l'âge adulte dans des situations où l'adressage dendritique de la protéine TH est augmenté.



## ***Bibliographie***

---

**-A-**

Allen A.M., Moeller I., Jenkins T.A., Zhuo J., Aldred G.P., Chai S.Y., Mendelsohn F.A. Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res Bull* 1998,47:17-28.

Alliot F., Rutin J., Leenen P.J., Pessac B. Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. *J Neurosci Res* 1999,58:367-378.

Arango V., Underwood M.D., Mann J.J. Biologic alterations in the brainstem of suicides. *Psychiatr Clin North Am* 1997,20:581-593.

Araujo R.C., Lima M.P., Lomez E.S., Bader M., Pesquero J.B., Sumitani M., Pesquero J.L. Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II. *Physiol Behav* 2002,76:327-333.

Arbuzova A., Schmitz A.A., Vergeres G. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J* 2002,362:1-12.

Armstrong D.M., Ross C.A., Pickel V.M., Joh T.H., Reis D.J. Distribution of dopamine-, noradrenaline-, and adrenaline-containing cell bodies in the rat medulla oblongata: demonstrated by the immunocytochemical localization of catecholamine biosynthetic enzymes. *J Comp Neurol* 1982,212:173-187.

Astier B. Les neurones adrénérgiques centraux: études immunohistochimique et biochimique chez le rat. [thèse d'état]. Lyon: Université Claude Bernard; 1988:306.

Aston-Jones G., Ennis M., Pieribone V.A., Nickell W.T., Shipley M.T. The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* 1986,234:734-737.

Aston-Jones G., Chiang C., Alexinsky T. Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Prog Brain Res* 1991,88:501-520.

**-B-**

Baltatu O., Afeche S.C., Jose dos Santos S.H., Campos L.A., Barbosa R., Michelini L.C., Bader M., Cipolla-Neto J. Locally synthesized angiotensin modulates pineal melatonin generation. *J Neurochem* 2002,80:328-334.

Baltatu O., Janssen B.J., Bricca G., Plehm R., Monti J., Ganten D., Bader M. Alterations in blood pressure and heart rate variability in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Hypertension* 2001,37:408-413.

Barraco R., el-Ridi M., Ergene E., Parizon M., Bradley D. An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull* 1992,29:703-765.

Bear M.F., Singer W. Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature* 1986,320:172-176

Berod A., Chat M., Paut L., Tappaz M. Catecholaminergic and GABAergic anatomical relationship in the rat substantia nigra, locus coeruleus, and hypothalamic median eminence: immunocytochemical visualization of biosynthetic enzymes on serial semithin plastic-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 1984,32:1331-1338.

Berridge C.W., Waterhouse B.D. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 2003,42:33-84.

Bezin L., Diaz J.J., Marcel D., Le Cavorsin M., Madjar J.J., Pujol J.F., Weissmann D. Controlled targeting of tyrosine hydroxylase protein toward processes of locus coeruleus neurons during postnatal development. *Brain Res Mol Brain Res* 1997,50:23-32.

Bezin L., Marcel D., Debure L.I., Ginovart N., Rousset C., Pujol J.F., Weissmann D. Postnatal development of the tyrosine hydroxylase-containing cell population within the rat locus coeruleus: topological organization and phenotypic plasticity. *J Neurosci* 1994a,14:7486-7501.

Bezin L., Marcel D., Desgeorges S., Pujol J.F., Weissmann D. Singular subsets of locus coeruleus neurons may recover tyrosine hydroxylase phenotype transiently expressed during development. *Brain Res Mol Brain Res* 2000a,76:275-281.

Bezin L., Marcel D., Garcia C., Blum D., Lafargue P., Lellouche J.P., Pujol J.F., Weissmann D. In situ examination of tyrosine hydroxylase activity in the rat locus coeruleus using (3',5')-[<sup>3</sup>H(2)]-alpha-fluoromethyl-tyrosine as substrate of the enzyme. *Synapse* 2000b,35:201-211.

Bezin L., Marcel D., Rousset C., Pujol J.F., Weissmann D. Ontogeny of tyrosine hydroxylase levels in the neuropil close to locus caeruleus. *Neuroreport* 1994c,5:1809-1812.

Bezin L., Marcel D., Rousset C., Pujol J.F., Weissmann D. Quantitative study of tyrosine hydroxylase protein levels within the somatic area of the rat locus coeruleus during postnatal development. *J Neurosci* 1994b,14:7502-7510.

Biguet N.F., Buda M., Lamouroux A., Samolyk D., Mallet J. Time course of the changes of TH mRNA in rat brain and adrenal medulla after a single injection of reserpine. *EMBO J* 1986,5:287-291.

Bjorklund A., Lindvall O. Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Res* 1975,83:531-537.

Blackshear P.J. The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J Biol Chem* 1993,268:1501-1504.

Bobrovskaya L., Odell A., Leal R.B., Dunkley P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. *J Neurochem* 2001,78:490-498.

Bourde O., Schmitt P., Robert F., Richard F., Carbonnele A.C., Thal C., Pujol J.F. Long-term effect of RU24722 on tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus: differential effects of two enantiomeric forms. *Neurochem Int* 1993,23:567-574.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976,72:248-254.

Brasier A.R., Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension* 1996,27:465-475.

-C-

Cambi F., Fung B., Chikaraishi D. 5' flanking DNA sequences direct cell-specific expression of rat tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* 1989,53:1656-1659.

Cammarota M., Bevilacqua L.R., Rostas J.A., Dunkley P.R. Histamine activates tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells through a pathway that involves ERK1/2 but not p38 or JNK. *J Neurochem* 2003,84:453-458.

Campbell D.J., Habener J.F. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 1986,78:31-39.

- Caroni P. Intrinsic neuronal determinants that promote axonal sprouting and elongation. *Bioessays* 1997,19:767-775.
- Castillo S.O., Baffi J.S., Palkovits M., Goldstein D.S., Kopin I.J., Witta J., Magnuson M.A., Nikodem V.M. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol Cell Neurosci* 1998,11:36-46.
- Casto R., Phillips M.I. Cardiovascular actions of microinjections of angiotensin II in the brain stem of rats. *Am J Physiol* 1984a,246:R811-816.
- Casto R., Phillips M.I. Mechanism of pressor effects by angiotensin in the nucleus tractus solitarius of rats. *Am J Physiol* 1984b,247:R575-581.
- Casto R., Phillips M.I. Neuropeptide action in nucleus tractus solitarius: angiotensin specificity and hypertensive rats. *Am J Physiol* 1985,249:R341-347.
- Casto R., Phillips M.I. A role for central angiotensin in regulation of blood pressure at the nucleus tractus solitarius. *Clin Exp Hypertens A* 1984c,6:1933-1937.
- Cedarbaum J.M., Aghajanian G.K. Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol* 1978,178:1-16.
- Cedarbaum J.M., Aghajanian G.K. Catecholamine receptors on locus coeruleus neurons: pharmacological characterization. *Eur J Pharmacol* 1977,44:375-385.
- Cespuglio R., Sarda N., Gharib A., Chastrette N., Houdouin F., Rampin C., Jouvét M. Voltammetric detection of the release of 5-hydroxyindole compounds throughout the sleep-waking cycle of the rat. *Exp Brain Res* 1990,80:121-128.
- Chai C.Y., Hellmann W., Tseng C.J., Luft F.C., Ganten D. Angiotensinogen mRNA and pressor reactions to angiotensin in brain stem areas of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1993,15:709-725.
- Chamba G., Fety R., Astier B., Lambas-Senas L., Renaud B. Adrenaline and noradrenaline neurons in rat lower brain stem: anatomical and pharmacological neurochemistry. *Clin Exp Hypertens A* 1984,6:259-271.
- Chamba G., Weissmann D., Rousset C., Renaud B., Pujol J.F. Distribution of alpha-1 and alpha-2 binding sites in the rat locus coeruleus. *Brain Res Bull* 1991,26:185-193.
- Chan J.S., Chan A.H., Jiang Q., Nie Z.R., LaChance S., Carriere S. Molecular cloning and expression of the rat angiotensinogen gene. *Pediatr Nephrol* 1990,4:429-435.
- Chan J.S., Wang T.T., Zhang S.L., Chen X., Carriere S. Catecholamines and angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Mol Cell Biochem* 2000,212:73-79.
- Charifi C., Paut-Pagano L., Debilly G., Cespuglio R., Jouvét M., Valatx J.L. Effect of noradrenergic denervation of the amygdala upon recovery after sleep deprivation in the rat. *Neurosci Lett* 2000,287:41-44.
- Chen X., Zhang S.L., Pang L., Filep J.G., Tang S.S., Ingelfinger J.R., Chan J.S. Characterization of a putative insulin-responsive element and its binding protein(s) in rat angiotensinogen gene promoter: regulation by glucose and insulin. *Endocrinology* 2001,142:2577-2585.
- Cheramy A., Leviel V., Glowinski J. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 1981,289:537-542.

Cintra L., Diaz-Cintra S., Kemper T., Morgane P.J. Nucleus locus coeruleus: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res* 1982,247:17-28.

Clouston W.M., Evans B.A., Haralambidis J., Richards R.I. Molecular cloning of the mouse angiotensinogen gene. *Genomics* 1988,2:240-248.

Cooper J., Bloom F.E., Roth R.M. Catecholamines I: general aspect. In: *The biochemical basis of neuropharmacology*. Cooper J. R., Bloom, F.E. and Roth R.H. Eds. New York: Oxford University Press 1989,203-258.

Cote F., Do T.H., Laflamme L., Gallo J.M., Gallo-Payet N. Activation of the AT(2) receptor of angiotensin II induces neurite outgrowth and cell migration in microexplant cultures of the cerebellum. *J Biol Chem* 1999,274:31686-31692.

Cottet-Emard J.M., Dalmaz Y., Pequignot J., Peyrin L., Pequignot J.M. Long-term exposure to ozone alters peripheral and central catecholamine activity in rats. *Pflugers Arch* 1997,433:744-749.

Coulon J.F., Biguet N.F., Cavoy A., Delacour J., Mallet J., David J.C. Gene expression of tyrosine hydroxylase in the developing fetal brain. *J Neurochem* 1990,55:1412-1417.

Cransac H., Cottet-Emard J.M., Pequignot J.M., Peyrin L. Monoamines (noradrenaline, dopamine, serotonin) in the rat cochlear nuclei: endogenous levels and turnover. *Hear Res* 1995,90:65-71.

Crespi F., Buda M., McRae-Degueurce A., Pujol J.F. Alteration of tyrosine hydroxylase activity in the locus coeruleus after administration of p-chlorophenylalanine. *Brain Res* 1980,191:501-509.

#### -D-

Dahlström A., Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol Scand* 1964,62:janv-55.

De Gasparo M., Catt K.J., Inagami T., Wright J.W., Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000,52:415-472.

De Jong W., Nijkamp F.P. Centrally induced hypotension and bradycardia after administration of alpha-methylnoradrenaline into the area of the nucleus tractus solitarii of the rat. *Br J Pharmacol* 1976,58:593-598.

Debure L.I. Expression de la tyrosine hydroxylase dans le locus coeruleus du rat adulte: mises en évidence d'une compartimentation entre aire somatique et neuropile péricœruléen, et de sa plasticité dans trois modèles pharmacologiques. [thèse de doctorat]. Lyon: Université Claude Bernard; 1995.

Debure L.I., Bezin L., Ginovart N., Rousset C., Pujol J.F., Weissmann D. RU24722 induces spatially organized phenotypic plasticity in the locus coeruleus. *Neuroreport* 1994,5:1793-1796.

Debure L.I., Moyse E., Fevre-Montange M., Hardin H., Belin M.F., Rousset C., Pujol J.F., Weissmann D. Somatotopic organization of tyrosine hydroxylase expression in the rat locus coeruleus: long term effect of RU24722. *Brain Res* 1992,581:19-32.

Denny J.B., Polan-Curtain J., Wayner M.J., Armstrong D.L. Angiotensin II blocks hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 1991,567:321-324.

Deschepper C.F., Flaxman M. Glucocorticoid regulation of rat diencephalon angiotensinogen production. *Endocrinology* 1990,126:963-970.

Devau G., Multon M.F., Pujol J.F., Buda M. Inhibition of tyrosine hydroxylase activity by serotonin in explants of newborn rat locus ceruleus. *J Neurochem* 1987,49:665-670.

Diaz Borges J.M., Urbina M., Drujan B.D. Some properties of phenylethanolamine-N-methyltransferase of rat brain. *Neurochem Res* 1978,3:15-26.

D'Mello S. R., Turzai L.M., Gioio A. E., Kaplan B.B. Isolation and structural characterization of the bovine tyrosine hydroxylase gene. *J Neurosci Res* 1989,23:31-40.

Dumont E.C., Rafrafi S., Laforest S., Drolet G. Involvement of central angiotensin receptors in stress adaptation. *Neuroscience* 1999,93:877-884.

Dzau V.J. Mechanism of action of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors in hypertension and heart failure. Role of plasma versus tissue ACE. *Drugs* 1990,39 Suppl 2:11-16.

#### -E-

Eilam D., Golani I. Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. *Behav Brain Res* 1989,34:199-211.

El Mestikawy S., Glowinski J., Hamon M. Tyrosine hydroxylase activation in depolarized dopaminergic terminals--involvement of Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation. *Nature* 1983,302:830-832.

El Mestikawy S., Gozlan H., Glowinski J., Hamon M. Characteristics of tyrosine hydroxylase activation by K<sup>+</sup>-induced depolarization and/or forskolin in rat striatal slices. *J Neurochem* 1985,45:173-184.

Emery D.L., Royo N.C., Fischer I., Saatman K.E., McIntosh T.K. Plasticity following injury to the adult central nervous system: is recapitulation of a developmental state worth promoting? *J Neurotrauma* 2003,20:1271-1292.

Emoto H., Koga C., Ishii H., Yokoo H., Yoshida M., Tanaka M. The effect of CRF antagonist on immobilization stress-induced increases in noradrenaline release in rat brain regions. *Yakubutsu Seishin Kodo* 1993,13:81-87.

Erdmann B., Fuxe K., Ganten D. Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Hypertension* 1996,28:818-824.

#### -F-

Feldmer M., Kaling M., Takahashi S., Mullins J.J., Ganten D. Glucocorticoid- and estrogen-responsive elements in the 5'-flanking region of the rat angiotensinogen gene. *J Hypertens* 1991,9:1005-1012.

Felix D., Schelling P. Increased sensitivity of neurons to angiotensin II in SHR as compared to WKY rats. *Brain Res* 1982,252:63-69.

Fillenz M. Short-term control of transmitter synthesis in central catecholaminergic neurones. *Prog Biophys Mol Biol* 1993,60:29-46.

Fior D.R., Yang S.N., Ganten U., Ganten D., Fuxe K. Evidence for a differential modulation of the alpha-2 adrenoceptors by angiotensin II in the nucleus tractus solitarii of the spontaneously hypertensive and the Wistar-Kyoto normotensive rats. *Brain Res* 1995,679:168-177.

Fitzpatrick P.F. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 1999,68:355-381.

---

Fitzsimons J.T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 1998,78:583-686.

Flatmark T., Almas B., Ziegler M.G. Catecholamine metabolism: an update on key biosynthetic enzymes and vesicular monoamine transporters. *Ann N Y Acad Sci* 2002,971:69-75.

Fogarty D.J., Matute C. Angiotensin receptor-like immunoreactivity in adult brain white matter astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 2001,35:131-146.

Fukamizu A., Takahashi S., Seo M.S., Tada M., Tanimoto K., Uehara S., Murakami K. Structure and expression of the human angiotensinogen gene. Identification of a unique and highly active promoter. *J Biol Chem* 1990,265:7576-7582.

Fung B.P., Yoon S.O., Chikaraishi D. M. Sequences that direct rat tyrosine hydroxylase gene expression. *J Neurochem* 1992,58:2044-2052.

Fuxe K., Bunnemann B., Aronsson M., Tinner B., Cintra A., von Euler G., Agnati L. F., Nakanishi S., Ohkubo H., Ganten D. Pre- and postsynaptic features of the central angiotensin systems. Indications for a role of angiotensin peptides in volume transmission and for interactions with central monoamine neurons. *Clin Exp Hypertens* 1988,10:143-168.

Fuxe K., Ganten D., Hokfelt T., Locatelli V., Poulsen K., Stock G., Rix E., Taugner R. Renin-like immunocytochemical activity in the rat and mouse brain. *Neurosci Lett* 1980,18:245-250.

#### -G-

Gadbut A.P., Cash S.M., Dagiantis W.P., Cooper S., Weyhenmeyer J.A. Release of angiotensin in response to ionic stimulation: a possible role for calmodulin in the secretory event. *Brain Res Bull* 1992,28:551-555.

Gagne C., Moysse E., Kocher L., Bour H., Pujol J.F. Light-microscopic localization of somatostatin binding sites in the locus coeruleus of the rat. *Brain Res* 1990,530:196-204.

Gaillard I., Clauser E., Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA* 1989,8:87-99.

Garcia C., Denoroy L., Le Cavorsin M., Pujol J.F., Weissmann D. Pharmacological modulations of adrenergic phenotype in medullary C2 and C3 cell groups of adult rat. *J Chem Neuroanat* 1996,11:131-142.

Garcia C., Marcel D., Le Cavorsin M., Pujol J.F., Weissmann D. Phenotypic characteristics of expressed tyrosine hydroxylase protein in the adult rat nucleus tractus solitarius: plasticity revealed by RU24722 treatment. *Neuroscience* 1994,62:1201-1205.

Gard P.R. The role of angiotensin II in cognition and behaviour. *Eur J Pharmacol* 2002,438:1-14.

Gelband C.H., Sumners C., Lu D., Raizada M.K. Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: implications of functional coupling. *Regul Pept* 1997,72:139-145.

Gelband C.H., Warth J.D., Mason H.S., Zhu M., Moore J.M., Kenyon J.L., Horowitz B., Sumners C. Angiotensin II type 1 receptor-mediated inhibition of K<sup>+</sup> channel subunit kv2.2 in brain stem and hypothalamic neurons. *Circ Res* 1999,84:352-359.

Gil J., Larrinaga G., Meana J.J., Rodriguez-Puertas R., Irazusta J., Casis L. Regional and subcellular distribution of soluble aminopeptidase in the human and the rat brain: a comparative study. *Neuropeptides* 2001,35:276-284.

Gillon J.Y., Labatut R., Renaud B., Pujol J.F. Subcellular distribution of tyrosine hydroxylase in some catecholaminergic rat brain areas determined by a quantitative immunoblot assay. *J Neurochem* 1989,52:677-683.

Gonzalez M.M., Valatx J.L., Debilly G. Role of the locus coeruleus in the sleep rebound following two different sleep deprivation methods in the rat. *Brain Res* 1996,740:215-226.

Gordon M.S., Chin W.W., Shupnik M.A. Regulation of angiotensinogen gene expression by estrogen. *J Hypertension* 1992,10:361-366.

Goridis C., Brunet J.F. Transcriptional control of neurotransmitter phenotype. *Curr Opin Neurobiol.* 1999,9:47-53.

Grammatopoulos T., Morris K., Ferguson P., Weyhenmeyer J. Angiotensin protects cortical neurons from hypoxic-induced apoptosis via the angiotensin type 2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 2002,99:114-124.

Granata A.R., Kitai S.T. Intracellular study of nucleus parabrachialis and nucleus tractus solitarii interconnections. *Brain Res* 1989,492:281-292.

Greenland K., Wyse B., Sernia C. Identification and characterization of angiotensinIV binding sites in rat neurone and astrocyte cell cultures. *J Neuroendocrinol* 1996,8:687-693.

Grima B., Lamouroux A., Blanot F., Biguet N.F., Mallet J. Complete coding sequence of rat tyrosine hydroxylase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985,82:617-621.

Groves P.M., Wilson C.J. Fine structure of rat locus coeruleus. *J Comp Neurol* 1980a,193:841-852.

Groves P.M., Wilson C.J. Monoaminergic presynaptic axons and dendrites in rat locus coeruleus seen in reconstructions of serial sections. *J Comp Neurol* 1980b,193:853-862.

Grzanna R., Molliver M.E. The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience* 1980b,5:21-40.

Guevara-Guzman R., Garcia-Diaz D.E., Solano-Flores L.P., Wayner M.J., Armstrong D.L. Role of the paraventricular nucleus in the projection from the nucleus of the solitary tract to the olfactory bulb. *Brain Res Bull* 1991,27:447-450.

Gu Q. Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* 2002,111:815-835.

## -H-

Hamon M. Neuropharmacology of anxiety: perspectives and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 1994,15:36-39.

Harding J.W., Jensen L.L., Hanesworth J.M., Roberts K.A., Page T.A., Wright J.W. Release of angiotensins in paraventricular nucleus of rat in response to physiological and chemical stimuli. *Am J Physiol* 1992,262:F17-23.

Haycock J.W. Species differences in the expression of multiple tyrosine hydroxylase protein isoforms. *J Neurochem* 2002,81:947-953.

Haycock J.W. Multiple signaling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser19, Ser31 and Ser40. *Neurochem Res* 1993,18:15-26.



- Haycock J.W. Quantitation of tyrosine hydroxylase, protein levels: spot immunolabeling with an affinity-purified antibody. *Anal Biochem* 1989,181:259-266.
- Haycock J.W., Haycock D.A. Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. *J Biol Chem* 1991,266:5650-5657.
- Healy D.P., Printz M.P. Distribution of immunoreactive angiotensin II, angiotensin I, angiotensinogen and renin in the central nervous system of intact and nephrectomized rats. *Hypertension* 1984,6:1130-136.
- Healy D.P., Rettig R., Nguyen T., Printz M.P. Quantitative autoradiography of angiotensin II receptors in the rat solitary-vagal area: effects of nodose ganglionectomy or sinoaortic denervation. *Brain Res* 1989,484:1-12.
- Healy D.P., Wilk S. Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II. *Brain Res* 1993,606:295-303.
- Healy D.P., Ye M.Q., Yuan L.X., Schachter B.S. Stimulation of angiotensinogen mRNA levels in rat pituitary by estradiol. *Am J Physiol* 1992,263:E355-361.
- Henry J.P., Sagne C., Botton D., Isambert M.F., Gasnier B. Molecular pharmacology of the vesicular monoamine transporter. *Adv Pharmacol* 1998,42:236-239.
- Herbert H. Evidence for projections from medullary nuclei onto serotonergic and dopaminergic neurons in the midbrain dorsal raphe nucleus of the rat. *Cell Tissue Res* 1992,270:149-156.
- Herbert H., Moga M.M., Saper C.B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 1990,293:540-580.
- Hökfelt L., Johansson O., Goldstein M. Central catecholamine neurons as revealed by immunohistochemistry with special reference to adrenaline neurons. In: *Handbook of chemical neuroanatomy*. b. A. a. H. T. Eds. Amsterdam: Elsevier; 1984:157-276.
- Holets V.R. The anatomy and function of noradrenaline in the mammalian brain. In *The pharmacology of noradrenaline in the central nervous system*. Marsden C.A. and Heal D.J. Eds., Oxford University Press, 1-40.
- Holz R.W. Evidence that catecholamine transport into chromaffin vesicles is coupled to vesicle membrane potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978,75:5190-5194.
- Hong-Brown L.Q., Brown C.R. Cytokine and insulin regulation of alpha 2 macroglobulin, angiotensinogen, and hsp 70 in primary cultured astrocytes. *Glia* 1994,12:211-218.
- Hong-Brown L.Q., Deschepper C.F. Effects of thyroid hormones on angiotensinogen gene expression in rat liver, brain, and cultured cells. *Endocrinology* 1992,130:1231-1237.
- Huang X.C., Deng T., Sumners C. Angiotensin II stimulates activation of Fos-regulating kinase and c-Jun NH2-terminal kinase in neuronal cultures from rat brain. *Endocrinology* 1998,139:245-251.
- Huang X.C., Richards E.M., Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor-mediated stimulation of protein phosphatase 2A in rat hypothalamic/brainstem neuronal cocultures. *J Neurochem* 1995,65:2131-2137.
- Huang X.C., Richards E.M., Sumners C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J Biol Chem* 1996,271:15635-15641.

Huang Z.M., Thewke D., Gong Q.Q., Schlichter D., Wicks W.D. Functional recognition of the neuronal tyrosine hydroxylase cAMP regulatory element in different cell types. *Brain Res Mol Brain Res* 1991,11:309-319.

Husain A., Smeby R.R., Krontiris-Litowitz J., Speth R.C. Brain renin: localization in rat brain synaptosomal fractions. *Brain Res* 1981,222:182-186.

**-I-**

Iijima K. Chemocytoarchitecture of the rat locus ceruleus. *Histol Histopathol* 1993,8:581-591.

Inagami T., Celio M.R., Clemens D.L., Lau D., Takii Y., Kasselberg A.G., Hirose S. Renin in rat and mouse brain: immunohistochemical identification and localization. *Clin Sci (Lond)* 1980a,59 Suppl 6:49s-51s.

Inagami T., Clemens D.L., Celio M.R., Brown A., Sandru L., Herschkowitz N., Hoffman L.H., Kasselberg A.G. Immunohistochemical localization of renin in mouse brain. *Neurosci Lett* 1980b,18:91-98.

Iversen L. Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS drug discovery. *Mol Psychiatry* 2000,5:357-362.

Iwata N., Kobayashi K., Sasaoka T., Hidaka H., Nagatsu T. Structure of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1992,182:348-354.

Iwawaki T., Kohno K., Kobayashi K. Identification of a potential nurr1 response element that activates the tyrosine hydroxylase gene promoter in cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000,274:590-595.

**-J-**

Jones B.E. Noradrenergic locus coeruleus neurons: their distant connections and their relationship to neighboring (including cholinergic and GABAergic) neurons of the central gray and reticular formation. *Prog Brain Res* 1991,88:15-30.

Jones B.E., Moore R.Y. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res* 1977,127:25-53.

Jordan D., Spyer K.M. Brainstem integration of cardiovascular and pulmonary afferent activity. *Prog Brain Res* 1986,67:295-314.

**-K-**

Kalia M., Fuxe K., Goldstein M. Rat medulla oblongata. II. Dopaminergic, noradrenergic (A1 and A2) and adrenergic neurons, nerve fibers, and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol* 1985a,233:308-332.

Kalia M., Fuxe K., Goldstein M. Rat medulla oblongata. III. Adrenergic (C1 and C2) neurons, nerve fibers and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol* 1985b,233:333-349.

Kalinyak J.E., Hoffman A.R., Perlman A. J. Ontogeny of angiotensinogen mRNA and angiotensin II receptors in rat brain and liver. *J Endocrinol Invest* 1991,14:647-653.

Kalinyak J.E., Perlman A. J. Tissue-specific regulation of angiotensinogen mRNA accumulation by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987,262:460-464.

Kang J., Sumners C., Posner P. Modulation of net outward current in cultured neurons by angiotensin II: involvement of AT1 and AT2 receptors. *Brain Res* 1992,580:317-325.

---

Karwowska-Polecka W., Kulakowska A., Wisniewski K., Braszko J.J. Losartan influences behavioural effects of angiotensin II(3-7) in rats. *Pharmacol Res* 1997,36:275-283.

Kasparov S., Butcher J.W., Paton J.F. Angiotensin II receptors within the nucleus of the solitary tract mediate the developmental attenuation of the baroreceptor vagal reflex in pre-weaned rats. *J Auton Nerv Syst* 1998,74:160-168.

Kasparov S., Paton J.F. Differential effects of angiotensin II in the nucleus tractus solitarii of the rat-plausible neuronal mechanism. *J Physiol* 1999,521 Pt 1:227-238.

Kawai Y., Senba E. Organization of excitatory and inhibitory local networks in the caudal nucleus of tractus solitarius of rats revealed in in vitro slice preparation. *J Comp Neurol* 1996,373:309-321.

Kawai Y., Senba E. Postnatal differentiation of local networks in the nucleus of the tractus solitarius. *Neuroscience* 2000,100:109-114.

Kawai Y., Takagi H., Yanai K., Tohyama M. Adrenergic projection from the caudal part of the nucleus of the tractus solitarius to the parabrachial nucleus in the rat: immunocytochemical study combined with a retrograde tracing method. *Brain Res* 1988,459:369-372.

Kim K.S., Lee M.K., Carroll J., Joh T.H. Both the basal and inducible transcription of the tyrosine hydroxylase gene are dependent upon a cAMP response element. *J Biol Chem* 1993,268:15689-15695.

Knight R.T., Nakada T. Cortico-limbic circuits and novelty: a review of EEG and blood flow data. *Rev Neurosci* 1998,9:57-70.

Kobilansky C., Lanzinger I., Philippu A. Release of endogenous catecholamines in the nucleus tractus solitarii during experimentally induced blood pressure changes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988,337:125-130.

Kopp N., Chigr F., Denoroy L., Gilly R., Jordan D. Absence of adrenergic neurons in nucleus tractus solitarius in sudden infant death syndrome. *Neuropediatrics* 1993,24:25-29.

Korner P.I., Head G.A., Badoer E., Bobik A., Angus J.A. Role of brain amine transmitters and some neuromodulators in blood pressure, heart rate, and baroreflex control. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987,10:S26-32.

Krukoff T.L., Vu T., Harris K.H., Aippersbach S., Jhamandas J.H. Neurons in the rat medulla oblongata containing neuropeptide Y-, angiotensin II-, or galanin-like immunoreactivity project to the parabrachial nucleus. *Neuroscience* 1992,47:175-184.

Kumer S.C., Vrana K.E. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 1996,67:443-462.

-L-

Labatut R., Richard F., Milne B., Quintin L., Lecestre D., Pujol J.F. Long-term effects of RU24722 on tyrosine hydroxylase of the rat brain. *J Neurochem* 1988,51:1367-1374.

Lachuer J., Gaillet S., Barbagli B., Buda M., Tappaz M. Differential early time course activation of the brainstem catecholaminergic groups in response to various stresses. *Neuroendocrinology* 1991,53:589-596.

Laflamme L., Gasparo M., Gallo J.M., Payet M.D., Gallo-Payet N. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT1 receptors. *J Biol Chem* 1996,271:22729-22735.

- Lanfumey L., Pardon M.C., Laaris N., Joubert C., Hanoun N., Hamon M., Cohen-Salmon C. 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *Neuroreport* 1999,10:3369-3374.
- Laniece P., Le Hir H., Bodeau-Pean S., Charon Y., Valentin L., Thermes C., Mallet J., Dumas S. A novel rat tyrosine hydroxylase mRNA species generated by alternative splicing. *J Neurochem* 1996,66:1819-1825.
- Lasiter P.S., Wong D.M., Kachele D.L. Postnatal development of the rostral solitary nucleus in rat: dendritic morphology and mitochondrial enzyme activity. *Brain Res Bull* 1989,22:313-321.
- Lawrence A.J., Jarrott B. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. *Prog Neurobiol* 1996,48:21-53.
- Lazaroff M., Patankar S., Yoon S.O., Chikaraishi D.M. The cyclic AMP response element directs tyrosine hydroxylase expression in catecholaminergic central and peripheral nervous system cell lines from transgenic mice. *J Biol Chem* 1995,270:21579-21589.
- Le Bourdelles B., Boularand S., Boni C., Horellou P., Dumas S., Grima B., Mallet J. Analysis of the 5' region of the human tyrosine hydroxylase gene: combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated tyrosine hydroxylase isoforms. *J Neurochem* 1988,50:988-991.
- Lee A., Rosin D.L., Van Bockstaele E.J. Alpha<sub>2A</sub>-adrenergic receptors in the rat nucleus locus coeruleus: subcellular localization in catecholaminergic dendrites, astrocytes, and presynaptic axon terminals. *Brain Res* 1998,795:157-169.
- Lee E.H., Ma Y.L., Wayner M.J., Armstrong D. L. Impaired retention by angiotensin II mediated by the AT<sub>1</sub> receptor. *Peptides* 1995,16:1069-1071.
- Leger L., Descarries L. Serotonin nerve terminals in the locus coeruleus of adult rat: a radioautographic study. *Brain Res* 1978,145:1-13.
- Lehnert H., Schulz C., Dieterich K. Physiological and neurochemical aspects of corticotropin-releasing factor actions in the brain: the role of the locus coeruleus. *Neurochem Res* 1998,23:1039-1052.
- Lenkei Z., Palkovits M., Corvol P., Llorens-Cortes C. Distribution of angiotensin II type-2 receptor (AT<sub>2</sub>) mRNA expression in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 1996,373:322-339.
- Lenkei Z., Palkovits M., Corvol P., Llorens-Cortes C. Distribution of angiotensin type-1 receptor messenger RNA expression in the adult rat brain. *Neuroscience* 1998,82:827-841.
- Lenkei Z., Palkovits M., Corvol P., Llorens-Cortes C. Expression of angiotensin type-1 (AT<sub>1</sub>) and type-2 (AT<sub>2</sub>) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol* 1997,18:383-439.
- Leviel V., Guibert B., Mallet J., Faucon-Biguët N. Induction of tyrosine hydroxylase in the rat substantia nigra by local injection of forskolin. *J Neurosci Res* 1991,30:427-432.
- Levin B.E. The use of neurotoxins to characterize the rates and subcellular distributions of axonally transported dopamine-beta-hydroxylase, tyrosine hydroxylase and norepinephrine in the rat brain. *Brain Res* 1979,168:331-350.
- Lewander T., Joh T.H., Reis D. J. Tyrosine hydroxylase: delayed activation in central noradrenergic neurons and induction in adrenal medulla elicited by stimulation of central cholinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1977,200:523-534.

Li Y.W., Guyenet P.G. Neuronal excitation by angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla of the rat in vitro. *Am J Physiol* 1995,268:R272-277.

Li Z., Ferguson A.V. Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *Am J Physiol* 1993,265:R302-309.

Lindgren N., Goigny M., Herrera-Marschitz M., Haycock J.W., Hokfelt T., Fisone G. Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by depolarization stimulates tyrosine hydroxylase phosphorylation and dopamine synthesis in rat brain. *Eur J Neurosci* 2002,15:769-773.

Lindvall O., Bjorklund A. The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1974,412:1-48.

Loughlin S.E., Fallon J.J. The locus coeruleus. In *The rat nervous system: neuroanatomy for neuroscientists*. Paxinos G. Eds., Academic Press, Sydney, 1985:79-93.

Loughlin S.E., Foote S.L., Bloom F.E. Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience* 1986a,18:291-306.

Loughlin S.E., Foote S.L., Grzanna R. Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 1986b,18:307-319.

Lu D., Yang H., Lenox R.H., Raizada M.K. Regulation of angiotensin II-induced neuromodulation by MARCKS in brain neurons. *J Cell Biol* 1998,142:217-227.

Lu D., Yang H., Raizada M.K. Angiotensin II regulation of neuromodulation: downstream signaling mechanism from activation of mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 1996,135:1609-1617.

Luque J.M., de Blas M.R., Segovia S., Guillamon A. Sexual dimorphism of the dopamine-beta-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat locus ceruleus. *Brain Res Dev Brain Res* 1992,67:211-215.

#### -M-

Machado B.H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann N Y Acad Sci* 2001,940:179-196.

MacLean M.R., Raizada M.K., Sumners C. The influence of angiotensin II on catecholamine synthesis in neuronal cultures from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990,167:492-497.

Maeda T., Kojima Y., Arai R., Fujimiya M., Kimura H., Kitahama K., Geffard M. Monoaminergic interaction in the central nervous system: a morphological analysis in the locus coeruleus of the rat. *Comp Biochem Physiol C* 1991,98:193-202.

Marshall K.C., Christie M.J., Finlayson P.G., Williams J.T. Developmental aspects of the locus coeruleus-noradrenaline system. *Prog Brain Res* 1991,88:173-185.

Masserano J.M., Vulliet P.R., Tank A.W., Weiner N. The role of tyrosine hydroxylase in the regulation of catecholamine synthesis. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Edited by V. a. W. Trendelenburg, N. Eds. Berlin: Springer Verlag; 1989:427-469.

McRae-Degueurce A., Berod A., Mermet A., Keller A., Chouvet G., Joh T.H., Pujol J.F. Alterations in tyrosine hydroxylase activity elicited by raphe nuclei lesions in the rat locus coeruleus: evidence for the involvement of serotonin afferents. *Brain Res* 1982,235:285-301.

- Meyer J.M., Felten D.L., Weyhenmeyer J.A. Measurement of immunoreactive angiotensin II levels in microdissected brain nuclei from developing spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Exp Neurol* 1990,107:164-169.
- Michelini L.C. Oxytocin in the NTS. A new modulator of cardiovascular control during exercise. *Ann N Y Acad Sci* 2001,940:206-220.
- Millan M.A., Jacobowitz D.M., Aguilera G., Catt K.J. Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991a,88:11440-11444.
- Millan M.A., Kiss A., Aguilera G. Developmental changes in brain angiotensin II receptors in the rat. *Peptides* 1991b,12:723-737.
- Miyawaki T., Kawamura H., Komatsu K., Yasugi T. Chemical stimulation of the locus coeruleus: inhibitory effects on hemodynamics and renal sympathetic nerve activity. *Brain Res* 1991,568:101-108.
- Moffett R.B., Bumpus F.M., Husain A. Cellular organization of the brain renin-angiotensin system. *Life Sci* 1987,41:1867-1879.
- Monti J., Schinke M., Bohm M., Ganten D., Bader M., Bricca G. Glial angiotensinogen regulates brain angiotensin II receptors in transgenic rats TGR(ASrAOGEN). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001,280:R233-240.
- Montminy M.R., Gonzalez G.A., Yamamoto K.K. Characteristics of the cAMP response unit. *Metabolism* 1990,39:6-12.
- Moore R.Y., Card J.P. Noradrenaline-containing neuron systems. In *Handbook of chemical anatomy. Vol. 2: classical transmitters in the CNS, Part I*. Björklund A. and Hökfelt Eds. Elsevier, Amsterdam, 123-156.
- Morgan J.I., Curran T. Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci* 1995,18:66-67.
- Morgan J.M., Routtenberg A. Angiotensin injected into the neostriatum after learning disrupts retention performance. *Science* 1977,196:87-89.
- Mori M., Ishizaki K., Yamada T., Chen H., Sugiyama T., Serikawa T., Yamada J. Restriction fragment length polymorphisms of the angiotensinogen gene in inbred rat strains and mapping of the gene on chromosome 19q. *Cytogenet Cell Genet* 1989,50:42-45.
- Morilak D.A., Fornal C.A., Jacobs B. L. Effects of physiological manipulations on locus coeruleus neuronal activity in freely moving cats. II. Cardiovascular challenge. *Brain Res* 1987,422:24-31.
- Morin X., Cremer H., Hirsch M.R., Kapur R.P., Goridis C., Brunet J.F. Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene Phox2a. *Neuron* 1997,18:411-423.
- Mouchet P., Manier M., Dietl M., Feuerstein C., Berod A., Arluison M., Denoroy L., Thibault J. Immunohistochemical study of catecholaminergic cell bodies in the rat spinal cord. *Brain Res Bull* 1986,16:341-353.
- Mueller R.A., Thoenen H., Axelrod J. Inhibition of trans-synaptically increased tyrosine hydroxylase activity by cycloheximide and actinomycin D. *Mol Pharmacol* 1969,5:463-469.
- Mungall B.A., Shinkel T.A., Sernia C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain. *Neuroscience* 1995,67:505-524.

Murase S., Inui K., Nosaka S. Baroreceptor inhibition of the locus coeruleus noradrenergic neurons. *Neuroscience* 1994,61:635-643.

Murrin L.C., Morgenroth V.H., Roth R.H. Dopaminergic neurons: effects of electrical stimulation on tyrosine hydroxylase. *Mol Pharmacol* 1976,12:1070-1081.

Murrin L.C., Roth R.H. Dopaminergic neurons: reversal of effects elicited by gamma-butyrolactone by stimulation of the nigro-neostriatal pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1976,295:15-20.

-N-

Nagatsu T. Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1993,60:165-174.

Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 1964,239:2910-2917.

Nakamura S., Kimura F., Sakaguchi T. Postnatal development of electrical activity in the locus ceruleus. *J Neurophysiol* 1987,58:510-524.

Nakamura S., Sakaguchi T., Kimura F., Aoki F. The role of alpha 1-adrenoceptor-mediated collateral excitation in the regulation of the electrical activity of locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 1988,27:921-929.

Nieoullon A., Cheramy A., Glowinski J. Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra. *Nature* 1977,266:375-377.

Nishii T., Moriguchi A., Morishita R., Yamada K., Nakamura S., Tomita N., Kaneda Y., Fukamizu A., Mikami H., Higaki J., Ogihara T. Angiotensinogen gene-activating elements regulate blood pressure in the brain. *Circ Res* 1999,85:257-263.

Nuyt A.M., Lenkei Z., Corvol P., Palkovits M., Llorens-Cortes C. Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor mRNAs in fetal and neonatal rat brain. *J Comp Neurol* 2001,440:192-203.

Nuyt A.M., Lenkei Z., Palkovits M., Corvol P., Llorens-Cortes C. Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain. *J Comp Neurol* 1999,407:193-206.

-O-

Ohkubo H., Kageyama R., Ujihara M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983,80:2196-2200.

Ohkubo H., Nakayama K., Tanaka T., Nakanishi S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem* 1986,261:319-323.

Oknina N.B. The dynamic behavioral changes in rats after destruction of the locus coeruleus. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 1991,41:543-550.

Okuno S., Fujisawa H. Conversion of tyrosine hydroxylase to stable and inactive form by the end products. *J Neurochem* 1991,57:53-60.

Olpe H.R., Steinmann M. Responses of locus coeruleus neurons to neuropeptides. *Prog Brain Res* 1991,88:241-248.

O'Malley K.L., Rotwein P. Human tyrosine hydroxylase and insulin genes are contiguous on chromosome 11. *Nucleic Acids Res* 1988,16:4437-4446.

Ordway G.A. Pathophysiology of the locus coeruleus in suicide. *Ann N Y Acad Sci* 1997,836:233-252.

Ouimet C.C., Wang J.K., Walaas S.I., Albert K.A., Greengard P. Localization of the MARCKS (87 kDa) protein, a major specific substrate for protein kinase C, in rat brain. *J Neurosci* 1990,10:1683-1698.

**-P-**

Palkovits M., Mezey E., Zaborszky L., Feminger A., Versteeg D.H., Wijnen H.J., de Jong W., Fekete M.I., Herman J.P., Kanyicska B. Adrenergic innervation of the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 1980,18:237-243.

Pan S.J., Zhu M., Raizada M.K., Summers C., Gelband C.H. ANG II-mediated inhibition of neuronal delayed rectifier K<sup>+</sup> current: role of protein kinase C- $\alpha$ . *Am J Physiol Cell Physiol* 2001,281:C17-23.

Park S.P. In vivo microdialysis measures of extracellular norepinephrine in the rat amygdala during sleep-wakefulness. *J Korean Med Sci* 2002,17:395-399.

Parkin A.J. Human memory: novelty, association and the brain. *Curr Biol* 1997,7:768-769.

Parnavelas J.G., Blue M.E. The role of the noradrenergic system on the formation of synapses in the visual cortex of the rat. *Brain Res* 1982,255:140-144.

Pattyn A., Goridis C., Brunet J.F. Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. *Mol Cell Neurosci* 2000,15:235-243.

Pattyn A., Morin X., Cremer H., Goridis C., Brunet J.F. Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. *Development* 1997,124:4065-4075.

Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. San Diego: Academic Press; 1998.

Phillipu A., Matthaei H. Transport and storage of catecholamines in vesicles. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Edited by V. a. W. Trendelenburg, N. Eds. Berlin: Springer Verlag; 1988:1-42.

Pickel V.M., Chan J., Ganten D. Dual peroxidase and colloidal gold-labeling study of angiotensin converting enzyme and angiotensin-like immunoreactivity in the rat subformal organ. *J Neurosci* 1986a,6:2457-2469.

Pickel V.M., Chan J., Milner T.A. Cellular substrates for interactions between neurons containing phenylethanolamine N-methyltransferase and GABA in the nuclei of the solitary tracts. *J Comp Neurol* 1989a,286:243-259.

Pickel V.M., Chan J., Milner T.A. Ultrastructural basis for interactions between central opioids and catecholamines. II. Nuclei of the solitary tracts. *J Neurosci* 1989b,9:2519-2535.

Pickel V.M., Chan J., Park D.H., Joh T.H., Milner T.A. Ultrastructural localization of phenylethanolamine N-methyltransferase in sensory and motor nuclei of the vagus nerve. *J Neurosci Res* 1986b,15:439-455.

Pickel V.M., Joh T. H., Reis D.J. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in noradrenergic neurons of brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975,72:659-663.

Pudovkina O.L., Kawahara Y., de Vries J., Westerink B.H. The release of noradrenaline in the locus coeruleus and prefrontal cortex studied with dual-probe microdialysis. *Brain Res* 2001,906:38-45.



---

**-R-**

Ramirez M., Arechaga G., Garcia S., Sanchez B., Lardelli P., Gandarias J.M. Soluble and membrane-bound leucyl- and arginyl-aminopeptidase activities in subcellular fractions of young and adult rat brains. *Rev Esp Fisiol* 1990,46:393-397.

Ramirez-Exposito M.J., Martinez-Martos J.M., Mayas M.D., Garcia M.J., Prieto I., Arechaga G., Ramirez M. Oleate, linoleate and cholesterol differently modify aspartyl- and glutamyl-aminopeptidase activities in primary cultures of rat astrocytes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001,128:113-118.

Reis D.J. The nucleus tractus solitarius and experimental neurogenic hypertension: evidence for a central neural imbalance hypothesis of hypertensive disease. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1981,28:409-420.

Reis D.J., Joh T.H., Ross R.A., Pickel V.M. Reserpine selectively increases tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase enzyme protein in central noradrenergic neurons. *Brain Res* 1974,81:380-386.

Renaud B., Joh T.H., Synder D.W., Reis D.J. Induction and delayed activation of tyrosine hydroxylase in noradrenergic neurons of A1 and A2 groups of medulla oblongata of rat. *Brain Res* 1979,176:169-174.

Richard F., Faucon-Bigué N., Labatut R., Rollet D., Mallet J., Buda M. Modulation of tyrosine hydroxylase gene expression in rat brain and adrenals by exposure to cold. *J Neurosci Res* 1988,20:32-37.

Roux J.C., Mamet J., Perrin D., Peyronnet J., Royer C., Cottet-Emard J.M., Pequignot J.M., Dalmaz Y. Neurochemical development of the brainstem catecholaminergic cell groups in rat. *J Neural Transm* 2003,110:51-65.

Rowe B.P., Grove K.L., Saylor D.L., Speth R.C. Angiotensin II receptor subtypes in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 1990,186:339-342.

Ruggiero D.A., Ross C.A., Anwar M., Park D.H., Joh T.H., Reis D.J. Distribution of neurons containing phenylethanolamine N-methyltransferase in medulla and hypothalamus of rat. *J Comp Neurol* 1985,239:127-154.

**-S-**

Sakaguchi T., Nakamura S. Some in vivo electrophysiological properties of locus coeruleus neurones in fetal rats. *Exp Brain Res* 1987,68:122-130.

Sancho-Tello M., Valles S., Montoliu C., Renau-Piqueras J., Guerri C. Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. *Glia* 1995, 15:157-166.

Sandberg K., Ji H., Clark A.J., Shapira H., Catt K.J. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J Biol Chem* 1992,267:9455-9458.

Saper C.B., Sorrentino D.M., German D.C., de Lacalle S. Medullary catecholaminergic neurons in the normal human brain and in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1991,29:577-584.

Sasaoka T., Kobayashi K., Nagatsu I., Takahashi R., Kimura M., Yokoyama M., Nomura T., Katsuki M., Nagatsu T. Analysis of the human tyrosine hydroxylase promoter-chloramphenicol acetyltransferase chimeric gene expression in transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1992,16:274-286.

- Saucedo-Cardenas O., Quintana-Hau J.D., Le W.D., Smidt M.P., Cox J.J., De Mayo F., Burbach J.P., Conneely O.M. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998,95:4013-4018.
- Schimmel J.J., Crews L., Roffler-Tarlov S., Chikaraishi D.M. 4.5 kb of the rat tyrosine hydroxylase 5' flanking sequence directs tissue specific expression during development and contains consensus sites for multiple transcription factors. *Brain Res Mol Brain Res* 1999,74:1-14.
- Schinke M., Baltatu O., Bohm M., Peters J., Rascher W., Bricca G., Lippoldt A., Ganten D., Bader M. Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999,96:3975-3980.
- Schmitt P., Pequignot J., Garcia C., Pujol J.F., Pequignot J.M. Regional specificity of the long-term regulation of tyrosine hydroxylase in some catecholaminergic rat brainstem areas. I. Influence of long-term hypoxia. *Brain Res* 1993b,611:53-60.
- Schmitt P., Pequignot J., Hanchin F., Pujol J.F., Pequignot J.M. Regional specificity of long-term regulation of tyrosine hydroxylase in some catecholaminergic rat brainstem areas. II. Effect of a chronic dihydralazine treatment. *Brain Res* 1993c,611:61-66.
- Schmitt P., Reny-Palasse V., Bourde O., Garcia C., Pujol J.F. Further characterization of the long-term effect of RU24722 on tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* 1993a,61:1423-1429.
- Schweitzer M.K., Champagnat J., Denavit-Saubie M. Two distinct phases characterize maturation of neurons in the nucleus of the tractus solitarius during early development: morphological and electrophysiological evidence. *J Comp Neurol* 1993,327:37-47.
- Sernia C. Location and secretion of brain angiotensinogen. *Regul Pept* 1995,57:1-18.
- Sernia C., Zeng T., Kerr D., Wyse B. Novel perspectives on pituitary and brain angiotensinogen. *Front Neuroendocrinol* 1997,18:174-208.
- Shenoy U.V., Richards E.M., Huang X.C., Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology* 1999,140:500-509.
- Shibuya I., Utsunomiya K., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Cheah T.B., Ueta Y., Izumi F., Yanagihara N. Regulation of catecholamine synthesis by leptin. *Ann N Y Acad Sci* 2002,971:522-527.
- Sievers J., Lolova I., Jenner S., Klemm H.P., Sievers H. Morphological and biochemical studies on the ontogenesis of the nucleus locus coeruleus. *Bibl Anat* 1981:52-130.
- Sim L.J., Joseph S.A. Efferents of the opiocortin-containing region of the commissural nucleus tractus solitarius. *Peptides* 1994,15:169-174.
- Singewald N., Philippu A. Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog Neurobiol* 1998,56:237-267.
- Singhaniyom W., Wreford N.G., Guldner F.H. Asymmetric distribution of catecholamine-containing neuronal perikarya in the upper cervical spinal cord of rat. *Neurosci Lett* 1983,41:91-97.
- Smith K.M., Mitchell S.N., Joseph M. H. Effects of chronic and subchronic nicotine on tyrosine hydroxylase activity in noradrenergic and dopaminergic neurones in the rat brain. *J Neurochem* 1991,57:1750-1756.

Specht L.A., Pickel V.M., Joh T.H., Reis D.J. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. *J Comp Neurol* 1981,199:233-253.

Speth R.C., Grove K.L., Rowe B.P. Angiotensin II and the locus coeruleus. *Prog Brain Res* 1991,88:217-226.

Stadler T., Veltmar A., Qadri F., Unger T. Angiotensin II evokes noradrenaline release from the paraventricular nucleus in conscious rats. *Brain Res* 1992,569:117-122.

Stornetta R.L., Hawelu-Johnson C.L., Guyenet P.G., Lynch K.R. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* 1988,242:1444-1446.

Stroth U., Meffert S., Gallinat S., Unger T. Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 1998,53:187-195.

Sumitomo T., Suda T., Nakano Y., Tozawa F., Yamada M., Demura H. Angiotensin II increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 1991,128:2248-2252.

Sumners C., Fleegal M.A., Zhu M. Angiotensin AT1 receptor signalling pathways in neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002,29:483-490.

Sumners C., Phillips M.I. Central injection of angiotensin II alters catecholamine activity in rat brain. *Am J Physiol* 1983,244:R257-263.

Sun C., Sumners C., Raizada M.K. Chronotropic action of angiotensin II in neurons via protein kinase C and CaMKII. *Hypertension* 2002,39:562-566.

Sutherland C., Alterio J., Campbell D.G., Le Bourdelles B., Mallet J., Haavik J., Cohen P. Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2. *Eur J Biochem* 1993,217:715-722.

Sutin E.L., Jacobowitz D.M. Immunocytochemical localization of peptides and other neurochemicals in the rat laterodorsal tegmental nucleus and adjacent area. *J Comp Neurol* 1988,270:243-270.

Svensson TH. Peripheral, autonomic regulation of locus coeruleus noradrenergic neurons in brain: putative implications for psychiatry and psychopharmacology. *Psychopharmacology* 1987,92:1-7.

Swanson L.W. The locus coeruleus: a cytoarchitectonic, Golgi and immunohistochemical study in the albino rat. *Brain Res* 1976,110:39-56.

-T-

Takekoshi K., Ishii K., Shibuya S., Kawakami Y., Isobe K., Nakai T. Stimulation of catecholamine biosynthesis via the protein kinase C pathway by endothelin-1 in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Biochem Pharmacol* 2002,63:977-984.

Talman W.T., Dragon D.N., Ohta H., Lin L.H. Nitroxidergic influences on cardiovascular control by NTS: a link with glutamate. *Ann N Y Acad Sci* 2001,940:169-178.

Ter Horst G.J., de Boer P., Luiten P.G., van Willigen J.D. Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 1989,31:785-797.

Tiveron M.C., Hirsch M.R., Brunet J.F. The expression pattern of the transcription factor Phox2 delineates synaptic pathways of the autonomic nervous system. *J Neurosci* 1996,16:7649-7660.

Toska K., Kleppe R., Armstrong C.G., Morrice N.A., Cohen P., Haavik J. Regulation of tyrosine hydroxylase by stress-activated protein kinases. *J Neurochem* 2002,83:775-783.

Tsutsumi K., Saavedra J.M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol* 1991,261:R209-216.

Tsutsumi K., Seltzer A., Saavedra J.M. Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain. *Brain Res* 1993,631:212-220.

Tucker D.C., Saper C.B., Ruggiero D.A., Reis D.J. Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J Comp Neurol* 1987,259:591-603.

-U-

Unger T., Badoer E., Ganten D., Lang R.E., Rettig R. Brain angiotensin: pathways and pharmacology. *Circulation* 1988,77:140-54.

Utsunomiya K., Yanagihara N., Tachikawa E., Cheah T.B., Kajiwara K., Toyohira Y., Ueno S., Izumi F. Stimulation of catecholamine synthesis in cultured bovine adrenal medullary cells by leptin. *J Neurochem* 2001,76:926-934.

-V-

Vachette C., Bourde O., Gillon J.Y., Pujol J.F., Renaud B. Decrease in the reactivity of locus coeruleus neurons to hypotension after an increase in their tyrosine hydroxylase content: a subregional in vivo voltammetry study in the rat. *Eur J Neurosci* 1993,5:261-268.

Vachette C., Debure L., Rousset C., Pujol J.F., Renaud B. Relationship between tyrosine hydroxylase content and noradrenergic cell reactivity to piperoxane: an in vivo voltammetric approach in the rat locus coeruleus. *Eur J Neurosci* 1994,6:364-373.

Valentino R.J., Wehby R.G. Corticotropin-releasing factor: evidence for a neurotransmitter role in the locus ceruleus during hemodynamic stress. *Neuroendocrinology* 1988,48:674-677.

Van Bockstaele E.J., Peoples J., Telegan P. Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol* 1999,412:410-428.

Velley L., Mormede P., Kempf E. Neurochemical lesion of the nucleus locus coeruleus increases neophobia in a specific exploration task but does not modify endocrine response to moderate stress. *Pharmacol Biochem Behav* 1988,29:1-7.

Velley L., Verney C., Kempf E., Berger B. Opposite effects of ibotenic acid and 6-hydroxydopamine lesions of the lateral hypothalamus on intracranial self-stimulation and stimulation-induced locomotion. *Neuroscience* 1988,25:595-603.

Verney C., Berger B., Adrien J., Vigny A., Gay M. Development of the dopaminergic innervation of the rat cerebral cortex. A light microscopic immunocytochemical study using anti-tyrosine hydroxylase antibodies. *Brain Res* 1982,281:41-52.

Vincent A., Tell F. Postnatal development of rat nucleus tractus solitarius neurons: morphological and electrophysiological evidence. *Neuroscience* 1999,93:293-305.

Von Bohlen Und Halbach O. Angiotensin IV in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 2003,311:1-9.

---

Von Bohlen und Halbach O., Walther T., Bader M., Albrecht D. Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *J Neurophysiol* 2000,83:2012-2021.

Vrana S.L., Vrana S.E., Koves T.R., Smith J.E., Dworkin S.I. Chronic cocaine injection increases CNS tyrosine hydroxylase enzyme activity and mRNA levels and tryptophan hydroxylase enzyme activity levels. *J Neurochem* 1993,61:2262-2268.

-W-

Wang T.T., Chen X., Wu X.H., Zhang S.L., Chan J.S. Molecular mechanism(s) of action of isoproterenol on the expression of the angiotensinogen gene in opossum kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* 1999,55:1713-1723.

Wang X., Yang H., Raizada M.K. Angiotensin II increases vesicular trafficking in brain neurons. *Hypertension* 2001,37:677-682.

Watanabe T., Fujioka T., Hashimoto M., Nakamura S. Stress and brain angiotensin II receptors. *Crit Rev Neurobiol* 1998,12:305-317.

Wayner M.J., Armstrong D.L., Polan-Curtain J.L., Denny J.B. Role of angiotensin II and AT1 receptors in hippocampal LTP. *Pharmacol Biochem Behav* 1993,45:455-464.

Wayner M.J., Polan-Curtain J., Armstrong D.L. Dose and time dependency of angiotensin II inhibition of hippocampal long-term potentiation. *Peptides* 1995,16:1079-1082.

Weiner N., Molinof P.B. Catecholamines. In: *Basic Neurochemistry*. Edited by G. Siegel, Agranoff, B., Albers, R.W. and Molinoff, P. Eds. Fourth Edition ed. New York: Raven Press; 1989:233-253.

Weissmann D., Belin M.F., Aguera M., Meunier C., Maitre M., Cash C.D., Ehret M., Mandel P., Pujol J.F. Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience* 1987,23:291-304.

Weyhenmeyer J.A., Phillips M.I. Angiotensin-like immunoreactivity in the brain of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1982,4:514-523.

Wong D.L., Yamasaki L., Ciaranello R.D. Characterization of the isozymes of bovine adrenal medullary phenylethanolamine N-methyltransferase. *Brain Res* 1987,410:32-44.

Wong L.F., Polson J.W., Murphy D., Paton J.F., Kasparov S. Genetic and pharmacological dissection of pathways involved in the angiotensin II-mediated depression of baroreflex function. *Faseb J* 2002,16:1595-1601.

Wright J.W., Harding J.W. Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2, and AT4 and their functions. *Regul Pept* 1995,59:269-295.

Wright J.W., Harding J.W. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Rev* 1997,25:96-124.

Wright J.W., Harding J.W. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Brain Res Rev* 1992,17:227-262.

Wright J.W., Roberts K.A., Stublely L.A., Hanesworth J.M., Harding J.W. Hypothalamic angiotensin release in response to AII or glutamic acid stimulation of the SFO in rats. *Brain Res Bull* 1993,31:649-654.

-Y-

---

Yamada T., Horiuchi M., Dzau V.J. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996,93:156-160.

Yamazaki T., Ninomiya I. Noradrenaline contributes to modulation of the carotid sinus baroreflex in the nucleus tractus solitarii area in the rabbit. *Acta Physiol Scand* 1993,149:1-6.

Yang C., Kim H.S., Seo H., Kim K.S. Identification and characterization of potential cis-regulatory elements governing transcriptional activation of the rat tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem* 1998,71:1358-1368.

Yang H., Lu D., Yu K., Raizada M.K. Regulation of neuromodulatory actions of angiotensin II in the brain neurons by the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 1996,16:4047-4058.

Yang H., Shaw G., Raizada M.K. ANG II stimulation of neuritogenesis involves protein kinase B in brain neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002,283:R107-114.

Yang H., Wang X., Raizada M.K. Characterization of signal transduction pathway in neurotropic action of angiotensin II in brain neurons. *Endocrinology* 2001,142:3502-3511.

Yang S.N., Lippoldt A., Jansson A., Phillips M.I., Ganten D., Fuxe K. Localization of angiotensin II AT1 receptor-like immunoreactivity in catecholaminergic neurons of the rat medulla oblongata. *Neuroscience* 1997,81:503-515.

Yu K., Lu D., Rowland N.E., Raizada M.K. Angiotensin II regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the neuronal cultures of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 1996,137:3566-3576.

-Z-

Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci* 2002,98:24-27.

Zardetto-Smith A.M., Gray T.S. A direct neural projection from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Neurosci Lett* 1987,80:163-166.

Zetterstrom R.H., Solomin L., Jansson L., Hoffer B.J., Olson L., Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 1997,276:248-250.

Zhang L.L., Ashwell K.W. Development of the cyto- and chemoarchitectural organization of the rat nucleus of the solitary tract. *Anat Embryol (Berl)* 2001,203:265-282.

Zhu M., Gelband C.H., Moore J.M., Posner P., Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid. *J Neurosci* 1998,18:679-686.

Zhu M., Gelband C.H., Posner P., Sumners C. Angiotensin II decreases neuronal delayed rectifier potassium current: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurophysiol* 1999,82:1560-1568.

Zhu M., Natarajan R., Nadler J.L., Moore J.M., Gelband C.H., Sumners C. Angiotensin II increases neuronal delayed rectifier K(+) current: role of 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *J Neurophysiol* 2000,84:2494-2501.

Zhu M., Sumners C., Gelband C.H., Posner P. Chronotropic effect of angiotensin II via type 2 receptors in rat brain neurons. *J Neurophysiol* 2001,85:2177-2183.

---

Zigmond R.E., Schwarzschild M.A., Rittenhouse A.R. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters by phosphorylation. *Ann Rev Neurosci* 1989,12:415-461.

Zimmermann H. Vesicle recycling and transmitter release. *Neuroscience* 1979,4:1773-1804.

