



HAL
open science

Etude des interfaces sang/cerveau dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal: rôle des tanycytes de l'éminence médiane.

Amandine Mullier

► To cite this version:

Amandine Mullier. Etude des interfaces sang/cerveau dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal: rôle des tanycytes de l'éminence médiane.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT: . tel-00515862

HAL Id: tel-00515862

<https://theses.hal.science/tel-00515862>

Submitted on 8 Sep 2010

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.

Université du Droit et de la Santé de Lille II
Ecole Doctorale de Biologie-Santé de Lille

THESE SCIENTIFIQUE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

AMANDINE MULLIER

**ETUDE DES INTERFACES SANG/CERVEAU DANS LA
REGION TUBERALE DE L'HYPOTHALAMUS MADIOBASAL :
ROLE DES TANYCYTES DE L'EMINENCE MEDIANE.**

Soutenue le Vendredi 18 Décembre 2009, devant le Jury composé de :

<u>Rapporteurs</u>	Philippe Ciofi	Chargé de Recherche INSERM, Bordeaux
	Jean-François Ghersi-Egea	Chargé de Recherche INSERM, Lyon
<u>Examineurs</u>	Patrice Mollard	Directeur de Recherche CNRS, Montpellier
	Martine Begeot	Directeur de Recherche INSERM, Lyon
	Vincent Prevot	Directeur de Recherche INSERM, Lille
<u>CoDirecteurs</u>	Bénédicte Dehouck	Maître de Conférence des Universités, Lille
	Sébastien G. Bouret	Chargé de Recherche INSERM, Lille

J'exprime tous mes remerciements à :

Messieurs les Docteurs Philippe Ciofi et Jean-François Gherzi-Egea qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse et ce malgré les délais très courts qui leurs ont été imposés.

Madame le Docteur Martine Begeot et Monsieur le Docteur Patrice Mollard pour leur présence en tant qu'examineurs.

Monsieur le Docteur Vincent Prevot pour être le premier à m'avoir fait confiance et pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'ai toujours eu beaucoup d'admiration pour ta passion dévouée envers la Science. J'ai appris énormément de choses à tes côtés et je t'en suis sincèrement reconnaissante. Tu as toujours su me pousser pour tirer le meilleur de moi-même et c'est en partie grâce à toi que j'en suis arrivée au bout. Saches que j'ai beaucoup d'estime pour toi.

Monsieur le Docteur Sébastien Bouret pour sa gentillesse, ses conseils et ses encouragements. J'apprécie vraiment la confiance que tu m'as accordée au cours de ces trois années.

Madame le Docteur Bénédicte Dehouck pour m'avoir encadrée pendant ces quatre années. Merci d'avoir toujours été si patiente à mon égard et d'avoir supporté mon caractère parfois un peu envahissant. Merci pour ta disponibilité, ta rigueur scientifique et ta pédagogie. C'est toi qui as fait de cette thèse ce qu'elle est et c'est grâce à toi que j'en garderai un si bon souvenir. Tu as toujours été là pour me soutenir tant sur le plan scientifique que moral et je ne t'en serai jamais assez reconnaissante. Je suis vraiment consciente de la chance que j'ai et d'ailleurs tout le monde ne cesse de me le répéter. Le seul problème c'est qu'il n'y a pas assez de place dans ce manuscrit pour t'exprimer toute ma gratitude alors je te dis juste sincèrement « Merci pour tout ». Enfin, ça sera un réel plaisir de continuer à travailler avec toi afin de publier tous nos travaux en cours.

Je voudrais aussi remercier Madame le Docteur Stephania Maccari qui m'a accueillie très chaleureusement au sein de son équipe et grâce à qui j'ai pu obtenir un poste d'ATER.

Je tiens à remercier vivement :

Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain pour sa gentillesse et ses précieux conseils. Je ne vous remercierai jamais assez pour la confiance que vous m'avez témoignée ainsi que pour votre soutien lors de ces derniers mois de ma thèse.

Madame le Docteur Valérie Buée-Scherrer pour sa pédagogie et son encadrement qui m'ont été si précieux lors de mon année de master recherche.

Monsieur le Docteur Pierre Poulain pour ses précieux conseils techniques. C'est toujours un plaisir de discuter avec vous, de voir votre sourire et votre bonne humeur.

Je remercie sincèrement :

Madame le Docteur Odile Viltard pour sa bonne humeur et sa gentillesse. Merci pour ton implication dans la vie du laboratoire et pour veiller sur nous tous.

Mesdames Danièle Mazur, Anne Loyens et Joëlle Vermeeren pour leur présence au quotidien. Je vous remercie pour votre accueil au sein de l'équipe et pour m'avoir fait partager votre expérience si précieuse du laboratoire. Vous êtes « les pièces maîtresses » de l'équipe.

Mademoiselle le Docteur Emilie Caron pour son amitié que ce soit dans le labo ou en dehors. J'ai vraiment apprécié les soirées pizza au labo en ta compagnie. Merci aussi pour être toujours partante pour tout, que ce soit le roller ou le *Miami by night*. Vivement qu'on remette ça !!!

Madame le Docteur Cécile Allet pour son écoute et sa gentillesse. J'ai toujours admiré ton sens de l'organisation et ton efficacité.

Mademoiselle le Docteur Céline Campagne pour les parties de rigolade dans le labo et en dehors. Ton petit grain de folie m'a beaucoup manqué cette année.

Messieurs les Docteurs Jérôme Clasadonte et Marc Baroncini pour leur gentillesse. Merci aussi pour les bons petits moments partagés aux US.

Mademoiselle le Docteur Ariane Sharif pour les petits papotages et les rigolades. Merci également pour tes conseils scientifiques qui sont toujours très pertinents.

Mademoiselle le Docteur Christelle Sachot pour sa gentillesse et son écoute. Je suis vraiment contente d'avoir fait ta connaissance et j'espère qu'on saura rester en contact.

Mademoiselle Sophie Stéculorum pour son optimisme et sa bonne humeur. Merci pour être si prévoyante et pour avoir été à mon écoute quand j'en avais besoin. Je serai au rendez-vous le jour de ta thèse.

Naresh et JP pour leur bonne humeur et la petite note d'exotisme qu'ils ont amené au labo ces dernières années.

Fanny, Nicole et Eglantine pour leur gentillesse. Je vous souhaite beaucoup de plaisir et de belles découvertes scientifiques au sein de l'équipe.

Toute l'équipe « animalerie » pour leur travail impeccable au quotidien mais aussi pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Merci Julien, François, Ingrid et Delphine pour votre disponibilité et votre patience à mon égard. Merci aussi au boss Delphine pour son soutien ces derniers mois. Je suis sûre que tu feras un excellent chef. Et bien sûr je n'oublie pas Anna que je remercie pour sa bonne humeur et les longues heures de promenade avec les toutous le dimanche.

Madame Marie-Claire Peers pour m'avoir si bien formée à l'enseignement. J'ai toujours admiré la passion que vous mettiez dans votre travail.

Je remercie tous les étudiants et membres du centre de recherche Jean-Pierre Aubert pour leur accueil. Merci au groupe animation et à monsieur Journal Club qui ont fortement contribué à ma formation au quotidien.

Merci également à Sophie et Marie-Jeanne pour leur sourire et leur gentillesse.

Enfin je dédie ce travail :

A mes parents pour avoir toujours cru en moi. Merci de m'avoir toujours épaulée quelques soient mes choix. Aujourd'hui vous pouvez vraiment être fiers car c'est grâce à vous que j'en suis arrivée là.

A ma petite sœur adorée qui est toujours là pour m'écouter et me faire rire. Merci aussi de t'être occupée de tout ces dernières semaines → ça mérite bien un petit cadeau 😊

A mon parrain et à ma marraine pour avoir toujours été là dans les moments importants de ma vie. Merci marraine pour les petits restos et désolée parrain pour le loupé du vendredi 13 (je te dois un resto à ce propos d'ailleurs).

A toute ma famille qui est toujours là pour me soutenir. Merci pour votre présence quelle soit morale ou physique. Une énorme pensée pour les Strasbourgeois, les Bretons et les Carmausins qui auraient aimé être là le jour J.

A mes amis pour tous les bons moments passés ensembles et pour leur soutien. Une pensée notamment pour les anciens du lycée Ann'so, Maxime F, Maxime D et de la prépa Manu, Marion et Marie.

Et le meilleur pour la fin, merci à mon JiJi pour m'avoir supportée pendant quatre ans et surtout ces dernières semaines où j'ai été invivable. Merci de m'avoir soutenue dans les bons comme dans les mauvais moments et aussi de me faire confiance pour notre avenir.

Etude des interfaces sang/cerveau dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal : rôle des tanocytes de l'éminence médiane.

L'hypothalamus joue un rôle critique dans la régulation des systèmes physiologiques et de l'homéostasie. Il relaie au niveau central les signaux ou hormones sécrétée en périphérie. L'intégration de ces signaux s'effectue au niveau des interfaces sang/cerveau. Trois grandes interfaces sang/cerveau sont décrites au niveau central : la barrière hémato-encéphalique, les plexus choroïdes et les organes circumventriculaires. Alors que les deux premières sont bien caractérisées, les organes circumventriculaires sont mal connus. La région tubérale de l'hypothalamus médiobasal est une région cérébrale organisée autour du troisième ventricule. Elle a la particularité de contenir à la fois des noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de grandes fonctions neuroendocrines et l'éminence médiane. L'éminence médiane est un organe circumventriculaire caractérisé par la présence de capillaires fenêtrés permettant la diffusion des molécules circulantes dans le parenchyme cérébral. Cependant, l'éminence médiane est également constituée de cellules épendymogliales particulières appelées tanocytes et dont les fonctions sont encore mal connues. Une des hypothèses est que les tanocytes formeraient une interface sang/cerveau impliquée dans la régulation des échanges entre le sang porte et le liquide céphalorachidien.

En accord avec cette hypothèse, des expériences d'immunohistochimie entreprises chez la souris adulte nous ont indiqué que les tanocytes expriment des protéines de jonctions serrées et que cette expression est différente selon leur localisation. En effet, les tanocytes ventraux de l'éminence médiane expriment l'occludine, *zonula-occludens-1*, la claudine 5 et la claudine 1. De façon intéressante, ces protéines sont organisées en forme de nids d'abeilles autour des corps cellulaires des tanocytes. A l'inverse, les tanocytes dorsaux localisés sur les parois latérales du ventricule expriment l'occludine, *zonula occludens-1* et la claudine 5 mais ces protéines ne sont pas organisées en nids d'abeille. Parallèlement, des injections de bleu d'Evans ont permis de montrer que seuls les tanocytes ventraux possèdent des jonctions serrées étanches qui restreignent les échanges entre le compartiment sanguin et le liquide céphalorachidien. En revanche, les tanocytes dorsaux sont perméables à la diffusion du bleu d'Evans indiquant ainsi que les échanges entre le liquide céphalorachidien et le noyau arqué hypothalamique ne sont pas restreints. Cette expression différentielle des protéines de jonctions serrées au niveau de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal est retrouvée

également chez le rat adulte. De façon intéressante, des études plus poussées montrent que quelque soit le niveau antéropostérieur étudié, la présence de capillaires fenêtrés est toujours corrélée à la présence de tanocytes exprimant des protéines de jonctions serrées sous forme de nids d'abeilles et qui restreignent la communication entre le sang et le liquide céphalorachidien dans l'hypothalamus médiobasal. Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une intercommunication entre tanocytes et cellules endothéliales impliquée dans la mise en place du phénotype de barrière des tanocytes ventraux. Enfin des résultats préliminaires indiquent que les tanocytes expriment également des protéines de jonctions serrées chez l'Homme adulte.

Notre travail montre que chez l'adulte, les tanocytes de l'éminence médiane constituent une interface sang/cerveau impliquée dans la régulation des échanges entre le sang porte et le liquide céphalorachidien. En parallèle, ces résultats apportent de nouvelles informations dans la compréhension des mécanismes régulant l'accès des hormones périphériques au noyau arqué hypothalamique et indiquent que l'éminence médiane pourrait être une voie de passage privilégiée vers ce noyau.

Le travail que j'ai réalisé ces trois dernières années au cours de ma thèse a donné lieu aux communications scientifiques suivantes :

ARTICLES SCIENTIFIQUES

1. **Mullier A.**, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. 2010. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, *in press*.

Une étude en collaboration avec le Dr Ralf Jockers de l'Institut Cochin (Paris) a donné lieu à un article présenté en fin de manuscrit :

2. Anissa Sidibe*, **Amandine Mullier***, Patty Chen, Jean A. Boutin, Philippe Delagrangé, Vincent Prevot and Ralf Jockers. 2010. Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanycytes and median eminence. ***equal contribution of these two authors**. *Journal of Pineal Research*, *in press*.

COMMUNICATIONS DANS LE CADRE DE CONGRES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

Communications orales

1. **A Mullier**, SG Bouret, V Prevot & B Dehouck : Differential distribution of tight junction proteins in ependymogial cells of the third ventricle in mice. Colloque annuel de la Société d'étude des interfaces sang-cerveau, Strasbourg (Avril 2009).
2. **A Mullier**, SG Bouret, V Prevot, B Dehouck : Characterization of the blood-brain-barrier at the median eminence of the hypothalamus: a role for tanycytes in regulating access of peripheral hormones to the arcuate nucleus? 16^{ème} colloque annuel de la Society for the Study of Ingestive Behavior, Paris (Juillet 2008).
3. **Mullier A**, Buée-Scherrer V, Baroncini M, Loyens A, Beauvillain JC, Prevot V, and Dehouck B : Expression of tight junction proteins in rodent and human hypothalamic tanycytes. 10^{ème} colloque du Réseau LARC, Rennes (Octobre 2007).

Communications affichées

1. **A Mullier**, B Dehouck, SG Bouret, V Prevot : Differential spatial expression of tight junction proteins in the median eminence of the hypothalamus: a role for tanycytes in

- regulating access of peripheral hormones to the arcuate nucleus? 38^{ème} colloque annuel de la Society for Neuroscience, Washington DC (Novembre 2008).
2. **A Mullier**, SG Bouret, V Prevot, B Dehouck : Characterization of the tanycytic barrier of the median eminence of the hypothalamus. 8^{ème} colloque André VERBERT, Lille (Septembre 2008).
 3. **A Mullier**, SG Bouret, V Prevot, B Dehouck : Caractérisation de la barrière tanycytaire de l'éminence médiane de l'hypothalamus: tanocytes et échanges sang / cerveau. XXXV^{ème} colloque de la Société de Neuroendocrinologie, Strasbourg (Septembre 2008).
 4. **Mullier A**, Buée-Scherrer V, Baroncini M, Loyens A, Beauvillain JC, Prévot V, and Dehouck B : Expression of tight junction proteins in rodent and human hypothalamic tanocytes. XXXIV^{ème} colloque de la Société of Neuroendocrinologie, Tours (Septembre 2007).
 5. **Mullier A**, Buée-Scherrer V, Baroncini M, Loyens A, Beauvillain JC, Prévot V, and Dehouck B : Localization and molecular characterization of tight junctions in tanocytes of the median eminence of the hypothalamus in mice, rats and humans. 8^{ème} colloque de la Société Française des Neurosciences, Montpellier (Mai 2007).
 6. **Mullier A**, Buée-Scherrer V, Baroncini M, Beauvillain JC, Prévot V, and Dehouck B : Caractérisation moléculaire des jonctions serrées au niveau des tanocytes de l'éminence médiane de l'hypothalamus. 10^{ème} colloque du the Réseau LARC, Lille (Novembre 2006).

INVITATIONS POUR SÉMINAIRE

A. Mullier, SG Bouret, V Prevot and B Dehouck : Differential distribution of tight junction proteins in ependymogial cells of the third ventricle in rodents and humans. Aberdeen, Royaume-Uni (Avril 2009).

LISTE DES ABREVIATIONS.....	- 15 -
LISTE DES FIGURES.....	- 19 -
AVANT-PROPOS.....	- 21 -
INTRODUCTION.....	- 23 -

CHAPITRE 1. LES INTERFACES SANG / CERVEAU - 23 -

<i>I. Présentation et anatomie.....</i>	<i>- 23 -</i>
1. La barrière hémato-encéphalique : une unité glio-vasculaire.....	- 23 -
i) Les cellules endothéliales.....	- 23 -
ii) Les péricytes.....	- 24 -
iii) Les astrocytes.....	- 24 -
2. Les plexus choroïdes.....	- 25 -
i) L'épithélium épendymaire.....	- 25 -
ii) Le noyau fibro-vasculaire.....	- 26 -
3. Les organes circumventriculaires.....	- 26 -
i) Les cellules épendymaires ou tanocytes.....	- 27 -
ii) Le parenchyme subépendymal.....	- 27 -
iii) Le réseau vasculaire.....	- 27 -
<i>II. Les jonctions serrées.....</i>	<i>- 31 -</i>
1. Morphologie.....	- 31 -
2. Composition moléculaire.....	- 31 -
i) Les protéines trans-membranaires.....	- 32 -
L'occludine.....	- 32 -
La famille des claudines.....	- 33 -
Les molécules d'adhésion.....	- 34 -
ii) Les protéines adaptatrices.....	- 37 -
Les Zonula-Occludens (ZO).....	- 37 -
La cinguline.....	- 38 -
La protéine 7H6.....	- 38 -
Autres protéines.....	- 38 -
3. Fonctions des jonctions serrées.....	- 39 -
i) Régulation de la perméabilité paracellulaire.....	- 39 -
ii) Polarisation cellulaire.....	- 40 -
Le complexe PAR3-PAR6-aPKC.....	- 40 -
Le complexe CRB3-Pals1-PATJ.....	- 40 -
iii) Prolifération cellulaire.....	- 41 -

Exemple de régulation des voies de signalisation	- 41 -
Exemple de régulation des facteurs de transcription	- 41 -
III. Interfaces sang/cerveau et maintien de l'homéostasie.....	- 42 -
1. Apport des nutriments.....	- 42 -
2. Accès au cerveau des macromolécules	- 43 -
3. Neuroprotection	- 44 -
4. La fonction immune.....	- 45 -
5. Fonctions propres aux OCVs	- 46 -
i) OCVs sensoriels	- 46 -
ii) OCVs sécréteurs.....	- 48 -
CHAPITRE 2. LA REGION TUBERALE DE L'HYPOTHALAMUS MEDIOBASAL- 49 -	
I. Anatomie fonctionnelle.....	- 49 -
1. Définition et limites anatomiques	- 49 -
2. Principaux noyaux hypothalamiques	- 49 -
i) Le noyau arqué hypothalamique.....	- 49 -
ii) Le noyau ventromédian hypothalamique.....	- 52 -
iii) Le noyau dorsomédian hypothalamique.....	- 52 -
3. L'éminence médiane de l'hypothalamus.....	- 53 -
II. Communication sang/cerveau dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.....	- 54 -
1. Communication sang → cerveau	- 54 -
Transport de la leptine vers le SNC.....	- 58 -
Transport de la leptine par la BHE et les plexus choroïdes	- 58 -
Transport de la leptine dans la région tubérale de l'hypothalamus	- 58 -
2. Communication cerveau → sang : neurosécrétion.....	- 59 -
CHAPITRE 3. LES TANYCYTES DE L'EMINENCE MEDIANE - 61 -	
I. Définition et sous populations.....	- 61 -
1. Localisation.....	- 61 -
2. Origine	- 63 -
3. Les tancytes : une population hétérogène	- 63 -
i) Les tancytes alpha.....	- 64 -
ii) Les tancytes bêta	- 64 -
II. Rôle des tancytes dans le maintien de l'homéostasie.....	- 66 -
1. Homéostasie énergétique	- 66 -

i) Tanycytes et métabolisme glucidique.....	- 66 -
ii) Autres données	- 66 -
2. Fonction de reproduction	- 67 -
i) Tanycytes et gonadolibérine (GnRH).....	- 67 -
ii) Autres données	- 68 -
3. Rythmes saisonniers.....	- 69 -
<i>III. Les tanycytes en tant qu'interface sang / cerveau.....</i>	<i>- 69 -</i>
1. Rôle dans le transport.....	- 69 -
i) Evidences en faveur de l'existence de phénomènes d'endocytose et de transcytose au sein des tanycytes	- 70 -
ii) Exemples de molécules endocytées par les tanycytes	- 70 -
2. Propriétés de barrière des tanycytes.....	- 71 -
i) Barrière de diffusion.....	- 71 -
ii) Les jonctions serrées	- 72 -
OBJECTIFS.....	- 73 -
RESULTATS.....	- 75 -
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	- 99 -
DISCUSSION.....	- 115 -
CONCLUSION ET PERPECTIVES.....	- 123 -
COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES.....	- 125 -
BIBLIOGRAPHIE.....	- 135 -

AA	Acide aminé
ABC	Cassette liant l'ATP
ACTH	Hormone corticotrope
AgRP	Peptide associé au gène agouti
AHL	Aire hypothalamique latérale
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang	Angiotensine
AP	Area postrema
aPKC	Protéine kinase C atypique
ARH	Noyau arqué hypothalamique
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Vasopressine
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAR	Récepteur des coxsackie et adénovirus
CART	Transcrit associé à la cocaïne et à l'amphétamine
CLMP	Protéine membranaire CAR-like
CRB	Protéine Crumb
CREB	Facteur de régulation de l'AMPc
CRH	Corticolibérine
CSF	Facteur de stimulation de colonies
DARPP	Phosphoprotéine régulée par la dopamine et l'AMPc
DMH	Noyau dorsomédian hypothalamique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
EM	Eminence médiane
ER	Récepteur aux estrogènes
ESAM	Molécule d'adhésion spécifique des cellules endothéliales
FSH	Hormone de stimulation des follicules
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GFAP	Acide protéique fibrillaire glial
GH	Hormone de croissance
GHRH	Somatolibérine
GHSR	Récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance
GLAST	Transporteur du glutamate-aspartate
GLT	Transporteur du glutamate
GLUT	Transporteur du glucose
GnRH	Gonadolibérine
GPR	Récepteur couplé aux protéines G
HRP	Péroxydase de Raifort
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire
IGF	Facteur de croissance insuline-like

IGFBP	Protéine de liaison de l'IGF
IL	Interleukine
JACOP	Protéine enroulée associée aux jonctions serrées
JAM	Molécule d'adhésion
LCR	Liquide céphalorachidien
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LH	Hormone lutéinisante
LPS	Lipopolysaccharide
MAGuK	Protéine guanylate kinase-like associée à la membrane
MAO	Oxydase de monoamine
MC	Mélanocortine
MCT	Transporteur monocarboxylate
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (lignée de cellules de rein)
MRP	Protéine associée à la résistance aux drogues multiples
MSH	Hormone de stimulation des mélanocytes
MUPP	Protéine aux multiples domaines PDZ
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
NPY	Neuropeptide Y
NTS	Noyau du tractus solitaire
OCV	Organe circumventriculaire
ObRa	Forme courte du récepteur de la leptine
ObRb	Forme longue du récepteur de la leptine
OVLTL	Organe vasculaire de la lame terminale
OXY	Ocytocine
Pals1	Protéine associée à Lin seven 1
PATJ	Protéine de jonction serrée associée à Pals1
PAR	Partitioning defective protein
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
P-gp	P-glycoprotéine
POMC	Proopiomélanocortine
PRL	Prolactine
PV-1	Protéine associée aux vésicules de plasmalemme-1
PVH	Noyau paraventriculaire hypothalamique
VE-cadhérine	Cadhérine endothéliale vasculaire
VMH	Noyau ventromédian hypothalamique
SCO	Organe subcommissural
SFO	Organe subformical
SNC	Système nerveux central
T2	3,5-diiodo-L-thyronine

T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TEER	Résistance électrique trans-épithéliale
TGF	Facteur de croissance transformant
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRH	Thyréolibérine
TSH	Thyréostimuline
TSHR	Récepteur de la thyroestimuline
VCAM	Molécule d'adhésion cellulaire des vaisseaux
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
ZO	Zonula Occludens
ZONAB	Protéine de liaison de l'acide nucléique associée à ZO-1

Figure 1 : Les interfaces sang/cerveau.....- 29 -

Figure 2 : Les jonctions serrées, de la morphologie à la biologie moléculaire.....- 36 -

Figure 3 : La région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.....- 50 -

Figure 4 : Schéma simplifié de l'organisation des tanocytes dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.....- 62 -

Tableau 1 : Hormones périphériques ayant une action dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.....- 57 -

Tableau 2 : Exemples de molécules exprimées par les tanocytes.....- 65 -

L'homéostasie du liquide interstitiel qui baigne les neurones est un élément crucial au bon fonctionnement du système nerveux central (SNC). Afin d'éviter que des modifications brutales de sa composition ne viennent perturber l'activité nerveuse, l'évolution a doté les organismes complexes d'un système de barrières d'une part entre le sang et le parenchyme cérébral, on parle alors de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ; d'autre part entre le sang et le liquide céphalorachidien (LCR), on parle alors des plexus choroïdes. Ces barrières sont caractérisées notamment par la présence de jonctions serrées qui vont induire la mise en place d'un système complexe de régulation des échanges entre le SNC et le compartiment sanguin. Cependant, il existe au sein du SNC de discrètes régions neurohémales situées en bordure des ventricules appelées organes circumventriculaires (OCVs) et qui possèdent des vaisseaux fenêtrés où la régulation des échanges entre le sang et le SNC reste à étudier. L'éminence médiane de l'hypothalamus est un OCV localisé à la base du troisième ventricule. Elle contient un riche réseau vasculaire aux capillaires fenêtrés permettant l'accès des molécules circulantes au parenchyme cérébral. L'éminence médiane contient également des cellules épendymogliales particulières appelées tanycytes dont le corps cellulaire borde le ventricule et qui émettent un prolongement unique au contact des capillaires fenêtrés. Des études suggèrent que la fonction de ces cellules est de créer une barrière limitant l'accès au cerveau des molécules circulantes.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'éminence médiane de l'hypothalamus en tant qu'interface entre le sang, le liquide céphalorachidien et l'hypothalamus. Nous avons cherché à caractériser les barrières impliquées dans la régulation des échanges au niveau des tanycytes de l'éminence médiane chez la souris. Puis nous avons voulu déterminer si les bases anatomiques de ces barrières étaient conservées notamment dans une autre espèce très étudiée comme le rat mais surtout chez l'homme.

Avant de présenter l'ensemble de ce travail, nous rappellerons dans un premier temps les bases anatomiques ainsi que le rôle majeur des interfaces sang/cerveau dans le maintien de l'homéostasie. Dans le second chapitre, nous ferons un état des connaissances sur les interfaces sang/cerveau de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal. Enfin, nous nous pencherons sur le cas particulier des tanycytes de l'éminence médiane en tant que cellules liant le liquide céphalorachidien aux événements neuroendocrines propres à l'hypothalamus.

Chapitre 1. LES INTERFACES SANG / CERVEAU

Le concept de barrière entre le sang et le cerveau est né au XIX^e siècle à partir des travaux du scientifique allemand Paul Ehrlich. Il montre dans un premier temps qu'après injection intraveineuse d'un colorant vital se fixant aux protéines plasmatiques, le bleu trypan, tous les organes de la souris sont bleus à l'exception du cerveau (Erlich, 1885). Quelques années plus tard, son étudiant Ernst Goldmann réalise l'expérience inverse et observe que ce même colorant injecté dans le liquide cébrospinal (LCR) colore le tissu cérébral (Goldmann, 1909). Ces expériences ont conduit à la conclusion qu'il existe une barrière entre le sang et le cerveau. Depuis, trois interfaces entre le sang et le cerveau ont été décrites : la barrière hémato-encéphalique (BHE), les plexus choroïdes et les organes circumventriculaires (OCVs). Ces interfaces sont impliquées dans la régulation des échanges entre le sang et le SNC.

I. Présentation et anatomie

1. La barrière hémato-encéphalique : une unité glio-vasculaire

La BHE est classiquement décrite comme étant localisée au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux. Cependant, depuis quelques années, on voit émerger un concept selon lequel les facteurs péri-endothéliaux sont d'une grande importance pour l'établissement des propriétés de cette barrière. C'est ce qui a conduit les auteurs à reconsidérer leur définition. La BHE est maintenant décrite en tant que véritable unité glio-vasculaire. Cette unité glio-vasculaire se compose des cellules endothéliales reposant sur une lame basale, des péricytes et des astrocytes (Figure 1A).

i) Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont définies comme étant le siège de la BHE. Elles présentent des caractéristiques structurales et métaboliques différentes des cellules endothéliales de la circulation périphérique. Chez les mammifères, les cellules endothéliales des capillaires cérébraux matures sont caractérisées principalement par une faible hauteur, des jonction serrées, peu de vésicules de pinocytose, un petit nombre de cavéoles à la surface luminale et de nombreuses mitochondries qui sont le reflet d'un métabolisme énergétique intense (Coomber and Stewart, 1985). Il faut également noter que leur membrane plasmique

ne présente pas de fenestrations (Hallmann *et al.*, 1995) et qu'elles sont sélectivement perméables aux molécules de petite taille et de grande lipophilicité (Chaudhuri, 2000).

Les cellules endothéliales reposent sur une lame basale produite par les cellules endothéliales elles-mêmes et les péricytes (Mandarino *et al.*, 1993). Elle est composée essentiellement de collagène de type IV, de laminine et de fibronectine. Des expériences réalisées *in vitro*, montrent que les composants de la lame basale exercent une influence sur la différenciation des cellules endothéliales en induisant notamment la formation des jonctions serrées (Tilling *et al.*, 1998).

ii) Les péricytes

Les péricytes sont complètement entourés par la lame basale. Malgré des années de recherche depuis leur découverte en 1873 (Rouget, 1873), le rôle de ce type cellulaire reste assez inconnu. Les péricytes semblent jouer un rôle majeur au sein des capillaires cérébraux. En effet, des études *in vitro* montrent que l'addition de péricytes à une culture de cellules endothéliales induit des propriétés de barrière telles que la diminution de la perméabilité à l'albumine et l'augmentation de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) (Dente *et al.*, 2001). En plus de ce rôle dans la régulation des propriétés de la BHE, les péricytes semblent également être impliqués dans les phénomènes d'angiogénèse, de néovascularisation observés suite à un traumatisme cérébral ou à une hypoxie (Dore-Duffy *et al.*, 2000; Gonul *et al.*, 2002) et dans la vasoconstriction (Peppiatt *et al.*, 2006). En effet, il existe une intercommunication entre ces deux types cellulaires par l'intermédiaire de facteurs solubles tels que l'angiopoïétine-1 (Ang-1) (Uemura *et al.*, 2002), le facteur de croissance transformant β (TGF- β) (Antonelli-Orlidge *et al.*, 1989; Sato and Rifkin, 1989) synthétisés par les péricytes ou encore le facteur de croissance dérivé des plaquettes β (PDGF- β) (Hellstrom *et al.*, 1999) sécrété par les cellules endothéliales.

iii) Les astrocytes

Les pieds astrocytaires recouvrent la quasi-totalité de la surface capillaire incluant non seulement les cellules endothéliales mais également les péricytes (Kacem *et al.*, 1998). La proximité de ces pieds astrocytaires avec les cellules endothéliales suggère l'existence d'une communication spécifique entre ces deux types cellulaires. En effet, les premières évidences de l'influence des astrocytes dans la différenciation des cellules endothéliales ainsi que dans la modulation des propriétés de perméabilité sélective de la BHE, viennent d'expériences *in vitro*. Les auteurs ont montré que les propriétés de barrière de cellules endothéliales isolées en culture (notamment la présence de jonctions serrées étanches et l'expression de la

transpeptidase γ -glutamyl impliquée dans le transport des acides aminés neutres) peuvent être améliorées par l'addition d'astrocytes sous forme de co-cultures (Dehouck *et al.*, 1990; el Hafny *et al.*, 1996). De la même façon le niveau d'expression de certains transporteurs est plus proche des conditions *in vivo* dans des lignées de cellules endothéliales exposées à l'influence gliale. C'est le cas du transporteur du glucose-1 (GLUT-1) et de la P-glycoprotéine (El Hafny *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1997). L'expression du récepteur de la transferrine et les mécanismes de transcytose des lipoprotéines de haute densité sont également augmentés par l'influence astrocytaire (Dehouck *et al.*, 1994; Dehouck *et al.*, 1997). La plupart de ces effets peuvent être mimés par l'ajout de milieu conditionné astrocytaire, suggérant l'implication de facteurs solubles (Sobue *et al.*, 1999). Plusieurs candidats ont été identifiés, notamment le TGF- β (Tran *et al.*, 1999), le facteur neurotrophique dérivé de lignée gliale (GDNF) (Igarashi *et al.*, 1999) et le facteur de croissance fibroblastique b (bFGF) (Sobue *et al.*, 1999).

2. Les plexus choroïdes

Les plexus choroïdes sont de petites structures papillaires qui font protrusion dans la cavité ventriculaire. Ils sont responsables de la formation du LCR. On trouve quatre plexus choroïdes dans le cerveau : deux dans les ventricules latéraux, un dans le troisième et un dans le quatrième ventricule. Tous ces plexus partagent une structure similaire qui consiste en une couche externe d'épithélium cubique simple reposant sur une lame basale et entourant un lit vasculaire enchâssé dans un stroma conjonctif lâche (Figure 1A).

i) L'épithélium épendymaire

L'épithélium épendymaire des plexus choroïdes est une couche unicellulaire de cellules cubiques située en continuité avec les cellules épendymaires bordant les cavités ventriculaires. Cependant, les cellules épithéliales se différencient des cellules épendymaires notamment par la présence d'une ceinture continue de jonctions serrées à leur pôle apical. La face apicale des cellules épithéliales est couverte de microvillosités. Les faces latérales de deux cellules adjacentes sont imbriquées par de nombreuses interdigitations complexes surtout présentes dans la partie basale de la cellule (Keep and Jones, 1990). Toutes ces structures qui augmentent considérablement la surface d'échanges ainsi que la présence de nombreuses mitochondries, et vésicules sont des caractéristiques typiques des épithéliums ayant des propriétés de sécrétion et/ou d'absorption (Cornford *et al.*, 1997).

ii) Le noyau fibro-vasculaire

Le noyau fibro-vasculaire est séparé de l'épithélium par une lame basale continue. Il est en continuité avec les membranes leptoméningées externes. Il contient de nombreux vaisseaux sanguins enchâssés dans un réseau lâche de fibres de collagène, qui sont produites par les fibroblastes présents dans ce tissu conjonctif (Strazielle and Ghersi-Egea, 2000). A l'inverse des capillaires de la BHE, les capillaires des plexus choroïdes sont très larges et possèdent un endothélium fenêtré. Les fenestrations sont des microdomaines de la membrane plasmique impliquées dans la perméabilité vasculaire. Elles apparaissent localisées sous forme de clusters aux endroits où l'endothélium est fortement atténué et où les membranes lumineales et ablumineales fusionnent (Palade *et al.*, 1979). Des expériences utilisant la HRP ont permis de montrer l'absence de barrière au niveau de cet endothélium entre le sang et le stroma (Brightman, 1968).

D'autres types cellulaires sont associés au stroma fibreux tels que des macrophages globulaires, ce qui laisse supposer un rôle dans la fonction immunitaire (Ling *et al.*, 1998).

3. Les organes circumventriculaires

Les organes circumventriculaires (OCVs) sont de petites régions spécifiques du cerveau localisées à proximité des troisième et quatrième ventricules (Figure 1B). On en dénombre six bien que les avis divergent sur ce point, et puisque certains auteurs y incluent notamment les plexus choroïdes. Les OCVs sont généralement divisés en deux groupes :

- les OCVs dits sensoriels comprenant l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT), l'organe subfornical (SFO) et l'area postrema (AP). Ils ont la particularité de posséder des corps cellulaires de neurones dans la zone subépendymale.
- les OCVs dits sécréteurs comprenant la glande pinéale et l'éminence médiane (EM). Ils ont la particularité de sécréter des substances dans la circulation sanguine.

Enfin il reste l'organe subcommissural (SCO) qui constitue un cas particulier dont les fonctions sont encore inconnues.

La glande pinéale et le SCO forment de petites glandes à part entière au sein du SNC (voir pour revues Moller and Baeres, 2002; Rodriguez *et al.*, 1998). Dans ce chapitre nous nous intéresserons uniquement à l'OVLT, SFO, AP et EM qui ont des structures très comparables. Ces OCVs sont généralement organisés en trois zones : une zone épendymaire, une zone subépendymale plus ou moins importante et une zone vasculaire.

i) Les cellules épendymaires ou tanocytes

Tous les OCVs sont situés à proximité d'un ventricule. Dans ces régions particulières, la paroi est généralement formée de cellules épendymogliales appelées tanocytes. Les tanocytes sont des cellules à l'apparence bipolaire, dont le corps cellulaire borde la paroi du ventricule et qui émettent un prolongement unique dans le parenchyme adjacent. Ce prolongement se termine parfois au contact de la lame basale périvasculaire d'un capillaire appartenant ou non à l'OCV (Krisch *et al.*, 1978). Des études de microscopie électronique décrivent la présence de jonctions serrées au niveau des corps cellulaires des tanocytes (Brightman and Reese, 1969). Certains auteurs ont également relevé la présence de jonctions serrées entre des prolongements adjacents de tanocytes situés en périphérie de l'OCV (Krisch *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 2008). La face apicale des tanocytes est généralement couverte de microvillosités qui augmentent la surface d'échange avec le LCR. De plus, la présence de nombreuses mitochondries, de vésicules, d'un réticulum endoplasmique développé ainsi que de nombreux microfilaments dans les prolongements suggèrent que les tanocytes seraient impliqués dans des phénomènes de sécrétion et/ou d'absorption (Dellmann and Simpson, 1975; Millhouse, 1975; Rodriguez *et al.*, 1979; Weindl and Schinko, 1975).

ii) Le parenchyme subépendymal

La zone située juste en dessous de la couche de cellules épendymogliales constitue le parenchyme subépendymal de l'OCV. En plus de contenir les prolongements des tanocytes précédemment décrits, elle contient de nombreuses cellules gliales telles que des astrocytes et des oligodendrocytes. Mais la principale caractéristique de cette zone est due à la forte présence d'éléments neuronaux. On retrouve notamment des corps cellulaires de neurones dans les OCVs sensoriels (OVLt, SFO et AP). Les auteurs ont également décrit la présence de nombreux dendrites juste en dessous de l'épendyme et plus rarement des invaginations dendritiques dans la couche de cellules épendymaires (Dellmann and Simpson, 1975). Dans tous les OCVs, la région subépendymale est également occupée par de nombreux axones. Cependant, la présence de synapses neuro-vasculaires n'a clairement été décrite que dans l'OVLt et l'EM (Rodriguez, 1972; Weindl and Schinko, 1975).

iii) Le réseau vasculaire

Tous les OCVs ont la particularité de posséder un réseau vasculaire très riche. Au niveau ultrastructural, l'endothélium de ces capillaires est fenêtré. Il exprime notamment des protéines associées aux pores fenêtrés telles que MECA-32 chez la souris (Schulz and Engelhardt, 2005) et la protéine associée aux vésicules de plasmalemme (PV)-1 chez le rat

(Ciofi *et al.*, 2009). Les capillaires possèdent de larges espaces péricapillaires appelés espaces de Virchow-Robin, remplis de fluide interstitiel. Le réseau vasculaire étant très sinueux, le volume vasculaire est très important mais le débit relativement faible. L'injection de traceurs dans la circulation sanguine montre que ces capillaires sont très perméables (Duvernoy and Risold, 2007; Gross, 1991; Shaver *et al.*, 1990).

Toutes ces interfaces sang/cerveau bien que très variées sur le plan morphologique possèdent cependant un point commun relativement important. Il s'agit de la présence de jonctions serrées soit au niveau de l'endothélium de la BHE, au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes ou au niveau des tanocytes des OCVs. Ces jonctions serrées vont jouer un rôle fondamental dans l'établissement du phénotype de barrière caractéristique des interfaces sang/cerveau. C'est pourquoi elles font l'objet de notre prochain paragraphe.

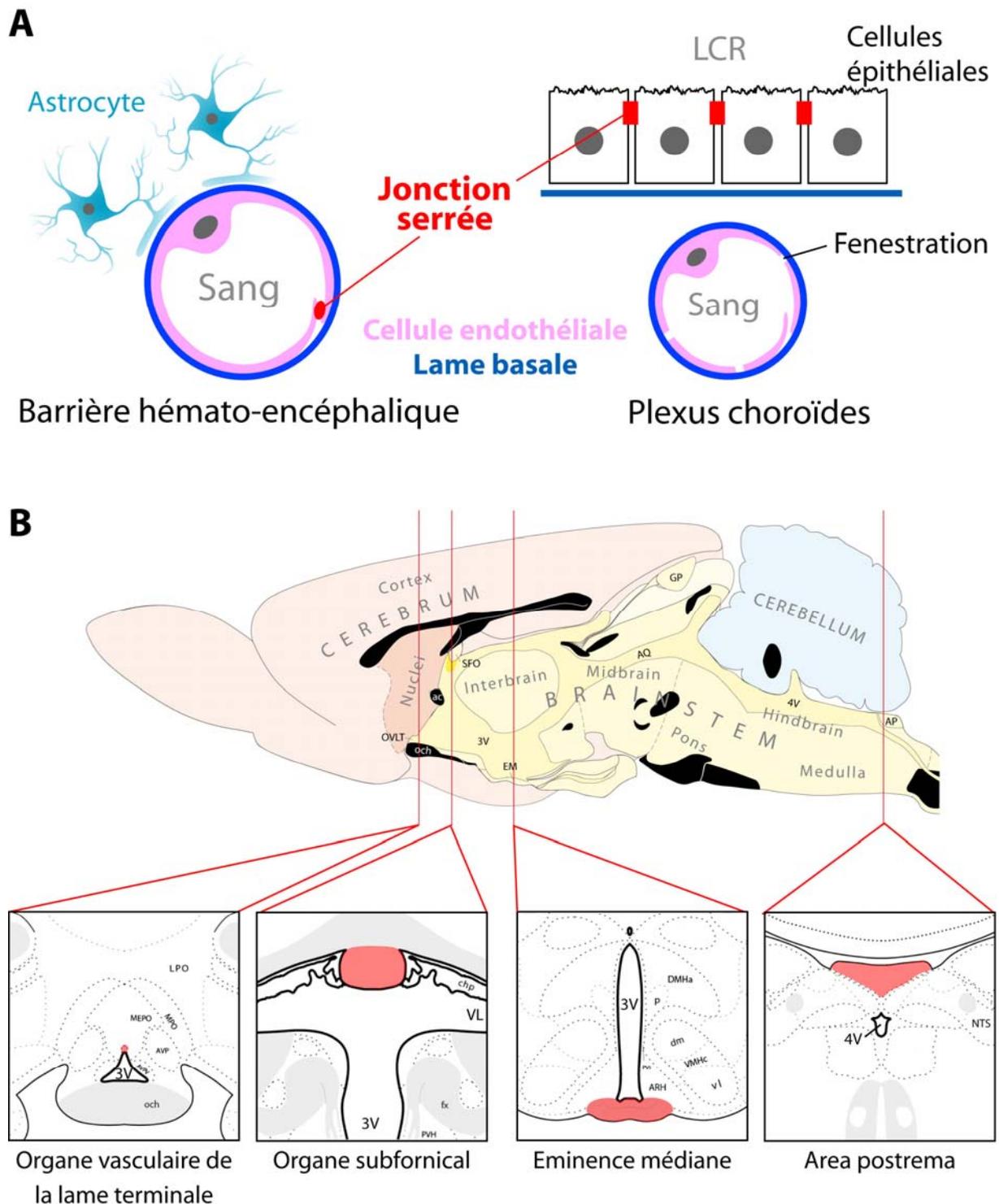


Figure 1 : Les interfaces sang/cerveau

A. Morphologie comparée de la BHE et des plexus choroïdes. La BHE est localisée au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Ces cellules endothéliales sont jointes par des jonctions serrées et constituent une interface sang/parenchyme cérébral. Au contraire, les capillaires des plexus choroïdes sont fenêtrés. Les jonctions serrées sont délocalisées au niveau des cellules épithéliales qui constituent une interface sang/LCR.

B. Localisation des OCVs sur une coupe sagittale de cerveau de rat et sur les coupes frontales correspondantes. 3V, troisième ventricule ; 4V, quatrième ventricule ; ac, commissure antérieure ; AQ, aqueduc de sylvius ; AP, area postrema ; ARH, noyau arqué

hypothalamique ; AVP, noyau préoptique antéroventral ; AVPV, noyau antéroventral périventriculaire ; chp, plexus choroïdes ; DMH, noyau dorsomédian hypothalamique ; EM, éminence médiane ; fx, fornix ; GP, glande pinéale ; LPO, aire préoptique latérale ; MEPO, noyau préoptique médian ; MPO, aire préoptique médiale ; NTS, noyau du lit de la strie terminale ; och, chiasma optique ; OVLT, organe vasculaire de la lame terminale ; PVH, noyau paraventriculaire hypothalamique ; Pvi, noyau périventriculaire ; VL, ventricule latéral ; VMH, noyau ventromédian hypothalamique ; SFO, organe subfornical.

II. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées ont d'abord été décrites par des approches morphologiques. Depuis les années 80, les techniques d'immunohistochimie ont permis d'élucider leur nature moléculaire. Les jonctions serrées ont d'abord été étudiées au niveau des cellules épithéliales *in vitro* car elles ont la particularité de développer les mêmes caractéristiques qu'*in vivo*. Ensuite les auteurs se sont intéressés aux jonctions serrées présentes au niveau de l'endothélium de la BHE.

1. Morphologie

Le paramètre le plus important reflétant l'imperméabilité d'un épithélium est l'existence de complexes jonctionnels entre les cellules épithéliales. Ces complexes jonctionnels sont composés de jonctions serrées ou *zonula occludens*, localisées à l'apex de la cellule près de la lumière, et de jonctions adhérentes ou *zonula adherens*, localisées juste en dessous des précédentes (Figure 2A). L'endothélium des capillaires cérébraux présente un réseau de jonctions serrées qui relie de façon continue chacune des cellules endothéliales à ces voisines. On parle alors d'endothélium continu (Brightman and Reese, 1969; Reese and Karnovsky, 1967). En section transversale, les jonctions serrées apparaissent comme un point de fusion entre les membranes de deux cellules adjacentes (Figure 2B). Chacun de ces points représente une section de la ceinture jonctionnelle entourant toute la cellule (Figure 2C). Ces ceintures continues de jonctions serrées forment un véritable obstacle physique à la diffusion passive des molécules entre les cellules endothéliales ou voie intercellulaire. La technique de cryofracture permet d'apprécier différents paramètres des jonctions serrées : la complexité des ceintures et l'association des particules avec le feuillet lipidique interne (face P) ou externe (face E) de la membrane plasmique (Figure 2D). En effet, des études montrent que la complexité du réseau de jonctions serrées est corrélée à la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) (Claude, 1978). De plus, l'association des particules de jonctions serrées avec la face P de la membrane plasmique est également un critère décisif quant à l'imperméabilité des jonctions serrées (Wolburg *et al.*, 1994).

2. Composition moléculaire

Les jonctions serrées sont composées de nombreuses protéines qui peuvent être séparées en différentes classes basées sur leurs structures et fonctions. Premièrement, il y a les protéines transmembranaires dont font partie l'occludine, la famille des claudines et des

membres de la superfamille des immunoglobulines telles que les molécules d'adhésion JAMs ou la molécule d'adhésion spécifique des cellules endothéliales ESAM. Dans un second temps, on trouve également des protéines intracellulaires que l'on peut distinguer en sous-groupes selon leur fonction : les adaptateurs de premier ordre et de second ordre. Les adaptateurs de premier ordre sont directement associés aux protéines transmembranaires via leur domaine PDZ. Cette classe comprend notamment les protéines de la famille des *zonula occludens* (ZO). Enfin les adaptateurs de second ordre ne sont pas directement liés aux protéines transmembranaires. C'est le cas par exemple de la cinguline et d'autres protéines (Figure 2E).

i) Les protéines trans-membranaires

L'OCCLUDINE

L'occludine est la première molécule transmembranaire découverte. Elle a été initialement isolée à partir d'une préparation d'hépatocytes de poulet (Furuse *et al.*, 1993). C'est une protéine de 65 kDa, possédant quatre domaines transmembranaires et deux boucles extra cellulaires, qui existe sous deux isoformes générés par épissage alternatif (Balda *et al.*, 2000). Bien que la protéine de poulet ne partage que 50% d'homologie avec la protéine de mammifère ; les protéines humaine, murine et canine possèdent en revanche environ 90% d'homologie. La région la plus conservée de la protéine est d'une part son domaine carboxy-terminal responsable de la liaison de l'occludine avec la protéine ZO-1 et d'autre part son domaine permettant la liaison avec le cytosquelette (Ando-Akatsuka *et al.*, 1996).

De façon surprenante, chez la souris invalidée pour le gène codant la protéine occludine, les jonctions serrées ne sont pas affectées morphologiquement et la TEER mesurée au niveau des cellules épithéliales intestinales ne diffère pas de la souris sauvage (Saitou *et al.*, 2000). Cependant cette souris invalidée pour le gène de l'occludine développe tout de même des phénotypes pathologiques (inflammation chronique, hyperplasie de l'épithélium gastrique, calcification cérébrale, affinement de l'ossature, retard de croissance post-natale, atrophie testiculaire et comportement sexuel anormal). Les auteurs en ont conclu que l'occludine aurait probablement un rôle dans la régulation des jonctions serrées via l'induction de signaux intracellulaires. De plus, l'occludine n'est pas nécessaire à la formation des jonctions serrées. Notamment elle n'est pas exprimée au niveau des jonctions serrées des cellules de Sertoli de certaines espèces (Moroi *et al.*, 1998). Dans un grand nombre de travaux, des modifications post traductionnelles de l'occludine, telles que la phosphorylation du domaine cytoplasmique et l'ubiquitination, ont été décrites comme permettant une régulation des jonctions serrées

(Traweger *et al.*, 2002). Par exemple, la phosphorylation de l'occludine permet sa stabilisation et son maintien au niveau de la membrane plasmique (Sakakibara *et al.*, 1997). En accord avec ces données, la déphosphorylation de l'occludine a été observée dans un modèle expérimental de sclérose multiple présentant un dysfonctionnement de la BHE (Morgan *et al.*, 2007). A l'inverse, il a été montré récemment qu'une phosphorylation des résidus de tyrosine est responsable d'une augmentation de la perméabilité vasculaire lors d'une ischémie cérébrale (Takenaga *et al.*, 2009). D'autres études montrent également qu'un traitement au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), connu pour augmenter la perméabilité vasculaire, est responsable de la phosphorylation de l'occludine au niveau de la sérine 490 (Antonetti *et al.*, 1999). Cette phosphorylation est quant à elle nécessaire à l'ubiquitination de la protéine qui à son tour régule l'internalisation de l'occludine (Murakami *et al.*, 2009). L'ensemble de ces travaux suggère que des changements hormonaux ou mécaniques sont capables d'induire une modification de l'état de phosphorylation de l'occludine, suivi d'une diminution du contenu en occludine au niveau des jonctions serrées, et conduisant ainsi à l'augmentation de la perméabilité paracellulaire. Finalement, il apparaît à la vue de toutes ces données, que dans les cellules matures l'occludine est nécessaire à la régulation des jonctions serrées plutôt qu'à leur établissement.

LA FAMILLE DES CLAUDINES

Les claudines forment une famille composée d'une vingtaine de protéines de 22 kDa (Krause *et al.*, 2008). Chacune possède quatre domaines transmembranaires mais ne présente aucune homologie de séquence avec l'occludine. Les domaines extracellulaires des claudines sont capables de former des homo ou hétéro dimères avec leurs homologues de la cellule adjacente. La liaison ainsi formée permet une adhésion entre les deux membranes plus forte que celle produite par l'occludine (Kubota *et al.*, 1999; Piontek *et al.*, 2008). Les claudines jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité paracellulaire. La perméabilité aux ions est déterminée par la combinaison spécifique de différentes claudines dans les tissus (Tsukita and Furuse, 2000). Contrairement à l'occludine, les claudines ont donc une distribution spécifique pour chaque tissu. Des études fonctionnelles mettent en évidence l'importance de la combinaison de claudines quant aux propriétés de barrière. En effet, en culture, des fibroblastes transfectés avec la claudine 1 ou la claudine 3 forment des jonctions serrées qui en cryofracture apparaissent associées avec la face P. Au contraire quand ces mêmes cellules sont transfectées avec la claudine 2 ou la claudine 5, elles forment des jonctions serrées associées à la face E.

Au niveau des capillaires cérébraux, on retrouve l'expression de la claudine 3 et de la claudine 5. De façon surprenante, des souris déficientes pour la claudine 5 ont des jonctions serrées ne présentant pas d'altération morphologique que ce soit au niveau macroscopique ou ultrastructural. Par contre, l'utilisation de différents traceurs a permis de mettre en évidence chez ces souris, une perméabilité accrue de la BHE pour les petites molécules inférieures à 800 Da comparativement aux souris sauvages (Nitta *et al.*, 2003). En parallèle d'autres expériences montrent que des cellules endothéliales de poumon de rat transfectées avec la claudine 5 deviennent imperméables à l'inuline (5 kDa) et au mannitol (182 kDa). Cependant dans ces mêmes cultures transfectées, la phosphorylation de la claudine 5 sur la thréonine 207 par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) est responsable d'une diminution de la TEER et d'une augmentation de la perméabilité au mannitol mais pas à l'inuline (Soma *et al.*, 2004). De plus, la transfection de la claudine 5 dans une lignée de cellules de rein (MDCK pour Madin-Darby Canine Kidney) augmente la TEER et diminue la perméabilité aux ions (Wen *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que d'autres molécules, telle que la claudine 3, et leur association avec la claudine 5 sont responsables de l'établissement d'une barrière de perméabilité pour les molécules de faible poids moléculaire. D'autres études attribuent également à la claudine 3 un rôle important dans la perméabilité des jonctions serrées, car la perte de cette protéine a été observée dans des pathologies telles que la maladie neurologique auto-immune expérimentale et le glioblastome multiforme (Wolburg *et al.*, 2003).

Au niveau des plexus choroïdes, on retrouve l'expression de la claudine 1, la claudine 2, et la claudine 11 (Lippoldt *et al.*, 2000; Wolburg *et al.*, 2001).

LES MOLECULES D'ADHESION

Des molécules d'adhésion telles que la famille des JAMs (Junction-adhesion molecules) et l'ESAM (Endothelial cell-selective adhesion molecule) sont également localisées au niveau des jonctions serrées.

Les JAMs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et comptent trois membres JAM-1, JAM-2 et JAM-3 aussi appelés JAM-A, JAM-B et JAM-C respectivement. Exprimées aussi bien en surface des endothéliums que des épithéliums et sur certaines cellules circulantes, ces molécules sont capables de former des dimères selon des interactions homo ou hétérophiliques de part et d'autre des membranes de deux cellules adjacentes. Ces protéines sont constituées d'un domaine extracellulaire à deux boucles de type immunoglobuline, d'une région transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique

possédant un domaine de liaison PDZ. JAM-1 (Martin-Padura *et al.*, 1998) est exprimée à la fois dans les cellules épithéliales et endothéliales alors que JAM-2 (Aurrand-Lions *et al.*, 2001a) et JAM-3 (Palmeri *et al.*, 2000) sont exprimées majoritairement dans les cellules endothéliales. Au niveau de la BHE, on retrouve les protéines JAM1 et JAM-3 (Aurrand-Lions *et al.*, 2001b). JAM-1 se lie à ZO-1 et à la cinguline *via* son motif PDZ (Bazzoni *et al.*, 2000), et lie également la protéine aux multiples domaines PDZ 1 (MUPP1) (Hamazaki *et al.*, 2002). JAM-1 est connue pour augmenter la résistance cellulaire dans des cellules ne formant pas de jonctions à l'état natif (Martin-Padura *et al.*, 1998). L'utilisation d'un anticorps neutralisant JAM-1 inhibe l'extravasation leucocytaire *in vitro* mais également *in vivo* (Del Maschio *et al.*, 1999). La transfection de JAM-1 réduit la perméabilité paracellulaire et aide à la localisation de l'occludine au niveau des jonctions intercellulaires (Dejana *et al.*, 2000). Ces données suggèrent l'implication des JAMs dans l'organisation de la jonction serrée et dans l'extravasation leucocytaire. JAM-3 quant à elle a été découverte lors de travaux portant sur la domiciliation lymphocytaire dans les organes lymphoïdes secondaires. JAM-3 est localisée au niveau des jonctions intercellulaires et peut inhiber la transmigration des monocytes (Palmeri *et al.*, 2000).

Plus récemment, quatre membres supplémentaires de la superfamille des immunoglobulines ont été identifiés au niveau des jonctions serrées. Il s'agit du récepteur des coxsackie et adénovirus (CAR) (Cohen *et al.*, 2001), de l'ESAM (Nasdala *et al.*, 2002), de JAM-4 (Hirabayashi *et al.*, 2003) et de la protéine membranaire CAR-like (CLMP) (Raschperger *et al.*, 2004). Toutes ces protéines partagent une organisation similaire en deux domaines immunoglobuline-like avec JAM-1, JAM-2 et JAM-3. Cependant ces quatre protéines sont plus similaires entre elles que les trois JAMs précédemment décrites et donc forment une sous-famille parmi les membres de la superfamille des immunoglobulines associées aux jonctions serrées (Ebnet *et al.*, 2004). De façon intéressante CAR, ESAM et JAM-4 possèdent un domaine de liaison PDZ de type I, alors que JAM-1, JAM-2 et JAM-3 ont un domaine de liaison PDZ de type II, ce qui suggère l'existence de différences fonctionnelles entre ces deux sous-familles. La fonction de ces quatre molécules n'est pas encore très claire. CAR, JAM-4 et CLMP sont exprimées majoritairement dans les cellules épithéliales, alors que ESAM est exprimée exclusivement dans les cellules endothéliales, y compris au niveau de la BHE (Hirata *et al.*, 2001; Nasdala *et al.*, 2002). Les souris déficientes en ESAM montrent un dysfonctionnement de l'angiogénèse associée à des processus pathologiques tels que la croissance tumorale (Ishida *et al.*, 2003). Mais le rôle exact de cette protéine au sein des jonctions serrées reste à ce jour inconnu.

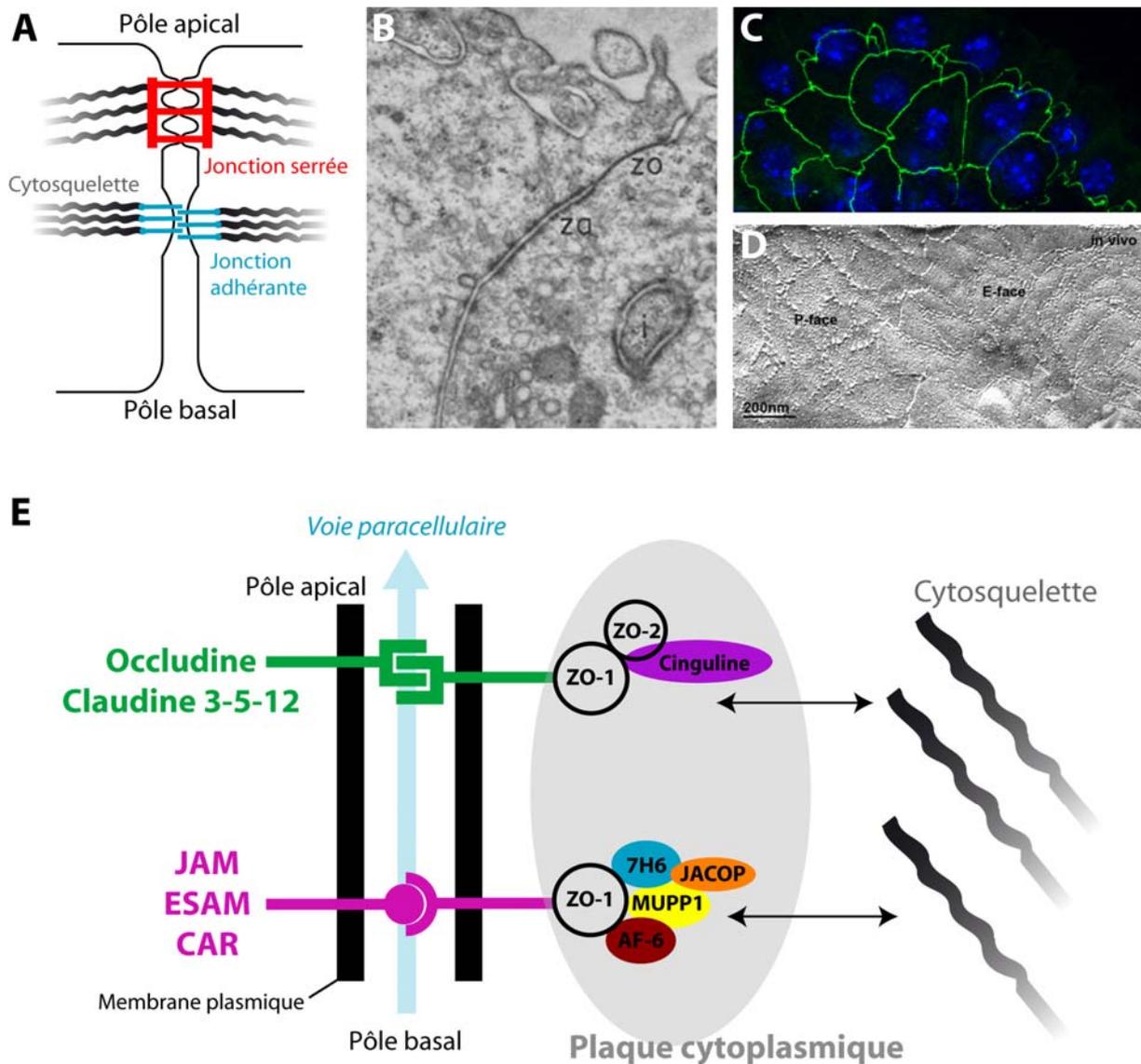


Figure 2 : Les jonctions serrées, de la morphologie à la biologie moléculaire.

- A.** Schématisation d'un complexe jonctionnel situé au pôle apical de deux cellules adjacentes.
- B.** Complexe jonctionnel en microscopie électronique. Au niveau de la jonction serrée (zo pour *zonula occludens*), les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes apparaissent comme fusionnées. On retrouve toujours une jonction adhérente (za pour *zonula adherens*) située sous la jonction serrée. (Illustration tirée de Brightman and Reese, 1969).
- C.** Immunodétection de la protéine occludine (vert) au niveau des plexus choroïdes et contre-coloration des noyaux au Hoechst (bleu). Les jonctions serrées entourent toute la cellule et apparaissent comme des nids d'abeille en immunohistochimie.
- D.** Visualisation des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales de la BHE par la technique de cryofracture. Le degré d'association à la face P de la membrane plasmique est un critère qui rend compte de l'étanchéité des jonctions serrées. (Illustration tirée de Wolburg *et al.*, 2009).
- E.** Schématisation simplifiée des interactions moléculaires entre deux cellules endothéliales de la BHE. *AF-6*, *afadin-6*; *CAR*, *Coxsackievirus-adenovirus receptor*; *ESAM*, *endothelial cell-selective adhesion molecule*; *JACOP*, *junction-associated coiled-coil protein*; *JAM*, *junctional adhesion molecule*; *MUPP*, *multi-PDZ domain protein*; *ZO*, *zonula occludens*.

ii) Les protéines adaptatrices

Les protéines transmembranaires sont associées au niveau de leur queue cytoplasmique à des protéines adaptatrices formant de larges complexes protéiques identifiés en tant que « plaque cytoplasmique ».

LES ZONULA-OCCLUDENS (ZO)

La protéine ZO-1 fut la première protéine associée aux jonctions serrées identifiée et caractérisée (Stevenson *et al.*, 1986). C'est une phosphoprotéine monomérique de 220 kDa. Cette protéine se trouve enrichie au niveau des jonctions adhérentes de cellules possédant ou non des jonctions serrées (Itoh *et al.*, 1993), suggérant ainsi qu'elle n'est pas spécifique de ce type de jonctions. Depuis, d'autres protéines adaptatrices ZO-2 (160 kDa) et ZO-3 (130 kDa) ont été décrites. Ces protéines font partie de la famille des MAGuK (membrane associated guanylate kinase-like proteins). Elles possèdent toutes des domaines d'interaction protéine-protéine : un domaine guanylate kinase, un domaine SH3 et trois domaines PDZ (Wolburg and Lippoldt, 2002). Ces domaines jouent un rôle essentiel dans la transduction des signaux et dans la liaison des protéines transmembranaires au cytosquelette de la cellule. Le domaine SH3 assure la liaison avec les protéines de signalisation et le cytosquelette. Les domaines PDZ sont impliqués dans l'interaction avec les claudines (Itoh *et al.*, 1999a). De plus, ZO-1, ZO-2 et ZO-3 interagissent directement avec la queue cytoplasmique de l'occludine via leur domaine GuK (Fanning *et al.*, 1998; Furuse *et al.*, 1994; Haskins *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1999b).

Au niveau de la BHE, on retrouve les protéines ZO-1 et ZO-2 (Inoko *et al.*, 2003). Certaines observations suggèrent fortement que les protéines ZO-1 et ZO-2 sont nécessaires au bon assemblage des protéines transmembranaires constitutives des jonctions serrées. En effet, des auteurs ont montré que la déplétion en ZO-1 et ZO-2 dans une lignée de cellules épithéliales mammaires empêche l'assemblage des jonctions serrées (Umeda *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'expression d'une protéine ZO-1 mutée au niveau de la région SH3-GUK dans des cellules MDCK, engendre la formation de jonctions serrées mal localisées sur la membrane plasmique latérale (Fanning *et al.*, 2007). Une étude plus récente montre que, chez la souris, une déficience en ZO-1 ou ZO-2 entraîne la mort à l'état embryonnaire, un dysfonctionnement de la barrière paracellulaire et une déstructuration des jonctions serrées (Katsuno *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). En plus de leur rôle d'échafaudage, les protéines ZO-1 et ZO-2 jouent également un rôle dans la transcription des gènes. En effet, on retrouve l'expression de la protéine ZO-1 dans le noyau de cellules épithéliales en culture non confluentes, suggérant ainsi que la

localisation nucléaire de ZO-1 est inversement corrélée à la maturité des jonctions serrées (Gottardi *et al.*, 1996). De plus, il a été montré que le facteur de transcription ZONAB se lie au domaine SH3 de ZO-1, et co-localise avec lui à la fois à la jonction serrée et dans le noyau. Ensemble, ZONAB et ZO-1 sont responsables de la modulation de la perméabilité paracellulaire et de la progression du cycle cellulaire (Balda *et al.*, 2003; Balda and Matter, 2000). De même, une étude récente montre que la protéine ZO-2 intervient en tant que facteur nucléaire pour influencer l'expression de certains gènes (Traweger *et al.*, 2008). Cependant, toutes ces études ont été menées sur des lignées de cellules épithéliales, et il n'existe pas à ce jour d'évidence de l'implication de la protéine ZONAB au niveau de la BHE.

Enfin ZO-1 est la seule protéine de jonction serrée qui ait été décrite au niveau des tancytes des organes circumventriculaires (Petrov *et al.*, 1994; Smith and Shine, 1992).

LA CINGULINE

La cinguline est une phosphoprotéine de 140 kDa (Citi *et al.*, 1989). Des études de microscopie électronique situent cette protéine à la face cytoplasmique de la jonction serrée (Stevenson *et al.*, 1989). Cette protéine lie à la fois les protéines ZO et des protéines du cytosquelette telles que la myosine (Cordenonsi *et al.*, 1999), impliquant un rôle pour cette protéine dans l'échafaudage liant la jonction serrée au cytosquelette de la cellule.

LA PROTEINE 7H6

La protéine 7H6 est une phosphoprotéine de 155 kDa associée aux jonctions serrées (Zhong *et al.*, 1993). Des études *in vitro* ont permis de montrer que, dans des cellules épithéliales MDCK, l'association de cette protéine à la jonction serrée corrèle avec une augmentation de la TEER et une diminution de la perméabilité paracellulaire. De plus, la localisation ou non de la protéine 7H6 à la jonction serrée dépend de son état de phosphorylation (Zhong *et al.*, 1993). Plus tard, la même équipe montre que la protéine 7H6 joue également un rôle important dans l'assemblage et la régulation des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales (Satoh *et al.*, 1996).

AUTRES PROTEINES

Voici une liste non exhaustive des autres protéines cytoplasmiques associées aux jonctions serrées : les protéines de polarité PAR3 et PAR6 (partitioning defective proteins) (Ebnet *et al.*, 2008), la protéine aux multiples domaines PDZ-1 (MUPP1) (Hamazaki *et al.*, 2002), les protéines de la famille des MAGIs (membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation of protein-protein interaction domains) (Wegmann *et al.*, 2004), la

protéine AHNAK (Gentil *et al.*, 2005) et la protéine enroulée associée aux jonctions serrées (JACOP) (Ohnishi *et al.*, 2004). Toutes ces protéines ont des fonctions soit d'adaptateur, de régulation et/ou de signalisation. Cependant, vu la complexité des interactions entre toutes les protéines impliquées dans le complexe de jonction serrée, leur rôle exact est loin d'être totalement élucidé.

3. Fonctions des jonctions serrées

Les jonctions serrées sont directement responsables des propriétés de barrière des épithéliums en restreignant la perméabilité paracellulaire. Cependant, elles jouent également un rôle fondamental au sein même de la cellule. Elles sont notamment impliquées dans la mise en place de la polarité et le contrôle de la prolifération cellulaire.

i) Régulation de la perméabilité paracellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, les jonctions serrées sont une barrière physique à la diffusion passive de molécules entre les cellules d'un épithélium et la complexité du réseau de jonctions serrées d'un épithélium est corrélée à la TEER (Claude, 1978). Les cellules MCDK ou encore des cellules thyroïdiennes ont une TEER spontanément élevée dans des conditions de culture normales et cette résistance diminue lors d'un traitement avec des inhibiteurs de la biosynthèse des sphingolipides. Or de façon surprenante, cette diminution de la TEER n'est pas associée à des altérations morphologiques des jonctions serrées observées par cryofracture (Leung *et al.*, 2003). Ainsi, des modifications de l'étanchéité d'un épithélium ne sont pas dues à des restructurations morphologiques mais plutôt à des changements au niveau moléculaire. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la combinaison des différentes claudines dans un tissu donné est directement responsable de son étanchéité. On dit que les claudines forment une sorte de mur à la diffusion paracellulaire. Cependant, la fonction des claudines est bien plus compliquée. Une étude montre que la mutation du gène codant la claudine 16 est responsable de l'abolition des phénomènes de réabsorption du calcium et du magnésium dans la branche ascendante de la anse de Henlé au niveau du néphron (Simon *et al.*, 1999). Or ces phénomènes de réabsorption se font *via* la voie paracellulaire indiquant que la claudine 16 est directement responsable de cette perméabilité. Les auteurs suggèrent alors un nouveau rôle pour les claudines : celui de former « un pore à l'intérieur du mur ». Autrement dit, les claudines ne sont plus un barrage à la diffusion passive mais au contraire régulent la perméabilité aux ions à l'intérieur même de la jonction serrée (Tsukita and Furuse, 2000; Van Itallie and Anderson, 2006).

ii) Polarisation cellulaire

En plus de stopper la diffusion passive entre les cellules en scellant l'espace intercellulaire, les jonctions serrées jouent également un rôle dans l'établissement de la polarité cellulaire. En effet, elles forment une barrière à la diffusion des lipides et des protéines au sein même de la membrane plasmique. Il en résulte notamment une distribution non uniforme des transporteurs entre la face luminale et abluminale des cellules (Betz *et al.*, 1980; Lidinsky and Drewes, 1983). Ainsi lorsque les jonctions serrées de cellules en culture sont rompues, leur polarité est également perdue (Galli *et al.*, 1976; Hoi Sang *et al.*, 1979). Les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène de polarisation font intervenir de nombreuses protéines de la plaque cytoplasmique (voir pour revue Shin *et al.*, 2006). Parmi ces protéines, deux complexes majeurs ont été décrits : le complexe Par (pour « partitioning defective ») et le complexe Crumbs.

LE COMPLEXE PAR3-PAR6-APKC

Les protéines PAR3 et PAR6 sont des protéines d'échafaudage contenant des domaines PDZ et impliquées dans de nombreuses interactions protéine-protéine. Dans des cellules épithéliales polarisées, le complexe PAR3-PAR6-aPKC est localisé au niveau des jonctions serrées (Ohno, 2001). Des approches *in vitro* ont permis de montrer que l'adhésion de cellules adjacentes provoque la formation de jonctions adhérentes et le recrutement des protéines JAMs au pôle apical (voir pour revue Takai and Nakanishi, 2003). Le recrutement de la protéine PAR3 au niveau de la jonction naissante semble médié en partie par les JAMs (Ebnet *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2001). En parallèle, la formation de jonctions adhérentes active la GTPase Cdc42 qui lie et active la protéine kinase C atypique (aPKC) (Fukuhara *et al.*, 2004). Cette étape est nécessaire à la formation des jonctions serrées mais également à l'établissement de la polarité cellulaire (Suzuki *et al.*, 2002). Cependant, au niveau des cellules endothéliales, les protéines PAR3 et PAR6 sont associées à la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine, impliquée dans la formation de la jonction adhérente) mais ce complexe ne lie pas la aPKC. De plus, l'expression de la VE-cadhérine dans des cellules épithéliales est délétère pour la formation des jonctions serrées. Ces données suggèrent donc qu'au niveau de la BHE, il existe un autre complexe PAR et que celui-ci ne nécessite pas l'activité de la aPKC pour la polarisation des cellules endothéliales (Iden *et al.*, 2006).

LE COMPLEXE CRB3-PALS1-PATJ

Les protéines Crumbs (CRB) sont des protéines à un domaine transmembranaire, possédant un domaine PDZ du côté C-terminal. La protéine de jonction serrée associée à

Pals1 (PATJ) est une protéine aux multiples domaines PDZ localisée à la jonction serrée, capable d'interagir avec ZO-3 et la claudine 1 (Roh *et al.*, 2002a). La protéine associée à Lin seven 1 (Pals1) est une protéine MAGuK qui joue le rôle d'adaptateur en promouvant l'interaction directe entre CRB3 et PATJ (Roh *et al.*, 2002b). Ce complexe est essentiel à la formation de la polarité épithéliale. La surexpression de CRB3 (Roh *et al.*, 2003) ou encore l'inhibition de l'expression de PATJ (Shin *et al.*, 2005) ou Pals1 (Straight *et al.*, 2004) par la technique d'ARN interférence, retardent la formation des jonctions serrées et empêchent la polarisation de la cellule. Ces effets sont certainement dus à une interaction entre Pals1 et Par6 dont l'association est médiée par l'activation de Cdc42. De plus, la perte de Pals1 et PATJ entraîne une délocalisation de la aPKC, ce qui perturbe probablement les voies de signalisation sous-jacentes (Hurd *et al.*, 2003).

iii) Prolifération cellulaire

Les jonctions serrées régulent la prolifération épithéliale par différents mécanismes moléculaires qui, en règle générale, inhibent la prolifération à mesure que la densité cellulaire et donc l'assemblage des jonctions serrées augmentent. Les jonctions serrées peuvent affecter la prolifération cellulaire par deux mécanismes distincts : la modulation des voies de signalisation et la séquestration de facteurs de transcription (voir pour revue Matter *et al.*, 2005).

EXEMPLE DE REGULATION DES VOIES DE SIGNALISATION

Dans la majorité des cancers, une perte de la différenciation épithéliale est liée à une dérégulation de la voie des protéines Ras, plus particulièrement les kinases Raf qui stimulent l'entrée dans le cycle cellulaire *via* la voie des ERK/MAP kinases. De façon intéressante, l'occludine est capable de supprimer la voie de signalisation oncogène liée à Raf-1 et ainsi d'empêcher la transformation d'une lignée de cellules de glande salivaire (Wang *et al.*, 2005).

EXEMPLE DE REGULATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Plusieurs protéines ont été localisées à la fois au niveau de la jonction serrée et au niveau du noyau cellulaire, laissant ainsi supposer un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes. C'est le cas de la protéine ZO-2 qui interagit avec ZO-1 au niveau de la membrane plasmique dans des cultures confluentes alors qu'elle est localisée dans le noyau de cellules en prolifération. Les auteurs ont également montré que la ZO-2 nucléaire lie et inhibe certains facteurs de transcription (Betanzos *et al.*, 2004). La protéine ZO-1 quant à elle est capable d'interagir avec le facteur de transcription ZONAB dans le cytoplasme, inhibant ainsi

sa translocation vers le noyau. ZONAB étant impliqué dans la transcription de facteurs de régulation du cycle cellulaire, par conséquent sa séquestration dans le cytoplasme inhibe la prolifération cellulaire (Sourisseau *et al.*, 2006).

Les jonctions serrées ne sont pas juste un obstacle physique restreignant les échanges entre le compartiment sanguin et le SNC. Elles sont composées de nombreuses molécules qui jouent également un rôle fondamental dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaires régulant notamment la polarisation des cellules. C'est justement la polarisation des cellules situées à l'interface entre les deux compartiments qui va être déterminante dans le contrôle des échanges entre le sang et le cerveau et donc participer au maintien de l'homéostasie.

III. Interfaces sang/cerveau et maintien de l'homéostasie

La nature restrictive des interfaces sang/cerveau, est due en partie à la présence de jonctions serrées qui empêchent le passage des petites molécules hydrophiles depuis le sang vers le cerveau. Parmi les facteurs qui contrôlent l'accès des molécules au cerveau, la solubilité lipidique est un élément déterminant du fait de la nature lipidique des membranes cellulaires. De façon générale, la balance hydrophilicité / hydrophobicité d'une molécule est un bon pronostic de la perméabilité d'une barrière vis-à-vis de cette molécule. En plus de la diffusion passive à travers la membrane lipidique, la liaison d'une molécule aux protéines plasmiques, son ionisation, son affinité pour les systèmes de transport et son potentiel métabolisme cérébral sont d'autres facteurs très importants pour l'entrée des molécules dans le cerveau.

1. Apport des nutriments

De nombreux transporteurs ont été décrits pour les hexoses (glucose, galactose), les acides aminés (AA), les acides monocarboxyliques (lactate, pyruvate), les purines (adénine, guanine), les nucléosides (adénosine, guanosine, uridine), les amines (choline), et les ions. Parmi ces transporteurs, le transporteur du glucose GLUT-1 est d'une grande importance. En effet, le glucose est la principale source d'énergie du cerveau. Ce transporteur est une protéine de 55 kDa, membre de la famille supergénique des transporteurs de glucose sodium-indépendants (Bell *et al.*, 1990). Son expression est restreinte aux cellules endothéliales des capillaires cérébraux, aux cellules épithéliales des plexus choroïdes et à une sous-population

de tancytes du troisième ventricule (voir chapitre 3) (Farrell *et al.*, 1992). Mais c'est au niveau de la BHE que son rôle est le plus évident.

Au niveau des cellules endothéliales de la BHE, GLUT-1 est exprimé à la fois de façon membranaire et intracellulaire (Boado and Pardridge, 1990; Pardridge *et al.*, 1990). Il permet le transport du glucose vers le cerveau par un mécanisme de diffusion facilitée selon son gradient de concentration. De nombreuses études montrent l'existence d'une distribution asymétrique entre ces différents compartiments et notamment au niveau de la membrane elle-même où la distribution différentielle de GLUT-1 entre la face luminale et abluminale aurait un effet direct sur le débit du transport du glucose vers le cerveau (Farrell and Pardridge, 1991).

La majorité des AA ne sont pas synthétisés au niveau cérébral mais sont indispensables pour la synthèse des protéines ou sont des précurseurs de la sérotonine, du monoxyde d'azote et des catécholamines. De façon générale, la quantité d'AA présente au niveau central est finement régulée par deux grands types de transporteurs. Les systèmes de transport facilité sodium-indépendants sont localisés de façon asymétrique sur la face luminale et abluminale des cellules endothéliales de la BHE et permettent l'accès des AA au cerveau depuis la circulation sanguine. C'est le cas du système L1 spécifiquement exprimé au niveau des cellules endothéliales et qui permet le transport des acides aminés à longue chaîne neutre (Killian and Chikhale, 2001) ; et du système γ^+ impliqué dans le transport des acides aminés à longue chaîne cationique que l'on retrouve également au niveau des cellules endothéliales de la BHE (Stoll *et al.*, 1993). En complément, il existe également des systèmes de transport sodium-dépendants présents sur la face abluminale des cellules endothéliales. Ces transporteurs utilisent le gradient de concentration du sodium pour extraire les AA non essentiels du SNC (voir pour revue Bernacki *et al.*, 2008). D'autres études indiquent que les plexus choroïdes sont également impliqués dans le transport des acides aminés depuis le sang vers le LCR (Preston and Segal, 1992) mais les mécanismes sont moins connus.

2. Accès au cerveau des macromolécules

Les molécules plasmatiques peu liposolubles et de haut poids moléculaire, sont incapables de franchir les barrières par simple diffusion. L'existence de récepteurs spécifiques à la surface des cellules endothéliales de la BHE ou des cellules épithéliales des plexus choroïdes, permet les échanges nécessaires entre les compartiments sanguin et cérébral. Ce phénomène est connu sous le nom de transcytose et se déroule en trois étapes : endocytose du complexe molécule-récepteur, transport de ce complexe à travers le cytoplasme et exocytose

du côté opposé de la cellule. Du fait qu'elle dépende de récepteurs membranaires, la transcytose est spécifique et saturable. Les récepteurs membranaires sont généralement regroupés au niveau de la membrane plasmique dans des puits d'invagination pour être ensuite endocytés dans des vésicules. Au moins deux types de vésicules sont décrites : les vésicules recouvertes de clathrine et les cavéoles. Alors que la voie des clathrines est impliquée dans la dégradation lysosomiale, la voie des cavéoles est clairement impliquée dans les phénomènes de transcytose.

Les cavéoles sont définies comme des invaginations de la membrane plasmique semblables à des cavernes (« little caves ») et caractérisées par la présence d'un marqueur spécifique : la cavéoline (Kurzchalia *et al.*, 1992). La cavéoline est une phosphoprotéine de 22 kDa qui existe sous trois isoformes dont la cavéoline-1 qui semble être un composant essentiel. En effet, son expression transitoire dans des lymphocytes, qui normalement ne l'expriment pas, suffit à entraîner l'apparition de cavéoles (Fra *et al.*, 1995). Cependant, les souris invalidées pour le gène codant la cavéoline-1 ne semblent pas avoir de problème au niveau du transport trans-endothélial (Drab *et al.*, 2001). Quoiqu'il en soit, les cavéoles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Elles interviennent notamment dans l'adhésion cellulaire, les voies de signalisation, la régulation lipidique, la mécano-sensibilité et les phénomènes d'endocytose mais les mécanismes sont encore peu connus (voir pour revue Parton and Simons, 2007). Les molécules endocytées par la voie des cavéoles peuvent soit être libérées dans le cytoplasme ou dirigées vers le réticulum endoplasmique et le récepteur est recyclé à la membrane, soit être séquestrées avec leur récepteur dans une vésicule cytoplasmique ou encore traverser la cellule par transcytose.

La cavéoline-1 est fortement exprimée au niveau des cellules endothéliales de la BHE (Virgintino *et al.*, 2002), des cellules épithéliales des plexus choroïdes et des tanocytes de l'éminence médiane (Peruzzo *et al.*, 2004). Des études *in vitro* montrent que la voie des cavéoles est impliquée dans la transcytose de diverses molécules à travers l'endothélium cérébral telles que les lipoprotéines de faible densité (LDL) (Dehouck *et al.*, 1997), la transferrine (Descamps *et al.*, 1996) et la lactoferrine (Fillebeen *et al.*, 1999).

3. Neuroprotection

Depuis de nombreuses années, des études montrent l'implication des pompes d'efflux qui empêchent l'accumulation de la majorité des molécules hydrophobes ou des drogues dans le SNC. Plusieurs types de pompes d'efflux sont exprimés au niveau de la BHE et des plexus choroïdes. On trouve notamment les cassettes liant l'ATP (ABC) dont font partie la P-

glycoprotéine (P-gp) et les protéines associées à la résistance aux drogues multiples (MRP). La P-gp est exprimée au niveau des cellules endothéliales de la BHE (Cordon-Cardo *et al.*, 1989) et plus faiblement au niveau des cellules épithéliales des plexus choroïdes (Gazzin *et al.*, 2008). Les souris déficientes en P-gp sont tout a fait viables mais montrent une accumulation anormale dans le parenchyme cérébral des drogues qui leur sont administrées (Schinkel *et al.*, 1994). La P-gp est impliquée dans la prévention du passage et de l'accumulation des drogues et xénobiotiques dans le SNC, c'est pourquoi elle est d'un grand intérêt pour la recherche portant sur l'accès des médicaments au cerveau (Pardridge, 2003). De plus, d'autres études montrent que la P-gp peut également limiter l'accès de certaines molécules circulantes telles que le cortisol, la corticostérone, la progestérone et l'aldostérone (Karszen *et al.*, 2001; Uhr *et al.*, 2002). Au niveau des plexus choroïdes, on retrouve d'autres transporteurs tels que le transporteur MRP-1, localisé au niveau de la membrane baso-latérale des cellules épithéliales (Gazzin *et al.*, 2008).

La BHE et les plexus choroïdes sont également des sites majeurs du métabolisme des substances neuroactives endogènes et des drogues dans le cerveau. Ce métabolisme est catalysé par des isoenzymes telles que les oxydases de monoamines (MAO), cytochrome P450 monooxygénases, NADPH-cytochrome P450 réductases, phosphatases alcalines, glucosyl transférases, glutathion transférases et hydrolases époxydes. C'est ce que les auteurs nomment communément la « barrière métabolique » du cerveau . A noter que certaines de ces enzymes sont également retrouvées au niveau des cellules endothéliales des OCVs, suggérant ainsi leur rôle dans les mécanismes de neuroprotection (Gherzi-Egea *et al.*, 1994).

4. La fonction immune

Le concept selon lequel le SNC est un site « immuno-privilegié » a beaucoup évolué ces dernières années. En effet, de nombreuses pathologies cérébrales présentent un caractère inflammatoire et s'accompagnent d'une infiltration massive de cellules immunitaires d'origine sanguine dans le parenchyme cérébral.

Lorsque l'organisme est soumis à un challenge immunitaire, il se produit une sécrétion massive de cytokines dites pro-inflammatoires dans la circulation sanguine. Les cytokines forment un groupe hétérogène de polypeptides solubles pour la plupart et regroupant diverses catégories de glycoprotéines telles que des interleukines (IL), des chimiokines, des facteurs de nécrose tumorale (TNF), des facteurs de stimulation de colonies (CSF), des neurotrophines et autres neuropoïétines (Hopkins and Rothwell, 1995; Rothwell and Hopkins, 1995). Ces

cytokines circulantes pénètrent le SNC soit par simple diffusion *via* les capillaires fenêtrés des OCVs (Banks and Erickson, 2009), soit *via* l'endothélium cérébral et l'épithélium des plexus choroïdes qui possèdent des récepteurs spécifiques. Les cytokines vont alors agir de diverses façon : soit elles traversent ces interfaces sang/cerveau pour agir directement sur les cellules du SNC ou soit elles agissent sur les cellules de cet interface pour induire la synthèse de seconds messagers tels que la prostaglandine E₂ (PGE₂) ou le monoxyde d'azote (NO) (Jaworowicz *et al.*, 1998). Dans tous les cas, il en résulte une perméabilité accrue de la BHE envers les protéines et cellules plasmatiques. Dans ces conditions inflammatoires, on observe une expression accrue des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales de la BHE (Steffen *et al.*, 1994) et des cellules épithéliales des plexus choroïdes (Steffen *et al.*, 1996). Ces molécules sont responsables des phénomènes d'infiltration leucocytaire. On retrouve également l'expression de ces molécules d'adhésion dans les OCVs au niveau des cellules endothéliales fenêtrées (Schulz and Engelhardt, 2005). Cependant, aucun élément concernant les tanocytes n'a pour l'instant été décrit.

5. Fonctions propres aux OCVs

i) OCVs sensoriels

Les OCVs sensoriels ont la particularité de posséder des corps cellulaires de neurones projetant vers d'autres régions cérébrales. Parce que ces neurones sont directement exposés à la circulation sanguine, les OCVs sensoriels sont idéalement placés pour recevoir à la fois les signaux humoraux et nerveux provenant de la périphérie. Ainsi, les réseaux neuronaux qu'ils contiennent permettraient l'intégration de toutes ces informations et donc l'élaboration d'une réponse physiologique adaptée au maintien de l'homéostasie.

Ces dernières années, les auteurs se sont plus particulièrement intéressés à l'implication des OCVs dans le contrôle de la fonction cardiovasculaire et de la balance hydrique. L'angiotensine II (Ang) est la principale molécule active du système rénine angiotensine et joue un rôle important dans la régulation cardiovasculaire et dans l'équilibre hydrominéral de l'organisme *via* son action à la fois au niveau périphérique et au niveau central. Bien que des études *in vitro* suggèrent que l'Ang traverse la BHE par un système saturable de transport (Rose and Audus, 1998), ce fait n'a jamais été clairement démontré. De plus ses récepteurs sont largement distribués dans tout le cerveau et notamment au niveau des OCVs. Les neurones situés au niveau de l'OVLT et du SFO expriment les récepteurs à l'Ang AT₁ et AT₂ (Song *et al.*, 1992) et montrent une activation *c-fos* suite à une injection

intraveineuse d'Ang (McKinley *et al.*, 1992). De plus, la stimulation de l'OVLT et du SFO provoque une augmentation de la pression artérielle (Mangiapane and Brody, 1987; Mangiapane and Simpson, 1980a; Mangiapane and Simpson, 1980b). D'autres peptides tels que la vasopressine (Smith and Ferguson, 1997), le peptide natriurétique atrial (Saavedra, 1986) et la relaxine (Mumford *et al.*, 1989) ont également des récepteurs au niveau de l'organe subfornical et l'activation de ces récepteurs a des effets physiologiques. Enfin des études montrent clairement que les neurones de l'OVLT et du SFO sont capables de répondre directement aux changements de salinité et d'osmolarité (Anderson *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 1987; Richard and Bourque, 1995; Vivas *et al.*, 1990), suggérant un rôle prépondérant pour ces neurones dans la détection des changements homéostatiques liés à l'équilibre hydrominéral de l'organisme.

Les OCVs sensoriels semblent également jouer un rôle dans la réponse fébrile. En effet l'administration périphérique de lipopolysaccharides (LPS) induit l'expression de la protéine *c-fos* dans l'OVLT (Elmqvist *et al.*, 1996; Sagar *et al.*, 1995) et dans l'organe subfornical (Sagar *et al.*, 1995). Certains auteurs ont également reporté que des lésions de l'OVLT empêchent le déclenchement de la réponse fébrile suite à une injection de LPS chez le rat (Caldwell *et al.*, 1998), alors que d'autres au contraire observent une amplification de cette réponse (Stitt, 1985) ou encore n'observent pas d'effet (Takahashi *et al.*, 1997). La grande divergence des résultats provient très certainement du manque de spécificité des lésions de l'OVLT qui toucheraient également les structures avoisinantes. Cela dit, il a été reporté que des lésions de l'organe subfornical chez le rat, atténuent la réponse fébrile suite à une injection de LPS (Takahashi *et al.*, 1997). Et l'injection d'un antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1 dans l'organe subfornical supprime la réponse fébrile suite à une injection systémique de LPS alors que ce même antagoniste injecté dans l'OVLT n'a pas d'effet (Cartmell *et al.*, 1999). A la vue de toutes ces données, on peut supposer que l'OVLT et l'organe subfornical jouent des rôles complémentaires dans la régulation de la réponse fébrile, d'autant plus que ces deux structures sont interconnectées entre elles (Harre *et al.*, 2002).

L'area postrema est également un site d'intégration pour de nombreux signaux de satiétés présents dans le sang. C'est le cas par exemple de l'amyline, une hormone synthétisée avec l'insuline par le pancréas en réponse à l'ingestion de nourriture. L'amyline provoque une réponse hippophagique lorsqu'elle est administrée par voie systémique ou centrale (Chance *et al.*, 1991; Lutz *et al.*, 1994), cet effet étant indépendant du nerf vague (Lutz *et al.*, 1995). L'area postrema possède une forte densité de récepteurs à l'amyline (Sexton *et al.*, 1994) et l'amyline augmente l'excitabilité des neurones de l'area postrema *in vitro* (Riediger *et al.*,

2001). Enfin des lésions de l'area postrema bloquent l'effet hippophagique de l'amyline (Lutz *et al.*, 2001). De façon intéressante, la majorité des neurones qui répondent à l'amyline sont également glucosensibles (Riediger *et al.*, 2002), suggérant un rôle pour l'area postrema dans l'intégration et la transmission des signaux nutritionnels aux différents centres de régulation de la prise alimentaire. Des études suggèrent que l'amyline exerce son effet anorexigène en diminuant de façon indirecte l'expression de peptides orexigènes dans l'hypothalamus latéral tels que l'orexine et l'hormone de concentration de la mélanine (Barth *et al.*, 2003). Mais l'area postrema est sous l'influence de bien d'autres hormones circulantes telles que la cholécystokinine (Sun and Ferguson, 1997), l'adrénomédulline (Shan and Krukoff, 2000), le peptide YY (Bonaz *et al.*, 1993; Dumont *et al.*, 2007; Ohkubo *et al.*, 1990) et le peptide glucagon like-1 (Merchenthaler *et al.*, 1999; Rowland *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2003), quatre hormones anorexigènes. L'area postrema est également activée par des peptides orexigènes telles que la ghréline (Lawrence *et al.*, 2002; Zigman *et al.*, 2006) et l'orexine (Yang and Ferguson, 2002).

De façon intéressante, l'area postrema semble également jouer un rôle dans la fonction immune. En effet, l'area postrema est capable de détecter une agression toxique à la fois *via* la présence de cytokines et/ou toxines dans la circulation sanguine (Elmqvist *et al.*, 1996) et *via* les afférences vagales qu'elle reçoit (Wan *et al.*, 1994). Elle déclenche alors nausées et vomissements afin d'éliminer l'agent toxique (Hornby, 2001), et permet le développement futur d'une aversion aux saveurs associées à cette agression (Touzani and Sclafani, 2002).

ii) OCVs sécréteurs

Les OCVs sécréteurs sont spécialisés dans la libération de neurohormones directement dans la circulation sanguine. C'est ce que l'on appelle neurosécrétion. Elle est directement liée à la présence de capillaires fenêtrés qui ne restreignent pas les échanges entre le sang et le SNC. L'éminence médiane est le principal site de neurosécrétion du cerveau (chapitre2).

Les interfaces sang/cerveau constituent un élément majeur du maintien de l'homéostasie de l'organisme. Ils doivent leurs propriétés à la présence de jonctions serrées. Cependant, si les mécanismes de la régulation des échanges entre le sang et le cerveau sont relativement bien documentés concernant la BHE, il reste encore beaucoup de points à éclaircir concernant les plexus choroïdes et les OCVs. Notamment au niveau des OCVs où les auteurs s'arrêtent généralement à la présence de capillaires fenêtrés et considèrent ces régions comme des « portes ouvertes » du cerveau.

Chapitre 2. LA RÉGION TUBÉRALE DE L'HYPOTHALAMUS MÉDIOBASAL

L'hypothalamus joue un rôle majeur dans la régulation de nombreux systèmes physiologiques intervenant dans le maintien de l'homéostasie. Pour accomplir cette fonction, il doit être tenu informé en permanence de l'état physiologique de l'organisme afin de pouvoir rétablir l'équilibre en cas de perturbation homéostasique. Les informations vont transiter en partie *via* les interfaces sang/cerveau que constituent la BHE, les plexus choroïdes et les OCVs. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal en tant qu'interface tripartite entre le sang, le LCR et le parenchyme cérébral.

I. Anatomie fonctionnelle

1. Définition et limites anatomiques

L'hypothalamus fait partie, avec le thalamus et l'épithalamus, du diencéphale. Il compose les parois et le plancher du troisième ventricule et s'étend depuis le chiasma optique dans sa partie antérieure à l'extrémité postérieure des corps mamillaires. L'hypothalamus est divisé longitudinalement en trois zones distinctes : la zone périventriculaire, médiale et latérale. A ces divisions s'ajoutent quatre niveaux rostro-caudaux qui sont : la région préoptique, supraoptique (ou antérieure), tubérale et mamillaire. De ce fait la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal se compose de trois noyaux qui sont, du plus dorsal au plus ventral : le noyau dorsomédian hypothalamique (DMH), le noyau ventromédian hypothalamique (VMH) et enfin le noyau arqué hypothalamique (ARH). En plus de ces noyaux, on retrouve également l'éminence médiane (EM) qui forme ici le plancher du troisième ventricule (Figure 3A).

2. Principaux noyaux hypothalamiques

i) Le noyau arqué hypothalamique

Le ARH occupe la partie caudale de la zone périventriculaire dans la région tubérale de l'hypothalamus. Il peut être subdivisé en deux parties basées sur des critères histologiques : une partie dorsomédiale constituée de petites cellules et une partie ventrolatérale plus grande qui comporte des neurones de taille moyenne.

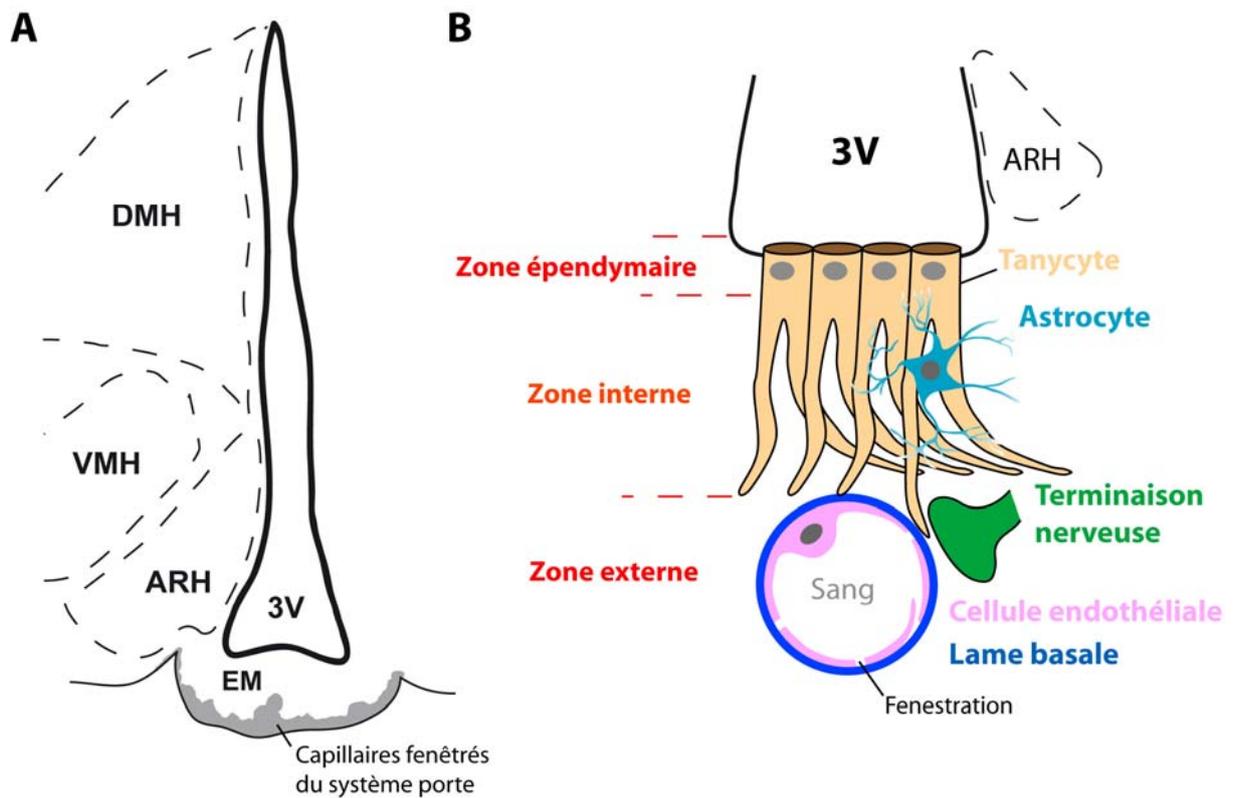


Figure 3 : Anatomie de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.

A. Schématisation de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.

B. Schématisation simplifiée de l'éminence médiane de l'hypothalamus et des différents types cellulaires qui la composent. *3V*, troisième ventricule ; *ARH*, noyau arqué hypothalamique ; *DMH*, noyau dorsomédian hypothalamique, *EM*, éminence médiane ; *VMH*, noyau ventromédian hypothalamique.

La destruction sélective du ARH par des injections de monosodium glutamate en période néonatale provoque obésité, stérilité, diabète, rabougrissement du squelette et atrophie de l'hypophyse ainsi que des organes génitaux chez la souris adulte (Olney, 1969). Ces données mettent en avant l'implication du ARH dans au moins deux fonctions majeures qui sont le contrôle de l'équilibre énergétique et la fonction de reproduction.

En effet, le ARH contient deux populations clés de neurones en relation avec la régulation de la prise alimentaire. L'une exprime la proopiomélanocortine (POMC) et le transcrite associé à la cocaïne et à l'amphétamine (CART) qui sont des neuropeptides anorexigènes (Boston *et al.*, 1997; Kristensen *et al.*, 1998). La POMC est le précurseur des hormones de stimulation des mélanocytes α et β (α - et β -MSH) qui ont pour effet de diminuer la prise alimentaire et d'augmenter l'activité énergétique *via* leur action sur les récepteurs à mélanocortine 3 et 4 (MC3 et 4R) (Cone, 2005; Fan *et al.*, 1997). Ces récepteurs sont abondamment exprimés dans le ARH, le noyau paraventriculaire hypothalamique (PVH), l'aire hypothalamique latérale (AHL) et le DMH (Mountjoy *et al.*, 1994). L'autre population exprime le neuropeptide Y (NPY) et le peptide associé au gène agouti (AgRP) qui sont des neuropeptides orexigènes (Ollmann *et al.*, 1997). Le NPY est un puissant stimulateur de la prise alimentaire qui a également pour effet d'inhiber la dépense énergétique (Stanley and Leibowitz, 1985). L'AgRP est un agoniste naturel de MC3R et MC4R et par conséquent réduit l'effet anorexigène de l' α -MSH (Rossi *et al.*, 1998). De plus, certains neurones à NPY co-exprimant le neuropeptide inhibiteur acide γ -aminobutyrique (GABA) émettent des projections au sein même du ARH, vers les neurones à POMC adjacents (Cowley *et al.*, 2001). En plus de toutes ces données, d'autres études montrent que certains de ces neurones, notamment ceux exprimant le NPY, voient leur activité modulée par les concentrations locales de glucose (Muroya *et al.*, 1999) (voir « glucosensing » au paragraphe suivant).

En plus de son rôle dans le métabolisme énergétique, le ARH est également un noyau clé pour le contrôle de la fonction de reproduction. Par exemple les neurones à NPY sont impliqués dans la fonction de reproduction. Le NPY possède un rôle facilitateur sur la sécrétion de GnRH et potentialise son action sur les cellules gonadotropes hypophysaires au moment du pic pré-ovulatoire de LH (Levine, 1997). De plus, le ARH contient des neurones à kisspeptine (Clarkson *et al.*, 2009) qui pourraient se projeter vers l'éminence médiane au contact des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH (Ramaswamy *et al.*, 2008) pour en stimuler la libération dans le système porte (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2008). Des auteurs reportent également l'existence dans le ARH d'une population neuronale co-exprimant la neurokinine B, la dynorphine et le glutamate. De façon intéressante, les

projections de ces neurones vers le système porte montre un dimorphisme sexuel (Ciofi *et al.*, 2006). Le ARH contient également des neurones dopaminergiques connus pour inhiber la sécrétion de prolactine par les cellules glandulaires de l'hypophyse (Kawano and Daikoku, 1987), et des neurones à somatolibérine (Sawchenko *et al.*, 1985). Enfin, les neurones du ARH projettent vers de nombreuses régions cérébrales dont le PVH, l'AHL, et le DMH (Bouret *et al.*, 2004).

ii) Le noyau ventromédian hypothalamique

Le VMH constitue le plus grand groupe de cellules de la zone tubérale. Il est constitué de deux régions très denses en cellules qui sont la partie dorsomédiale et la partie ventrolatérale. Elles sont séparées par une région moins dense nommée la partie centrale du VMH. Enfin une quatrième division constitue la partie antérieure du noyau. Le VMH est entouré d'une capsule fibreuse épaisse qui le sépare de la substance grise hypothalamique environnante.

Le VMH est depuis longtemps considéré comme un centre de la satiété. La stimulation de ce noyau inhibe la prise alimentaire, alors que des lésions électrolytiques de cette région provoquent un développement rapide de l'obésité (King, 2006). Le VMH a des connections directes avec le PVH, l'AHL et le DMH. De plus, le ARH contribue certainement à la modulation de l'activité du VMH. En effet, bien que les projections du ARH vers le VMH ne soient pas évidentes, le VMH contient des récepteurs à mélanocortine ainsi que des récepteurs au NPY, ce qui suggère fortement que les neurones à POMC et à NPY se projettent vers ce noyau (Bouali *et al.*, 1995; Harrold *et al.*, 1999; Li and Davidowa, 2004; Wisialowski *et al.*, 2000).

Le VMH est également connu pour ses propriétés de « glucosensing ». Des études montrent qu'une chute des taux de glucose sanguin, principale source d'énergie du cerveau, stimule fortement la prise alimentaire (Campfield and Smith, 1986). Or on retrouve des neurones glucosensibles dans la majorité des structures impliquées dans la prise alimentaire dont une forte proportion dans le VMH (Dunn-Meynell *et al.*, 1997).

iii) Le noyau dorsomédian hypothalamique

Le DMH occupe la moitié dorsale de l'aire tubérale de l'hypothalamus. Il est divisé en trois parties qui sont la partie antérieure, postérieure et ventrale.

De nombreux papiers mettent en avant le rôle du DMH dans l'intégration des informations psychiques et somatosensorielles. L'utilisation de traceurs permet de placer le DMH à l'interface entre le PVH (notamment impliqué dans des phénomènes liés au stress) et

les structures limbiques telles que le complexe amigdaloidé (via le noyau du lit de la strie terminale), l'hippocampe et le cortex préfrontal (Hurley *et al.*, 1991; Prewitt and Herman, 1998; Thompson and Swanson, 1998). Le DMH reçoit également des projections GABAergiques inhibitrices des neurones thermosensibles de l'aire préoptique et projette vers le noyau du raphe pallidus, région qui contient les neurones pré-moteurs sympathiques contrôlant la thermogenèse du tissu adipeux brun et l'activité cardiaque (Morrison *et al.*, 2008). De ce fait, la micro injection d'antagonistes des récepteurs GABA_A dans le DMH provoque une augmentation de l'activité du tissu adipeux brun et de la température corporelle mais aussi une augmentation de la fréquence cardiaque, de la sécrétion d'ACTH et de l'expression de la protéine fos dans le PVH (Zaretskaia *et al.*, 2008). Inversement, une micro injection d'un agoniste des récepteurs GABA_A dans le DMH supprime ces effets normalement observés lors d'un stress émotionnel d'intensité modérée (jet d'air) (Morin *et al.*, 2001).

L'expression de la protéine *c-fos* dans le DMH montre que ce noyau est fortement activé lors des phases d'éveil (Saper *et al.*, 2005). En effet, le DMH joue un rôle majeur dans le relais des informations du noyau suprachiasmatique vers le système de régulation veille/sommeil. Il envoie notamment des projections GABAergiques inhibitrices vers le noyau préoptique ventrolatéral (principal noyau activé lors des phases de sommeil), et des projections glutamatergiques/TRH excitatrices vers l'aire hypothalamique latérale. Ces projections sont impliquées dans le maintien de l'état d'éveil (Chou *et al.*, 2003).

Enfin le DMH a de nombreuses connections directes avec d'autres noyaux hypothalamiques impliqués dans la prise alimentaire tels que le PVH et l'AhL (Elmqvist *et al.*, 1998). Des lésions du DMH entraînent notamment un phénotype hippophagique bien que l'animal soit capable de maintenir son poids de corps. Le DMH reçoit des projections NPY/AgRP du ARH (Bellinger and Bernardis, 2002). De plus il contient également des neurones à kisspeptine, suggérant ainsi un rôle dans la fonction de reproduction (Clarkson *et al.*, 2009).

3. L'éminence médiane de l'hypothalamus

L'éminence médiane est située à la base du troisième ventricule. Elle est limitée latéralement par des évaginations latérales du troisième ventricule (le récessus infundibulaire) et l'ARH. L'éminence médiane est une structure hautement organisée contenant trois zones (Figure 3B) :

- la zone épendymaire qui forme le plancher du troisième ventricule et qui est constituée des corps cellulaires de cellules épendymogiales particulières appelées tanocytes (ils feront l'objet du chapitre 3).
- la zone interne du parenchyme, formée par les fibres de passage des neurones à destination de la neurohypophyse, les prolongements cytoplasmiques des tanocytes et d'autres cellules gliales telles que des astrocytes.
- la zone externe, constituée par les terminaisons nerveuses des neurones hypophysiotropes et par les pieds tanocytaires qui contactent les capillaires fenêtrés du plexus porte.

Le système porte est composé d'un plexus primaire qui reçoit les neurohormones hypothalamiques, et de vaisseaux portes atteignant un second plexus qui vascularise les cellules glandulaires de l'adénohypophyse (Duvernoy and Risold, 2007).

Ainsi l'éminence médiane constitue une interface tripartite entre le sang porte, le LCR et l'ARH.

Ces données anatomiques mettent en avant le rôle de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal dans au moins trois grandes fonctions hypothalamiques qui sont le maintien de l'équilibre énergétique (dont la prise alimentaire), le contrôle de la fonction de reproduction et la croissance. La communication entre le sang et le cerveau est un élément essentiel à la régulation de ces fonctions neuroendocrines. En effet, l'hypothalamus joue un rôle majeur dans l'intégration des signaux périphériques faisant intervenir une communication depuis le sang vers le cerveau. Il élabore ensuite une réponse appropriée faisant intervenir une communication depuis le cerveau vers le sang.

II. Communication sang/cerveau dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal

1. Communication sang → cerveau

De nombreuses hormones synthétisées en périphérie ont une action au niveau de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal pour le contrôle de la croissance, de l'homéostasie énergétique et/ou de la reproduction. Ces hormones de taille assez importante sont pour la majorité d'entre elles lipophobes ce qui rend impossible leur diffusion passive à

travers les capillaires normaux de la BHE. Aussi pour atteindre les noyaux hypothalamiques, elles peuvent emprunter plusieurs voies :

- La première consiste en un accès régulé *via* les capillaires de la BHE, ce qui sous-entend l'existence d'un système de transport spécifique au niveau des cellules endothéliales.
- La deuxième possibilité se passe au niveau des plexus choroïdes où il existe des systèmes de transports spécifiques au niveau de l'épithélium régulant l'accès des molécules sanguines au LCR. Une fois présentes dans le LCR, ces molécules peuvent soit atteindre directement les neurones qui contactent le LCR *via* leurs dendrites (Smoller, 1965) soit diffuser au travers des cellules épendymaires perméables vers le parenchyme cérébral adjacent (Brightman and Reese, 1969).
- Enfin, certains auteurs mentionnent l'existence d'une barrière plus permissive au niveau du ARH (Shaver *et al.*, 1992) et la proximité immédiate de ce noyau avec l'éminence médiane laisse supposer l'existence d'un accès direct des hormones au ARH *via* simple diffusion depuis les capillaires fenêtrés du système porte.

Le tableau 2 présente une liste non exhaustive des hormones circulantes ayant une action dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal. Nous ne commenterons que celles dont les mécanismes de transport depuis le sang vers le cerveau ont été étudiés.

L'insuline est une hormone synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Ses récepteurs sont largement distribués dans le système nerveux central et notamment au niveau de l'hypothalamus où elle inhibe la prise alimentaire (Havrankova *et al.*, 1978). L'insuline a également des sites de liaison au niveau de l'endothélium de la BHE (Frank and Pardridge, 1981) et de l'épithélium des plexus choroïdes (Baskin *et al.*, 1986). Mais le rôle de ces sites reste confus : l'insuline peut être dégradée ou encore se lier à son récepteur pour influencer la fonction endothéliale et épithéliale. Des études suggèrent cependant que l'insuline pénètre dans le cerveau *via* un système de transport actif relayé par ses récepteurs (Pardridge *et al.*, 1995).

La ghréline est une autre hormone métabolique sécrétée par l'estomac (Kojima *et al.*, 1999; Tschop *et al.*, 2000). L'effet orexigène de cette hormone est relayé par le récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance-1a (GHSR-1a) (Inui, 2001). Ce récepteur est également exprimé au niveau de tous les noyaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Guan *et al.*, 1997) et produit des effets opposés à ceux de la leptine (Nakazato *et al.*, 2001; Shintani *et al.*, 2001). Des études suggèrent que la ghréline traverse la BHE par un

système complexe de transporteurs et que ce transport est modulé par la séquence primaire en acides aminés de la protéine elle-même (Banks *et al.*, 2002).

Le facteur de croissance insuline-like-1 (IGF-1) est une hormone synthétisée en grande partie par le foie et qui joue un rôle important dans les fonctions neuroendocrines dont la croissance et la fonction de reproduction (voir pour revue Daftary and Gore, 2005). Ses récepteurs sont localisés notamment au niveau du ARH (Garcia-Segura *et al.*, 1997). Des études montrent très clairement que l'IGF-1 traverse la BHE (Reinhardt and Bondy, 1994) par un système de transport saturable fortement influencé par la présence de protéines de liaison de l'IGF-1 (IGFBPs) dans la circulation sanguine (Pan and Kastin, 2000).

Les stéroïdes gonadiques sont connus pour exercer une rétroaction au niveau central dans le contrôle de la fonction de reproduction et sont également impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire. En effet, l'expression des récepteurs aux estrogènes (ER)- α et ER- β a notamment été démontrée pour les neurones à kisspeptine (Smith *et al.*, 2005), NPY et β -endorphine (Herbison, 1998) du ARH. En ce qui concerne leur accès au cerveau, bien que l'on retrouve des récepteurs aux estrogènes au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Stirone *et al.*, 2003) et des cellules épithéliales des plexus choroïdes (Hong-Goka and Chang, 2004), leur implication éventuelle dans des phénomènes de transport est peu probable. En effet, depuis quelques années, les estrogènes sont plutôt décrits pour leur influence sur la fonction cérébrovasculaire. Ils sont notamment impliqués dans des phénomènes de protection de l'endothélium, d'angiogénèse ou encore de régulation du tonus vasculaire (voir pour revue Krause *et al.*, 2006). Finalement, des études plus anciennes suggèrent que les hormones stéroïdiennes périphériques sont relativement liposolubles et donc capables de diffuser à travers la BHE (Pardridge and Mietus, 1979).

De façon intéressante, on retrouve des récepteurs à la prolactine dans le ARH mais aussi sur les neurones à NPY du DMH (Chen and Smith, 2004). La prolactine sécrétée par l'adénohypophyse exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre sécrétion en inhibant les neurones dopaminergiques du ARH (Hokfelt and Fuxe, 1972). La voie par laquelle la prolactine (sécrétée par l'adénohypophyse) pénètre dans le cerveau reste à déterminer précisément mais des travaux montrent l'existence d'un système de transport saturable (Walsh *et al.*, 1987). De plus la forte expression de ses récepteurs au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes laisse penser que la prolactine emprunte la voie du CSF pour atteindre ses cibles (Augustine *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 1978).

<u>Hormone</u>	<u>Lieu de synthèse</u>	<u>Principale cible</u>	<u>Transport</u>
Estrogènes	Ovaires	Inhibent la synthèse de GnRH via récepteurs dans l'ARH (Herbison, 1998; Smith <i>et al.</i> , 2005)	Liposolubles (Pardridge and Mietus, 1979)
Ghréline	Estomac	Oréxigène via récepteurs GHSR-1 dans l'ARH (Petersenn, 2002)	BHE (Banks <i>et al.</i> , 2002)
IGF-1	Foie	Facilite la libération de GnRH via récepteurs dans l'ARH (Garcia-Segura <i>et al.</i> , 1997)	BHE (Pan and Kastin, 2000)
Insuline	Pancréas	Anorexigène via récepteurs dans DMH, VMH et ARH (Havrankova <i>et al.</i> , 1978)	BHE (Pardridge <i>et al.</i> , 1995)
Leptine	Adipocytes	Anorexigène via récepteur ObRb dans le DMH, VMH et ARH (Caron <i>et al.</i> , 2009)	BHE et/ou PC (Banks <i>et al.</i> , 1996)
Peptide glucagon-like-1	Intestin, colon	Anorexigène via récepteurs dans l'ARH (Turton <i>et al.</i> , 1996)	Liposoluble (Kastin <i>et al.</i> , 2002)
Peptide YY	Tractus gastro-intestinal	Anorexigène via récepteur Y2 dans l'ARH (Batterham <i>et al.</i> , 2002)	Non décrit
Prolactine	Adénohypophyse	Inhibe sa propre sécrétion via récepteurs dans l'ARH (Hokfelt and Fuxe, 1972)	Transport saturable (Walsh <i>et al.</i> , 1987) peut-être via les plexus choroïdes

Tableau 1 : Hormones périphériques ayant une action dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.

TRANSPORT DE LA LEPTINE VERS LE SNC

Parmi toutes les hormones périphériques qui agissent au niveau hypothalamique, la leptine mérite une attention toute particulière. Cette adipokine de 16 kDa est une hormone anorexigène sécrétée par les adipocytes (Zhang *et al.*, 1994). Au niveau central, l'effet anorexigène de la leptine est relayé par la forme longue de son récepteur (ObRb) que l'on retrouve exprimé dans certaines populations neuronales de tous les noyaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire dont le DMH, VMH et ARH (Caron *et al.*, 2009). Le fait que les taux de leptine dans le LCR soient inférieurs aux taux de leptine circulante (Schwartz *et al.*, 1996) et la présence de ses récepteurs au niveau des différentes interfaces sang/cerveau, suggèrent l'existence d'un système de transport régulant son accès au SNC.

Transport de la leptine par la BHE et les plexus choroïdes

On retrouve une forme courte de son récepteur (ObRa) fortement exprimée au niveau des capillaires cérébraux (Bjorbaek *et al.*, 1998) et des cellules épithéliales des plexus choroïdes (Tartaglia *et al.*, 1995). De nombreuses études suggèrent l'implication de cette forme courte dans le transport de la leptine à travers la BHE et les plexus choroïdes (Hileman *et al.*, 2002) d'autant plus qu'il a été démontré que la leptine accède au cerveau *via* un système de transport saturable et unidirectionnel (Banks *et al.*, 1996). Cependant, même si les études montrent bien l'internalisation de la leptine suite à sa fixation sur son récepteur ObRa (Peiser *et al.*, 2000), rien n'indique que celui-ci soit bel et bien impliqué dans des phénomènes de transcytose et qu'il ne soit pas associé à des effets génomiques ou encore à la dégradation de cette leptine. Et ceci est d'autant plus probable que la leptine est associée à de nombreux effets vasculaires tels que l'angiogenèse, la régulation du tonus vasculaire ou encore l'inflammation (voir pour revue Zhang *et al.*, 2005). Enfin on ne peut pas exclure l'existence d'un transporteur de la leptine qui n'ait pas encore été identifié.

Transport de la leptine dans la région tubérale de l'hypothalamus

L'injection systémique de leptine radiomarquée et l'observation de sa diffusion au cours du temps, montrent que la leptine s'accumule plus rapidement dans l'éminence médiane et le ARH comparativement aux autres noyaux hypothalamiques (Banks *et al.*, 1996). Ces données suggèrent donc l'existence d'un mécanisme différent (ou encore complémentaire de la BHE et des plexus choroïdes) pour l'accès de la leptine dans le ARH. Les auteurs mentionnent notamment la proximité entre le ARH et l'éminence médiane. Ainsi la leptine

présente dans le sang porte, pénètre dans l'éminence médiane et atteindrait le ARH par simple diffusion depuis les capillaires fenêtrés. Mais cette hypothèse reste à vérifier.

Pour conclure, bien que des phénomènes de transport saturable aient été décrits pour la majorité des hormones périphériques ayant une action au niveau cérébral, la possibilité d'un accès par simple diffusion depuis les capillaires fenêtrés de l'éminence médiane (en particulier pour le ARH) n'est pas à exclure.

2. Communication cerveau → sang : neurosécrétion

Les neurohormones sont synthétisées au niveau des corps cellulaires des neurones hypophysiotropes qui envoient leurs axones dans l'éminence médiane. La présence de capillaires fenêtrés dans l'éminence médiane rend possible la libération de ces neurohormones directement dans le système porte sans pour autant compromettre l'intégrité de la BHE. De nombreux neurones hypothalamiques envoient des projections dans l'éminence médiane :

- les neurones à gonadolibérine (GnRH) de l'aire préoptique
- les neurones à thyrolibérine (TRH) et à corticolibérine (CRH) du noyau paraventriculaire
- les neurones à somatostatine du noyau périventriculaire
- les neurones à somatolibérine (GHRH) et à dopamine du ARH

L'ensemble de ces projections neuronales forme les fibres tubéroinfundibulaires qui se projettent au contact des capillaires fenêtrés du système porte. Ces neurohormones sont ensuite transportées par le système porte et induisent la synthèse de l'hormone de stimulation des follicules (FSH), l'hormone lutéinisante (LH), la thyrostimuline (TSH), l'hormone corticotrope (ACTH), la prolactine (PRL) et l'hormone de croissance (GH) par les cellules glandulaires de l'adénohypophyse.

En plus, les neurones à arginine vasopressine (AVP) et à ocytocine (OXY) du noyau paraventriculaire forment le faisceau hypothalamo-posthypophysaire qui traverse l'éminence médiane pour atteindre le lobe neural de l'hypophyse où ils déversent leur sécrétion directement dans les vaisseaux sanguins.

Des études ultrastructurales suggèrent également l'existence de neurones contactant directement le LCR *via* leur terminaison axonales et donc une possible sécrétion des neurohormones dans le LCR (Vigh and Vigh-Teichmann, 1998). En accord avec cette hypothèse, les auteurs ont noté la présence de certaines neurohormones dans le LCR telles que la TRH et la GnRH (Joseph *et al.*, 1975). Finalement, ces mêmes auteurs mettent également

en avant le rôle des tanocytes de l'éminence médiane dans le transport de substances depuis le LCR vers le système porte (voir chapitre 3).

Bien que de les données indiquent que de nombreux échanges entre le sang et le cerveau s'effectuent sous le contrôle de la BHE et/ou des plexus choroïdes, l'éminence médiane de l'hypothalamus semble également pouvoir jouer un rôle important. Les auteurs mettent notamment en avant le rôle des tanocytes de l'éminence médiane en tant que cellules liant le LCR aux événements neuroendocrines propres à l'hypothalamus. C'est ce que nous allons voir en détail dans le chapitre suivant.

Chapitre 3. LES TANYCYTES DE L'ÉMINENCE MÉDIANE

Les tanycytes de l'éminence médiane ont été décrits pour la première fois en 1954 comme des cellules épendymogliales bipolaires allongées bordant le plancher du troisième ventricule. Du corps cellulaire localisé dans la paroi ventriculaire émane un long et fin prolongement qui projette vers de discrètes régions hypothalamiques dont le système porte hypothalamo-hypophysaire (Horstmann, 1954). De part cette forme particulière, il est alors tentant de penser que les tanycytes assurent le lien entre le LCR et certains événements neuroendocrines propres à l'hypothalamus. Cependant, même si de nombreuses publications sont parues sur les tanycytes ces 50 dernières années, leur rôle encore non élucidé reste sujet à controverse (voir pour revue Rodriguez *et al.*, 2005).

I. Définition et sous populations

1. Localisation

Dans l'hypothalamus, deux types cellulaires forment la paroi du troisième ventricule (Flament-Durand and Brion, 1985) :

- Les cellules épendymaires qui sont de grosses cellules cubiques possédant un noyau central proéminent et un abondant cytoplasme. Elles portent à leur apex de nombreux cils dont les battements facilitent la circulation du LCR dans les cavités ventriculaires.
- Les tanycytes qui sont des cellules au corps cellulaire allongé et possèdent un noyau occupant la quasi totalité du cytoplasme. Elles portent à leur apex de nombreuses microvillosités et protrusions qui augmentent considérablement leur surface de contact avec le LCR. Contrairement aux cellules épendymaires, les tanycytes possèdent rarement des cils. Leur principale caractéristique est la présence au niveau du pôle basal d'un long et fin prolongement qui pénètre dans le tissu sous-jacent.

Dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal, les cellules épendymaires ciliées forment la partie dorsale du ventricule. A mesure que l'on progresse vers la partie ventrale, les cellules épendymaires sont progressivement remplacées par les tanycytes : c'est la zone de transition. Et finalement la partie ventrale du ventricule est constituée uniquement de tanycytes qui forment ainsi les parois baso-latérales du troisième ventricule (Millhouse, 1975) (Figure 4).

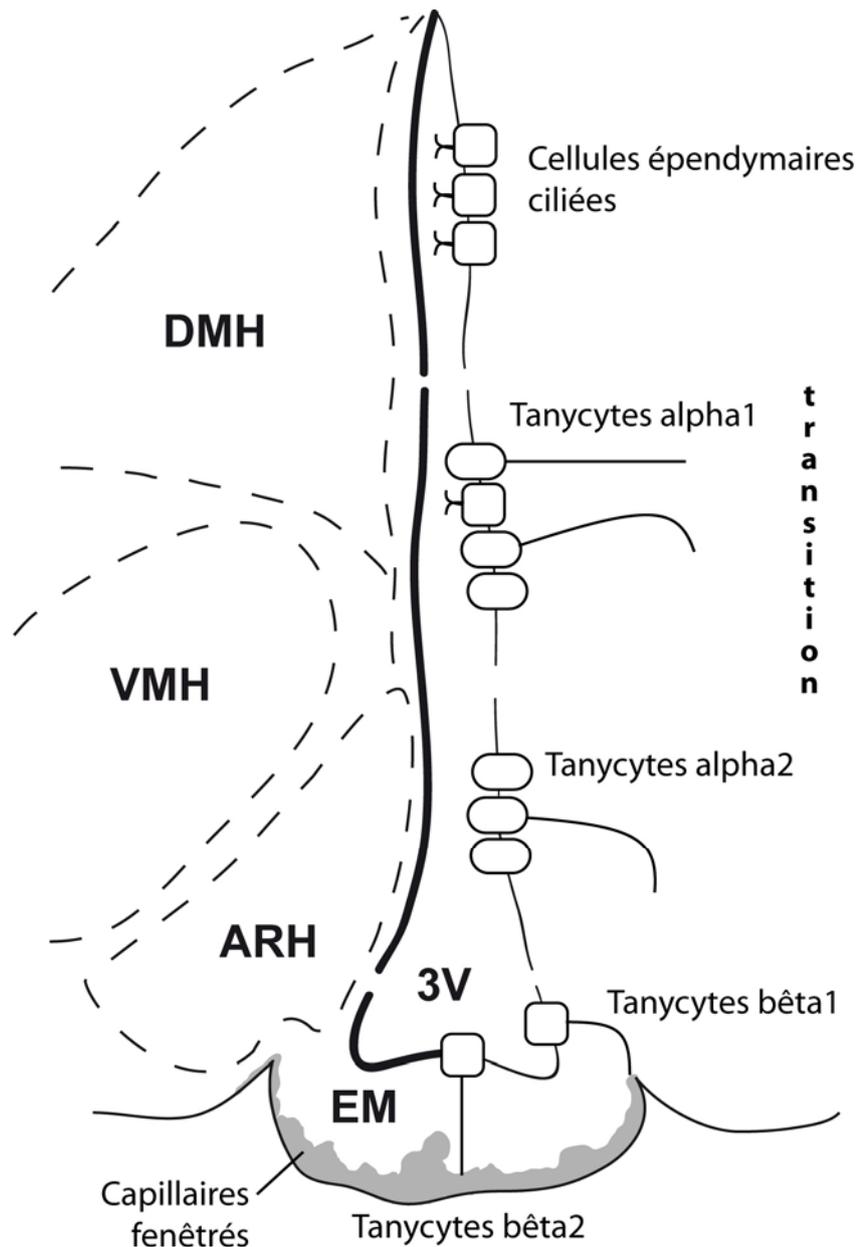


Figure 4 : Schéma simplifié de l'organisation des tanocytes dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.

Selon un axe dorsoventral, la paroi ventriculaire est formée de cellules épendymaire ciliées qui disparaissent progressivement dans la zone de transition pour ne laisser que des tanocytes au niveau du ARH et de l'EM. Les tanocytes sont des cellules épendymogliales particulières dont le corps cellulaire borde le troisième ventricule et qui émettent un prolongement unique dans le parenchyme adjacent. Il existe quatre sous-populations de tanocytes qui se distinguent entre autre par leur localisation au niveau de la paroi ventriculaire et leur projection dans le parenchyme. *3V*, troisième ventricule ; *ARH*, noyau arqué hypothalamique ; *DMH*, noyau dorsomédian hypothalamique ; *EM*, éminence médiane ; *VMH*, noyau ventromédian hypothalamique.

2. Origine

La forme si particulière des tanycytes, c'est à dire un corps cellulaire bordant le ventricule et un prolongement qui pénètre dans le tissu, n'est pas sans rappeler la forme des cellules de la glie radiaire. En effet, les tanycytes ont de nombreux points communs avec ce type cellulaire notamment concernant l'expression de nombreuses protéines (Tableau 2). En plus de ces protéines communes aux deux types cellulaires, les tanycytes possèdent tout comme les cellules de la glie radiaire des propriétés de cellules souches. En effet, des injections de BrdU montrent que les tanycytes sont capables de se diviser à l'âge adulte et de former *in vitro* des neurosphères pouvant générer des neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Allet, 2006; Bennett *et al.*, 2009).

Cependant, les tanycytes possèdent également des propriétés qui les distinguent clairement des cellules radiaires. Tout d'abord, les tanycytes se différencient bien plus tard dans le développement et perdurent au cours de la vie adulte. L'utilisation de thymidine tritiée a permis de montrer que la majorité des tanycytes se différencient au cours de la première semaine de vie post-natale chez le rat (Altman and Bayer, 1978; Altman and Bayer, 1986). Les tanycytes expriment également de nombreuses protéines qui ne le sont pas dans la glie radiaire (Tableau 2). Tous ces éléments semblent indiquer que les tanycytes sont sous un contrôle différent et possèdent une fonction différente des cellules de la glie radiaire.

Il faut également noter que les tanycytes expriment de nombreuses protéines connues pour être des marqueurs d'astrocytes matures (Tableau 2). Tous ces éléments amènent donc à la conclusion que les tanycytes pourraient être considérés comme des cellules descendant de la glie radiaire. Pendant le développement périnatal, les cellules de la glie radiaire deviennent majoritairement des astrocytes, alors que vraisemblablement une sous-population d'entre elles se différencierait en tanycytes.

3. Les tanycytes : une population hétérogène

Les tanycytes ne forment pas une population homogène. Chez le rat, 4 types de tanycytes ont été décrits : les tanycytes α_1 , α_2 , β_1 et β_2 (Akmayev and Fidelina, 1976; Akmayev *et al.*, 1973; Akmayev and Popov, 1977). Ils présentent des caractéristiques différentes quant à leur localisation, projection, morphologie, cytochimie et certainement quant à leur fonction (Figure 4).

i) Les tanocytes alpha

Les tanocytes $\alpha 1$ bordent le ventricule situé face au VMH et à une partie du DMH. Ils envoient leurs prolongements dans le DMH selon une trajectoire latérale et dans le VMH selon une trajectoire dorso-latérale. Les tanocytes $\alpha 2$ bordent le ventricule situé face au ARH. La plupart d'entre eux envoient leurs prolongements dans ce même noyau selon une trajectoire latéro-ventrale, bien que quelques uns d'entre eux terminent leur course au contact de la partie latérale du sillon tubéroinfundibulaire (Millhouse, 1975).

La partie distale des prolongements des tanocytes α , aussi appelée pied tanocytaire, se termine en une ou plusieurs dilatations qui contactent les capillaires sanguins de la BHE de l'hypothalamus médio-basal. Des auteurs mentionnent l'existence de contacts entre certains pieds tanocytaires et les neurones des noyaux hypothalamiques adjacents (Rodriguez *et al.*, 1979) mais ce fait est discuté par d'autres (Millhouse, 1975). Récemment une étude a démontré l'existence de contacts entre les tanocytes $\alpha 2$ et les neurones à NPY/AgRP du noyau arqué (Coppola *et al.*, 2007).

ii) Les tanocytes bêta

Les tanocytes $\beta 1$ bordent les évaginations latérales du renforcement infundibulaire. Ils envoient leurs prolongements selon une trajectoire courbe latéro-ventrale dans la région externe latérale de l'éminence médiane et terminent leur course au contact des capillaires du système porte. Les tanocytes $\beta 2$ bordent le plancher du renforcement infundibulaire. Ils envoient leurs prolongements selon une trajectoire rectiligne au contact des capillaires fenêtrés situés dans la zone médiane de l'éminence médiane (Millhouse, 1975).

A l'heure actuelle, aucun contact n'a été décrit entre tanocytes β et neurones.

Protéines communes aux tanycytes et cellules de la glie radiaire

GFAP	(Basco <i>et al.</i> , 1981)
Vimentine	(Kameda <i>et al.</i> , 2003)
Nestine	(Wei <i>et al.</i> , 2002)
Transporteurs du glutamate GLAST et GLT-1	(Berger and Hediger, 2001)
Récepteur 1b du GABA	(Poorkhalkali <i>et al.</i> , 2000)
Protéine précurseur de l'amyloïde	(Chauvet <i>et al.</i> , 1997)

RéférencesProtéines communes aux tanycytes et astrocytes

GFAP	(Basco <i>et al.</i> , 1981)
S-100	(Gudino-Cabrera and Nieto-Sampedro, 2000)
GLAST	(Berger and Hediger, 2001)
Aquaporine-9	(Elkjaer <i>et al.</i> , 2000)
Plectine	(Errante <i>et al.</i> , 1994)
Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)	(Ma <i>et al.</i> , 1994)

RéférencesAutres protéines exprimées par les tanycytes

DARPP-32	(Meister <i>et al.</i> , 1988)
P85	(Blazquez <i>et al.</i> , 2002)
β -adducine	(Gotoh <i>et al.</i> , 2008)
ZO-1	(Petrov <i>et al.</i> , 1994; Smith and Shine, 1992)
GPR50	(Sidibe, Mullier <i>et al.</i> , 2010 <i>in press</i>)
Récepteur de l'IGF-I	(Garcia-Segura <i>et al.</i> , 1997)
Récepteur α aux estrogènes	(Langub and Watson, 1992)
Récepteur de la somatostatine sst2(a)	(Hashemi <i>et al.</i> , 2001)
Récepteur de la thyroïdostimuline (TSHR)	(Nakao <i>et al.</i> , 2008)
Récepteur TGF β 1	(Prevot <i>et al.</i> , 2000)
Récepteur des μ -opioïdes	(Beauvillain <i>et al.</i> , 1992)
Récepteur de la prolactine	(Lerant and Freeman, 1998)
Transporteur du glucose GLUT-1	(Garcia <i>et al.</i> , 2001)
Transporteur du glucose GLUT-2	(Garcia <i>et al.</i> , 2003)
Transporteur d'hormones thyroïdiennes OTP1c1	(Nakao <i>et al.</i> , 2006)
Transporteur monocarboxylate 8 (MCT8)	(Herwig <i>et al.</i> , 2009)
Déiodinases de type 2 et de type 3	(Tu <i>et al.</i> , 1997)
5 α -réductase	(Pelletier <i>et al.</i> , 1994)
Peptidase pyroglutamyle II	(Sanchez <i>et al.</i> , 2009)
Facteur de régulation de l'AMPcyclique (CREB)	(Fekete <i>et al.</i> , 2000)
Kir6.1 et Kir6.2 (sous-unités de canaux potassiques ATP dépendants)	(Thomzig <i>et al.</i> , 2005)

Références**Tableau 2 : Exemples de protéines exprimées par les tanycytes.**

II. Rôle des tanycytes dans le maintien de l'homéostasie

1. Homéostasie énergétique

i) Tanycytes et métabolisme glucidique

Les transporteurs de glucose jouent un rôle essentiel dans l'apport du glucose depuis le sang vers le cerveau. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, GLUT-1 est exprimé de façon abondante au niveau des cellules endothéliales de la BHE et des cellules épithéliales des plexus choroïdes. De façon intéressante, GLUT-1 est également exprimé très fortement au niveau des tanycytes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et très faiblement au niveau des tanycytes $\beta 2$ (Garcia *et al.*, 2001; Peruzzo *et al.*, 2000) mais la fonction exacte ainsi que les raisons de l'expression différentielle de ce transporteur au niveau des tanycytes restent à élucider.

D'autres études plus récentes montrent que les tanycytes expriment le transporteur de glucose GLUT-2 (Garcia *et al.*, 2003) ainsi que certaines sous-unités de canaux potassiques ATP-dépendants (Thomzig *et al.*, 2005; Thomzig *et al.*, 2001). Or il a été démontré auparavant que GLUT-2 associé aux canaux potassiques ATP-dépendants est fortement impliqués dans les mécanismes de détection du glucose par les cellules β des îlots pancréatiques (Guillam *et al.*, 1997), suggérant ainsi que les tanycytes seraient impliqués dans les mécanismes de détection du glucose au niveau hypothalamique. GLUT-2 étant exprimé au niveau des corps cellulaires (Garcia *et al.*, 2003) et étant donné qu'il existe une corrélation entre les taux de glucose plasmatiques et ceux du LCR (Ono *et al.*, 1983; Steffens *et al.*, 1988), les tanycytes pourraient indirectement servir de relais entre les taux de glucose sanguins et les noyaux impliqués dans l'énergie homéostatique.

ii) Autres données

Des expériences d'hybridation *in situ* suggèrent fortement que les tanycytes expriment le récepteur orphelin couplé aux protéines G de la mélatonine GPR50 (Drew *et al.*, 2001). De façon intéressante, les souris invalidées pour le gène codant la protéine GPR50 montrent une résistance à la prise de poids lorsqu'elles sont soumises à un régime gras (Ivanova *et al.*, 2008) et des études génétiques menées chez l'Homme montrent que GPR50 pourrait être impliqué dans la régulation du métabolisme lipidique (Bhattacharyya *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données suggère fortement que GPR50 et donc les tanycytes puissent être impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Enfin, des études montrent que l'expression de certains composés retrouvés dans les tanycytes varie en fonction du statut énergétique de l'animal. C'est le cas notamment pour

l'expression du gène codant la protéine GPR50 (Ivanova *et al.*, 2008), mais aussi pour d'autres protéines telles que la déiodinase de type II dont l'activité enzymatique est augmentée lorsque l'animal est mis à jeun (Coppola *et al.*, 2005), ou encore la β -adducine, protéine du cytosquelette dont la forme phosphorylée augmente lorsque l'animal est mis à jeun pendant 48h (Gotoh *et al.*, 2008). Ces données ont conduit les différents auteurs à suggérer que les tanycytes pourraient être impliqués dans le relais des informations présentes dans le plasma et/ou le LCR vers les noyaux hypothalamiques. Dans ce sens, une étude récente a notamment permis de démontrer que les tanycytes sont capables d'influer sur l'activité des neurones à NPY/AgRP du ARH en produisant localement de la triiodothyronine (T3) (Coppola *et al.*, 2007).

2. Fonction de reproduction

i) Tanycytes et gonadolibérine (GnRH)

Contrairement aux autres neurones hypophysiotropes, les neurones à GnRH contactent très rarement les vaisseaux fenêtrés du système porte hypothalamo-hypophysaire. A l'échelle ultrastructurale, les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH sont généralement séparées de l'espace péricapillaire par des prolongements gliaux appartenant principalement aux tanycytes (Kozlowski and Coates, 1985). Des études récentes ont permis de montrer que chez la ratte adulte en diestrus, c'est-à-dire lorsque la sécrétion de GnRH est très faible, la plupart des terminaisons nerveuses sont séparées de l'espace péricapillaire par les pieds tanycytaires qui empêchent ainsi l'accès des neurones à GnRH aux capillaires fenêtrés du système porte. Au moment du pic pré-ovulatoire de GnRH, il se produit un remodellement morphologique dans la zone externe de l'éminence médiane permettant la formation de contacts neurovasculaires entre les neurones à GnRH et les capillaires fenêtrés du système porte (Prevot *et al.*, 1999). En plus de ces données morphologiques, il a été démontré que les tanycytes expriment le récepteur α aux oestrogènes (Langub and Watson, 1992), ce qui laisse supposer que les tanycytes pourraient être impliqués dans l'intégration des signaux humoraux afin d'influencer l'activité des neurones à GnRH.

La dissection des mécanismes moléculaires impliqués dans le remodellement morphologique des tanycytes a permis de montrer l'implication des récepteurs à tyrosine kinase de la famille erbB déjà connus pour leur implication dans les mécanismes de régulation du contrôle de l'activité des neurones à GnRH par les astrocytes (voir pour revue Ojeda *et al.*, 2008). Les tanycytes expriment *in vivo* les récepteurs erbB-1 et erbB-2 (Ma *et al.*, 1994). Des

études *in vitro* montrent que les tanocytes répondent au TGF α *via* son récepteur erbB1 qui s'hétérodimérise avec erbB2. La transduction de ce signal conduit à la synthèse de PGE₂ et TGF β ₁ (Prevot *et al.*, 2003). Des études morphométriques ont permis de démontrer *in vitro* que le TGF β ₁ induit la rétraction des prolongements tanocytaires par remodelage du cytosquelette alors que le TGF α induit la pousse des prolongements tanocytaires. De plus, une exposition prolongée des tanocytes au TGF α provoque une rétraction des prolongements *via* la synthèse de TGF β ₁ (Prevot *et al.*, 2003).

ii) Autres données

L'IGF-1 est un facteur de croissance impliqué dans de nombreuses fonctions neuroendocrines dont la fonction de reproduction. Des études montrent notamment que l'IGF-1 agit au niveau des corps cellulaires des neurones à GnRH pour moduler la synthèse de GnRH et au niveau de l'éminence médiane pour moduler la libération de GnRH par les terminaisons nerveuses des neurones (voir pour revue Daftary and Gore, 2005). Au niveau de l'hypothalamus médiobasal, l'IGF-1 est détecté dans les tanocytes (Duenas *et al.*, 1994). Cependant les tanocytes ne synthétisent pas ce facteur de croissance mais possèdent son récepteur (Garcia-Segura *et al.*, 1997) et la protéine de liaison de l'IGF-1 (IGFBP)-2 (Cardona-Gomez *et al.*, 2000). La quantité d'IGF-1 incorporée par les tanocytes est dépendante du sexe avec un pic d'immunoréactivité pour IGF-1 au moment de la puberté. Les auteurs ont également observé que les taux d'IGF-1 fluctuent avec les différentes phases du cycle oestral chez la ratte (Duenas *et al.*, 1994). De plus, les hormones ovariennes affectent très certainement les taux d'IGF-1 dans les tanocytes *via* la régulation à la fois du récepteur de l'IGF-1 et de l'IGFBP-2 au niveau de la membrane tanocyttaire (Cardona-Gomez *et al.*, 2000). Cependant la façon dont agit l'IGF-1 incorporé par les tanocytes sous l'influence des estrogènes pour moduler l'activité des neurones à GnRH est inconnue.

D'autres protéines exprimées par les tanocytes voient leur expression varier au cours du cycle œstral chez la femelle. C'est le cas notamment de la GFAP (Garcia-Segura *et al.*, 1994). Enfin, les tanocytes possèdent des enzymes impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes telle que la 5 α -réductase suggérant ainsi qu'ils joueraient un rôle dans la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone et dans la conversion de la progestérone en dihydroprogestérone (Pelletier *et al.*, 1994).

3. Rythmes saisonniers

Vu le rôle des tanocytes dans le métabolisme énergétique et la fonction de reproduction, il n'est pas étonnant de voir leur implication dans le contrôle des rythmes saisonniers. Tous les éléments requis pour la transduction du signal photopériodique sont exprimés dans l'hypothalamus médiobasal. Les auteurs ont montré que la photopériode module le métabolisme des hormones thyroïdiennes et que les concentrations locales en T3 dans l'hypothalamus médiobasal sont responsables des changements physiologiques saisonniers. En effet, lorsque les jours sont longs, les tanocytes expriment la déiodinase de type 2 qui permet la conversion de la thyroxine (T4) en sa forme bioactive la T3. A l'inverse, lorsque les jours sont courts, les tanocytes expriment préférentiellement la déiodinase de type 3 qui métabolise T4 et T3 en T3 reverse et T2 respectivement. Ces travaux ont été menés chez le hamster (Herwig *et al.*, 2009) et la caille (Yasuo *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 2003), mais les mêmes enzymes sont également exprimées par les tanocytes chez le rat (Tu *et al.*, 1997) indiquant une forte conservation au cours de l'évolution. Les tanocytes sont donc impliqués dans la modulation des concentrations locales en hormones thyroïdiennes et donc dans la transduction du signal photopériodique.

En plus de ces données, l'expression de nombreux gènes montre une variation saisonnière dans les tanocytes. C'est le cas notamment de GPR50 (Barrett *et al.*, 2006), du transporteur d'hormones thyroïdiennes monocarboxylate 8 (MCT8) (Herwig *et al.*, 2009) et de la protéine du cytosquelette vimentine (Kameda *et al.*, 2003).

III. Les tanocytes en tant qu'interface sang / cerveau

1. Rôle dans le transport

Comme nous l'avons vu précédemment, les tanocytes ont majoritairement la même forme particulière avec un pôle apical au contact du LCR et un pôle basal qui contacte les capillaires sanguins. Ils apparaissent donc de par cette forme comme des cellules polarisées dont un des principaux rôles semble être la transduction de signaux. La majorité des études se sont intéressées aux tanocytes β du fait de leur lien avec les capillaires fenêtrés et les auteurs ont postulé qu'ils pourraient être impliqués dans le transport de molécules entre le LCR et le sang porte. Cependant le fait que des substances puissent être transportées par les tanocytes reste à l'heure actuelle un sujet de débat et de controverse (voir pour revue Rodriguez *et al.*, 2005).

i) Evidences en faveur de l'existence de phénomènes d'endocytose et de transcytose au sein des tanocytes

Les nombreuses études ultrastructurales menées sur les tanocytes suggèrent leur rôle dans le transport de molécules. Les tanocytes possèdent notamment un réticulum endoplasmique très développé, de nombreuses mitochondries, de nombreux microtubules et tous les composants de la machinerie d'endocytose : vésicules recouvertes de clathrines, endosomes précoces et tardifs, lysosomes (Akmayev and Popov, 1977; Rodriguez *et al.*, 1979). En parallèle, l'utilisation de différents traceurs compatibles avec la microscopie électronique a permis de mettre en évidence certaines capacités d'absorption des tanocytes. C'est le cas de la peroxydase de Raifort (HRP) qui après injection dans le ventricule (Wagner and Pilgrim, 1974) ou dans la circulation (Nakai and Naito, 1975) est retrouvée dans des vésicules de pinocytose à l'intérieur des tanocytes. Cependant même si l'absorption de molécules présentes dans le LCR est maintenant largement admise, la capacité des tanocytes à absorber des molécules présentes dans la circulation sanguine est constamment remise en question (Peruzzo *et al.*, 2004).

Plus récemment les techniques d'immunohistochimie ont permis de mettre en évidence l'expression différentielle de protéines impliquées dans les phénomènes d'endocytose et de transcytose au niveau des tanocytes. La cavéoline-1, principal composant de la voie de l'endocytose médiée par les cavéoles, est exprimée uniquement par les tanocytes β : au niveau du pôle apical, des prolongements et des pieds pour les tanocytes β_2 , alors qu'elle n'est retrouvée qu'au niveau des pieds pour les tanocytes β_1 . La clathrine, composant clef de la voie de l'endocytose médiée par récepteurs, est exprimée au niveau de tous les tanocytes avec une distribution sur toute la cellule pour les tanocytes α , un marquage au niveau des pieds tanocytaires qui disparaît progressivement au sein des tanocytes β_1 puis complètement pour les tanocytes β_2 . La protéine Rab4, impliquée dans les phénomènes d'endocytose et de transport des protéines synthétisées, est exprimée uniquement par les tanocytes β_2 au niveau de la base des prolongements et des pieds tanocytaires (Peruzzo *et al.*, 2004). Toutes ces données suggèrent que les divers types de tanocytes utilisent des mécanismes différents pour l'internalisation de molécules.

ii) Exemples de molécules endocytées par les tanocytes

Les phénomènes d'endocytose sont souvent liés à l'existence de récepteurs. Or de nombreux récepteurs membranaires sont exprimés par les tanocytes (Tableau 2).

L'IGF-1 est un exemple qui mérite notre attention : les tanocytes possèdent son récepteur (Cardona-Gomez *et al.*, 2000) et contiennent de l'IGF-1 mais n'expriment pas son ARN messager (Fernandez-Galaz *et al.*, 1997) indiquant ainsi que le peptide n'est pas synthétisé mais absorbé par les tanocytes. A l'échelle ultrastructurale, les récepteurs de l'IGF-1 sont localisés au niveau du corps cellulaire des tanocytes (Cardona-Gomez *et al.*, 2000). De plus, l'IGF-1 administré dans le LCR est internalisé par les tanocytes (Fernandez-Galaz *et al.*, 1996). Cependant, le fait que l'IGF-1 puisse être transporté par les tanocytes puis relâché dans l'espace porte n'a pas été démontré.

D'autres molécules ont également été détectées dans les tanocytes telles que la GnRH (Skinner *et al.*, 1995), la GHRH (Carretero *et al.*, 2002) et l' α -MSH (Chiba, 2001) ; ou encore sont endocytées par les tanocytes après injection dans le ventricule comme la β -endorphine (Bjelke and Fuxe, 1993) et la GnRH (Goldgefter, 1976). Mais la présence de leurs récepteurs respectifs et l'existence d'un transport à travers la cellule restent encore à prouver.

Finalement bien que de nombreux arguments aillent dans ce sens, l'existence de phénomènes de transcytose au niveau des tanocytes n'a jamais été démontrée. Lors de la transcytose, le ligand ne s'arrête pas dans la cellule mais la traverse, la transcytose nécessite donc obligatoirement une polarisation de la cellule. De façon intéressante la présence de cellules polarisées est une caractéristique que l'on retrouve au niveau des barrières des interfaces sang/cerveau (voir chapitre 1).

2. Propriétés de barrière des tanocytes

i) Barrière de diffusion

De nombreux auteurs ont pu mettre en évidence les propriétés de barrière des tanocytes face à la diffusion des molécules injectées dans le sang ou dans le LCR. Parmi tous les traceurs existants, c'est la HRP qui a été le plus couramment utilisé. Les données montrent que l'injection de HRP dans la circulation sanguine pénètre l'éminence médiane *via* les fenestrations des capillaires portes. Cependant, selon les protocoles utilisés, soit la HRP reste confinée dans l'éminence médiane (Brightman *et al.*, 1975), soit la HRP diffuse largement au-delà de l'éminence médiane et inonde le ARH adjacent (Broadwell and Brightman, 1976). Inversement, l'injection de HRP directement dans le ventricule diffuse dans le parenchyme cérébral à l'exception de l'éminence médiane qui n'est pas inondée par le traceur (Brightman *et al.*, 1975).

ii) Les jonctions serrées

De nombreuses études ultrastructurales mentionnent la présence de jonctions entre les tanycytes avec cependant des différences pour les différents sous-types. Les tanycytes α sont joints latéralement par des jonctions adhérentes mais jamais de jonctions serrées n'ont été décrites au niveau de leurs corps cellulaires. Certains auteurs mentionnent cependant la présence de jonctions serrées au niveau des prolongements (Krisch and Leonhardt, 1978). Les tanycytes β_1 sont joints entre eux par de nombreux desmosomes et jonctions adhérentes localisés sur toute la surface de la cellule. Mais les auteurs ne mentionnent pas la présence de jonctions serrées (Rodriguez *et al.*, 1979). Les tanycytes β_2 sont joints quant à eux au niveau de leurs corps cellulaires par des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. Aucune jonction n'a été observée au niveau de leurs prolongements (Brightman and Reese, 1969; Flament-Durand and Brion, 1985).

Au niveau protéique, seule la protéine intracellulaire ZO-1 a été décrite au niveau des corps cellulaires des tanycytes β , et aucune immunoréactivité n'est mentionnée au niveau des prolongements des tanycytes α (Petrov *et al.*, 1994; Smith and Shine, 1992). Cependant, bien que la présence de la protéine ZO-1 soit considérée comme un indicateur d'étanchéité des barrières, ceci pourrait très bien être incorrect puisque ZO-1 est également exprimée au niveau de l'endothélium fenêtré des plexus choroïdes qui, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, est perméable aux macromolécules (Vorbrodts and Dobrogowska, 2003). A part ces données, la nature moléculaire des jonctions serrées au niveau des tanycytes n'est pas connue à ce jour.

Les tanycytes de l'éminence médiane sont idéalement placés pour éventuellement jouer un rôle dans la régulation des échanges entre le système porte et le LCR et lier ainsi le LCR aux évènements neuroendocrines de l'hypothalamus. Cependant, bien que de nombreuses études portent sur leur morphologie, caractérisation enzymatique ou encore leur éventuel rôle dans le transport de substances entre le sang et le LCR, leur fonction exacte reste relativement obscure.

Au cours de cette introduction, nous avons mis en évidence le rôle important des interfaces sang/cerveau dans le maintien de l'homéostasie cérébrale. La présence de jonctions serrées est une caractéristique importante de ces barrières. Elles sont directement responsables de la mise en place d'un système complexe de régulation des échanges entre le SNC et le compartiment sanguin indispensable au bon fonctionnement cérébral. Nous nous sommes intéressés à l'éminence médiane de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal en tant qu'interface entre le sang, le LCR et l'hypothalamus. Bien que dans la littérature il soit communément admis que l'éminence médiane constitue une « porte ouverte » pour l'accès des molécules circulantes au cerveau, les données morphologiques indiquent la présence de jonctions serrées au niveau des tanocytes de l'éminence médiane. Ces données suggèrent ainsi un rôle majeur des tanocytes (en tant qu'interface sang/LCR) dans le contrôle des échanges entre le sang et le SNC.

Lors de ce travail de thèse, nous avons cherché à poser les bases anatomiques de cette interface tripartite et nous sommes intéressés aux tanocytes de l'éminence médiane. Nous avons tenté d'éclaircir le rôle des tanocytes dans la transduction des signaux entre le système porte, le LCR et l'hypothalamus. Des données bibliographiques ont indiqué la présence de jonctions serrées entre ces cellules mais leur nature moléculaire est à ce jour inconnue.

Dans ce contexte, les objectifs de la thèse ont été les suivants :

- Déterminer la nature moléculaire des jonctions serrées au niveau des tanocytes de l'éminence médiane de l'hypothalamus.
- Evaluer la conservation entre les espèces.

Distribution différentielle des protéines de jonctions serrées au niveau des tanocytes de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal chez la souris adulte.

Notre premier objectif a été de déterminer la nature moléculaire des jonctions serrées au niveau des tanocytes de l'éminence médiane. Pour ce faire, nous avons tiré parti de toutes les données moléculaires accumulées ces dernières années, et avons tenté de localiser par des techniques d'immunohistochimie la présence de protéines connues pour leur implication au niveau des jonctions serrées de la BHE et/ou des plexus choroïdes. En parallèle l'injection de traceurs, soit dans la circulation - soit dans le LCR, nous a permis d'évaluer l'étanchéité de ces jonctions serrées.

L'ensemble de ces données fait l'objet d'un article accepté dans le *Journal of Comparative Neurology*.

Differential Distribution of Tight Junction Proteins Suggests a Role for Tanycytes in Blood-Hypothalamus Barrier Regulation in the Adult Mouse Brain

Amandine Mullier,^{1,2} Sebastien G. Bouret,^{1,2,3} Vincent Prevot,^{1,2*} and Bénédicte Dehouck^{1,2}

¹Jean-Pierre Aubert Research Center, Development and Plasticity of the Postnatal Brain, Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U837, Lille Cedex, 59045, France

²Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique, Faculté de Médecine, Université Lille Nord de France, Place de Verdun, 59046 Lille Cedex, France

³The Saban Research Institute, Neuroscience Program, Children's Hospital of Los Angeles, University of Southern California, Los Angeles, California 90027

ABSTRACT

The median eminence is one of the seven so-called circumventricular organs. It is located in the basal hypothalamus, ventral to the third ventricle and adjacent to the arcuate nucleus. This structure characteristically contains a rich capillary plexus and features a fenestrated endothelium, making it a direct target of blood-borne molecules. The median eminence also contains highly specialized ependymal cells called tanycytes, which line the floor of the third ventricle. It has been hypothesized that one of the functions of these cells is to create a barrier that prevents substances in the portal capillary spaces from entering the brain. In this paper, we report on our use of immunohistochemistry to study the expression of tight junction proteins in the cells that compose the median eminence in adult mice. Our results indicate that tanycytes of the median eminence express occludin, ZO-1, and claudin 1 and

5, but not claudin 3. Remarkably, these molecules are organized as a continuous belt around the cell bodies of the tanycytes that line the ventral part of the third ventricle. In contrast, the tanycytes at the periphery of the arcuate nucleus do not express claudin 1 and instead exhibit a disorganized expression pattern of occludin, ZO-1, and claudin 5. Consistent with these observations, permeability studies using peripheral or central injections of Evans blue dye show that only the tanycytes of the median eminence are joined at their apices by functional tight junctions, whereas tanycytes located at the level of the arcuate nucleus form a permeable layer. In conclusion, this study reveals a unique expression pattern of tight junction proteins in hypothalamic tanycytes, which yields new insights into their barrier properties. *J. Comp. Neurol.* 518: 000–000, 2010.

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

INDEXING TERMS: ependymocytes; occluding; ZO-1; claudin; arcuate nucleus of the hypothalamus; immunohistochemistry

Tight junctions are the structural component of barriers in epithelial and endothelial sheets that control exchanges between two adjacent compositionally distinct compartments. They consist of molecular complexes that mediate the adhesion between adjacent cells while preventing the free passage of ions and molecules through the paracellular pathway. Tight junction proteins also play an important role in the establishment and maintenance of cell apico-basal polarity by restricting the diffusion of apical and basolateral membrane components. This polarity provides the necessary spatial cues for substances to be transported in a specific direction along the apico-basal axis (Cerejido et al., 1998; Shin et al., 2006). Structurally, tight

junctions are comprised of transmembrane and membrane-associated proteins that are believed to assemble into stable complexes. Zonula occludens-1 (ZO-1) and occludin were the first constitutive tight junction pro-

Grant sponsor: the NEUROBESE International Associated Laboratory (Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale [INSERM], SABAN, University of Lille 2; to V.P. and S.G.B.); Grant sponsor: the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS; to S.G.B.); Grant sponsor: the Agence Nationale de la Recherche (ANR; to V.P.: GLIODI-ABESITY and SGB-PROGRALEP); Grant sponsor: the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM; to V.P.); Grant sponsor: the Ministère délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies (Ph.D. fellowship to A.M.).

*CORRESPONDENCE TO: Vincent Prevot, INSERM U837, Bâtiment Biserette, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.
E-mail: vincent.prevot@inserm.fr

Received 22 May 2009; Revised 21 July 2009; Accepted 1 November 2009
DOI 10.1002/cne.22273

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

teins to be identified (Furuse et al., 1993; Stevenson and Keon, 1998). These proteins are present in all cell layers that display barrier properties. More recently, scientists have discovered a family of transmembrane proteins designated the claudins. This family consists of at least 24 members, each of which exhibits both organ- and tissue-specific distribution patterns (Morita et al., 1999).

In the central nervous system (CNS), tight junctions play a crucial role in the formation and maintenance of the blood-brain barrier (BBB). This barrier allows for the separation of internal environments between the blood and brain parenchyma compartments. However, there are discrete periventricular areas, known as the circumventricular organs, in which the brain endothelium is fenestrated. Several authors have noted that in these regions, the tight junction protein ZO-1 is expressed by ependymal as opposed to endothelial cells (Smith and Shine, 1992; Petrov et al., 1994), suggesting that the barrier has been shifted in these structures from the vascular to the ventricular side. The median eminence of the hypothalamus is one such circumventricular organ. Typically, the median eminence contains a rich capillary plexus and a fenestrated endothelium (Schulz and Engelhardt, 2005). It also contains tanycytes that constitute the specialized ependymoglial cellular sheet that lines the floor and the basolateral walls of the third ventricle. A dominant feature of tanycytes is their marked polarization: tanycyte cell bodies are located in the ventral border of the third ventricle, but they also send processes to the vascular walls, where they make contact through "end feet" specializations (Rutzel and Schiebler, 1980; Prevot, 2002; Ojeda et al., 2008).

Experimental evidence suggests that tanycytes are capable of transporting macromolecules between the blood and cerebrospinal fluid compartments via transcytosis (Nakai and Naito, 1975; Fernandez-Galaz et al., 1996; Peruzzo et al., 2004). The tanycytic cellular sheet lining the third ventricle is not composed of a homogenous cell population; four different types of tanycytes have been described based on their location, morphology, cytochemistry, ultrastructure, and function (Akmayev et al., 1973; Akmayev and Fidelina, 1976; Akmayev and Popov, 1977; Rodriguez et al., 1979, 2005).

Previous electron microscopic studies have mentioned the existence of tight junction complexes between tanycytes in the tuberal region of the hypothalamus based on morphological criteria (Brightman and Reese, 1969; Flament-Durand and Brion, 1985). Nevertheless, relatively little is known about the exact molecular nature of these putative tanycytic tight junction complexes. Moreover, there is still debate in the literature regarding the barrier properties of the ependymal sheet in this hypothalamic region (Brightman et al., 1975; Peruzzo et al., 2000).

Taking advantage of recent advances in the identification of the molecular components of tight junctions (Tsu-

kita et al., 2001; Matter and Balda, 2003), our present study used immunohistochemistry to examine the differential spatial expression of tight junction proteins in ependymal cells of the tuberal region of the hypothalamus of adult mice. In addition, we used intravenous and intracerebroventricular injections of Evans blue dye to determine whether distinct tight junction protein expression patterns at the ventricular wall of the third ventricle may be accompanied by localized differences in diffusion barriers.

MATERIALS AND METHODS

Animals and tissue preparation

Fifteen male C57Black6 mice (Charles River, France) were used in this study. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC), and the experimental protocols were approved by the local institutional research animal committee. Animals were maintained on a controlled light cycle (14 hours on/10 hours off) and provided with food and water ad libitum. The animals were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of chloral hydrate (8%; 350 mg/kg) and were perfused transcardially with 0.9% saline. The brains were quickly removed, embedded in ice-cold OCT (Optimal Cutting Temperature embedding medium, Tissue-Tek, Sakura, Ville-neuve d'Ascq, France), frozen in isopentane (-55°C), and stored at -80°C until sectioning. Using a cryostat, 20- μm serial frozen sections were cut and collected on chrome/alum/gelatin-coated slides. Slide-mounted sections were fixed by immersion for either 1 minute at -20°C in methanol/acetone (vol/vol) for most immunostaining or for 10 minutes at 4°C in 2% paraformaldehyde for the detection of deetyrosinated tubulin.

Antibody characterization

All primary antibodies used are listed in Table 1.

The occludin antiserum stained the expected band of 65 kDa molecular weight on Western blots of mouse brain (Koedel et al., 2002; Beauchesne et al., 2009), and stained a pattern of membrane-associated structures in endothelial cells (Fig. 4) that is identical with previous reports (Hirase et al., 1997).

The zonula occludens-1 (ZO-1) antiserum stained the expected band of 225 kDa molecular weight on Western blots of mouse brain (Stamatovic et al., 2005; Beauchesne et al., 2009), and produced a pattern of staining in endothelial cells (Fig. 3A) and choroids plexus (data not shown) similar to that described elsewhere in the literature (Smith and Shine, 1992; Wolburg et al., 2001).

The claudin 1 antiserum had been previously characterized for immunocytochemical use by others in claudin 1 knockout mice (Furuse et al., 2002), and stained apical membrane-

TABLE 1.
Primary Antibodies Used in This Study

Antigen	Immunogen	Manufacturer, species, type, cat. no.	Dilution
Occludin	GST fusion protein consisting of amino acids 372-522 from C-terminus of human occludin fused to GST	Zymed (San Francisco, CA), rabbit polyclonal, #1379345	1:500
Zonula occludens-1	69-kDa fusion protein corresponding to amino acids 463-1109 of human ZO-1	Zymed, rabbit polyclonal, #60303915	1:500
Claudin 1	N-CRK TTS YPT PRP YPK PAP SSG KDY V-C synthetic peptide in the C-terminal sequence of human claudin 1	Zymed, rabbit polyclonal, #60782673	1:100
Claudin 3	N-CPR STG PGT GTG TAY DRK DYV-C synthetic peptide in the C-terminal sequence of human claudin 3	Zymed, rabbit polyclonal, #1376469	1:100
Claudin 5	N-CYS APR RPT ANG DYD KKN YV-C synthetic peptide in the C-terminal sequence of mouse claudin 5	Zymed, rabbit polyclonal, #51001292	1:100
Detyrosinated tubulin	N-GEEEGEE-C synthetic peptide corresponding to the seven C-terminal amino acids	Chemicon (Temecula, CA), rabbit polyclonal, #LV1422976	1:500
Vimentin	Recombinant Syrian gold hamster vimentin	Chemicon, chicken polyclonal, #0604026541	1:2,000
von Willebrand factor	von Willebrand factor purified from human plasma	Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), rabbit polyclonal	1:200
MECA 32	Murine lymph node stroma	Gift from Pr. Britta Engelhardt (Switzerland), rat monoclonal	1:200

associated structures that exhibit the classical morphology of tight junction protein complexes (Fig. 10) that is identical with previous reports (Wolburg et al., 2001).

The claudin 3 antiserum had been previously shown to stain endothelial tight junctions in both human and mouse CNS (Wolburg et al., 2003), and stained capillary-associated structures that exhibit the classical morphology of the tight junction protein complexes seen in BBB capillaries (Fig. 9).

The claudin 5 antiserum stained the expected band of 22 kDa molecular weight on Western blots of mouse brain (Stamatovic et al., 2005; McColl et al., 2008), and stained apical membrane-associated structures that exhibit the classical morphology of tight junction protein complexes (Fig. 8) that is identical with previous reports (Norsted et al., 2008). In addition, no staining was seen in mice in which the claudin 5 gene had been deleted (Nitta et al., 2003).

The detyrosinated tubulin antiserum (Gundersen et al., 1984) was shown to stain microtubules in neural tissue (Paturle-Lafanechere et al., 1994), and primary cilia in vitro (Gundersen and Bulinski, 1986).

The vimentin antiserum produced a pattern of staining similar to that described elsewhere by others (Prevot, 2002; Kameda et al., 2003; Sanchez et al., 2009) (Fig. 1).

The von Willebrand factor antiserum produced a pattern of staining in vascular endothelial cells in the mouse CNS (Fig. 2) similar to that described elsewhere in the literature (Alliot et al., 1999).

The MECA 32 antiserum (Leppink et al., 1989) was raised against a mouse endothelial cell surface antigen as

described previously by others (Streeter et al., 1988). This antibody has been shown to selectively recognize fenestrated capillaries in the circumventricular organs and the choroid plexus (Fig. 2) (Hallmann et al., 1995; Schulz and Engelhardt, 2005). It was a generous gift from Professor Britta Engelhardt (Switzerland).

AQ: 2

Immunohistochemistry

For dual-label immunofluorescence experiments, sections were rinsed 4 times in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and blocked for 1 hour by using blocking solution (PBS containing 4% normal goat serum and 0.3% Triton X-100) at 4°C. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in blocking solution. The sections were then subjected to four washes in 0.1 M PBS and incubated for 1 hour at room temperature with a mix of secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (1:500 dilution; all purchased from Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA) in the blocking solution. The sections were rinsed 4 times in 0.1 M PBS. A nuclear counterstaining operation was performed by incubating the sections for 1 minute in Hoechst (1:1,000 dilution; Molecular Probes, Invitrogen) diluted in 0.1 M PBS. Finally, sections were washed 4 times in 0.1 M phosphate buffer and coverslipped by using Permafluor (ThermoFisher, Illkirch, France). The slides were stored at 4°C until analysis. A special procedure was used to visualize the claudin 3 and 5 content. Antigen retrieval was performed by using a microwave before the blocking step. Briefly, slides were incubated with 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) and subjected to

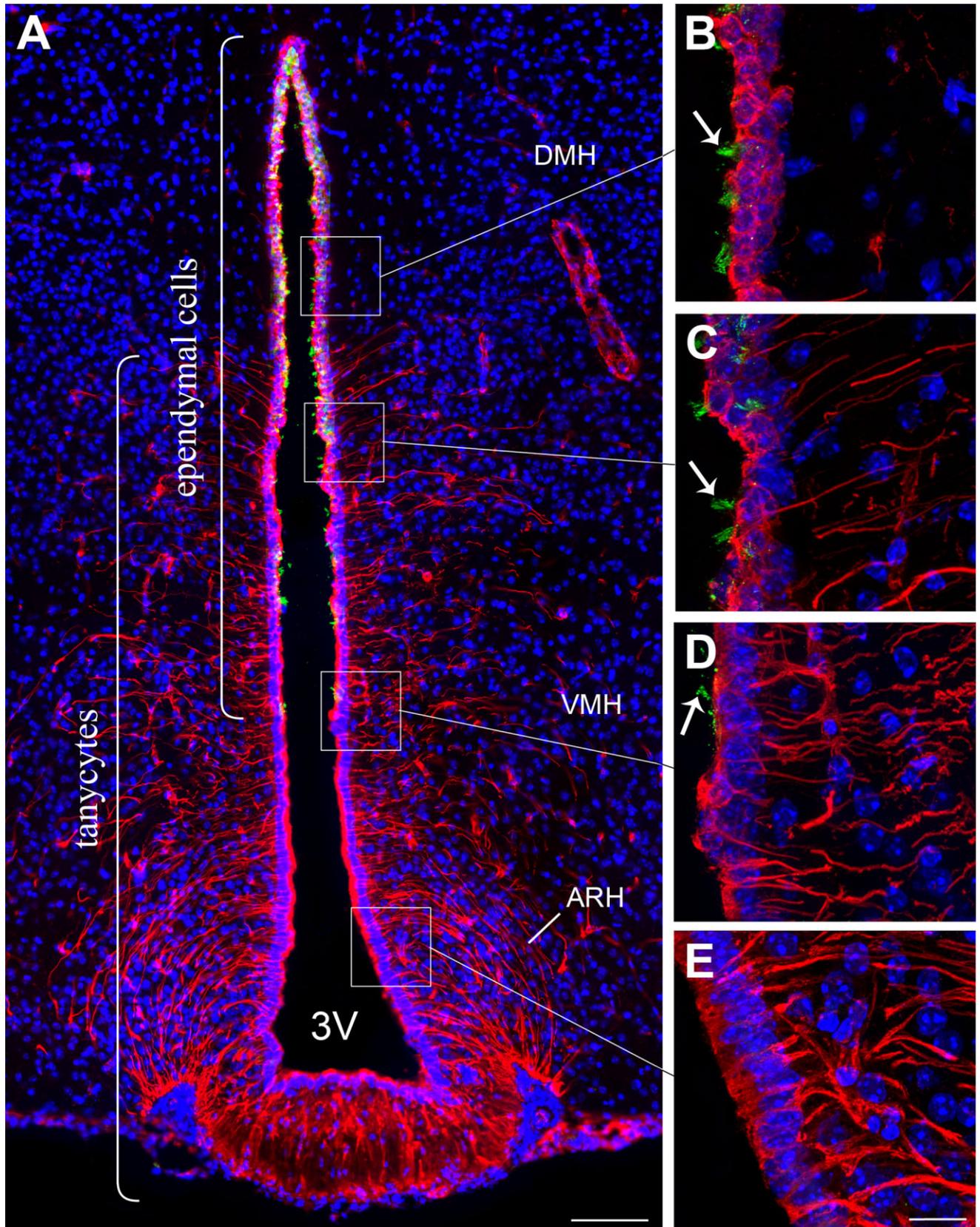


Figure 1.

FOFOG

microwave irradiation (800 W, 4 minutes, and then 400 W, 2X 5 minutes) before the blocking step.

For triple-labeling studies, anti-vimentin antibodies were visualized by using a goat anti-chicken biotin-conjugated antibody (1:500 dilution, 1 hour at room temperature; Vector, Burlingame, CA) and amino-methylcoumarin-acetate (AMCA)-conjugated streptavidin (1:500 dilution, 1 hour at room temperature; Vector).

Evans blue injection procedure

Evans blue is a dye with high affinity for serum albumin and is commonly used to assess the permeability of the BBB (Uyama et al., 1988; Hawkins and Egleton, 2006). Adult male mice were subjected to either intravenous (i.v.; $n = 3$) or intracerebroventricular (i.c.v.; $n = 3$) injections of sterile 1% Evans blue (Sigma, St. Louis, MO) in 0.9% saline. Animals injected into the tail vein with Evans blue (50 μ l) were killed by decapitation 20 minutes post injection. For i.c.v. injections, mice were placed in a stereotactic frame (Kopf Instruments, Tujunga, CA) under anesthesia (0.06 g/kg ketamine and 0.01 g/kg xylazine, both i.p.), and a burr hole was drilled 1 mm lateral to the Bregma and 0.3 mm posterior to Bregma, according to a mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2001). A 10- μ l Hamilton syringe was slowly inserted into the left lateral ventricle (2.5 mm deep relative to the dura). The cisterna magna was exposed to the atmosphere, and 2 μ l of Evans blue was immediately injected into the left lateral ventricle by using an infusion pump (KD Scientific, Holliston, MA) over 1 min. The needle of the Hamilton syringe was removed 1 minute after the injection ended and the mice were killed by decapitation.

Brains of the injected mice were quickly removed, frozen in O.C.T., and stored at -80°C until use. Serial frozen sections (20 μ m) were cut on a cryostat and collected on gelatin-coated glass slides. The Evans blue staining was directly visualized and imaged with a fluorescent microscope. Slide-mounted sections were then fixed in methanol/acetone (vol/vol) at -20°C for 1 minute, dried at room temperature, and processed immediately for immunohistochemistry analyses as described above.

Figure 1. Microphotographs showing the distribution of vimentin and glu-tubulin immunoreactivities in coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus. **A:** Low-magnification photomontage of glu-tubulin (green) and vimentin (red) immunofluorescence. **B–D:** High-magnification images showing glu-tubulin-immunoreactive cilia (green, arrows) on the ventricular surface at the level of the dorso-medial nucleus of the hypothalamus (DMH; B,C) and ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH; D). Note that glu-tubulin immunoreactivity is absent in vimentin-labeled tanycytes of the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH; E) and median eminence (A). Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle. Scale bar = 100 μ m in A; 20 μ m in E.

Microscopic analysis

Sections were analyzed by using an Axio Imager.Z1 ApoTome microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), equipped with a motorized stage and an AxioCam MRm camera (Zeiss). Specific filter cubes were used for the visualization of green (EX: 475/40 nm, DM: 500 nm, BA: 530/50 nm), red (EX: 550/25 nm, DM: 570 nm, BA: 605/70 nm), and UV (bisbenzimidazole) or AMCA fluorescence (EX: 365 nm, DM: 395 nm, BA: 445/50 nm).

To create photomontages, single-plane images were captured by using the MosaiX module of the AxioVision 4.6 system (Zeiss) and a Zeiss 20 \times objective (N.A. 0.8) for each fluorophore sequentially. Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) was then used to process, by applying adjustments for brightness and contrast, and merge the photomontages.

High-magnification microphotographs represent maximal intensity projections derived from 20–5 triple-apoTome images collected by using the z-stack module of the AxioVision 4.6 system and a Zeiss 63 \times oil immersion objective (N.A. 1.4). All images were captured in a step-wise fashion over a defined z-focus range corresponding to all visible staining within the section and consistent with the optimum step size for the corresponding objective and the wavelength ($\lambda = 500$ nm).

Confocal laser scanning microscopy was used to confirm the spatial organization and distribution of all tight junction proteins. Sections were examined with a Leica SP2 upright confocal laser scanning microscope (DM RAX-UV) equipped with the Acousto-Optical Beam Splitter (AOBS) and using a 100 \times , N.A. 1.4, oil immersion objective (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France). DAPI was excited at 405 nm and observed from 420 to 495 nm, Alexa 488 was excited at 488 nm and observed from 495 to 580 nm, and Alexa 568 was excited at 594 nm and observed from 599 to 680 nm. The selection of the spectral emission window for each fluorophore was determined through λ scan analysis of single-stained membrane fragments. The gain and offset for each photomultiplier were adjusted to optimize nucleic acid, tight junction protein, and vimentin detection events. Images of the confocal laser scanning microscopy observations (1,024 by 1,024 pixels) were acquired sequentially, between stacks, to eliminate spectral crosstalk from the data. The frequency was set to 200 Hz and the signal/noise ratio was enhanced through frame averaging. Overlays and maximum projections of the z-stack files were performed post acquisition by using the Leica Confocal Software to obtain the presented images. Original z-stack Leica files were imported into the Imaris 6.0 software package (Bitplane, Zürich, Switzerland) to perform 3D modeling.

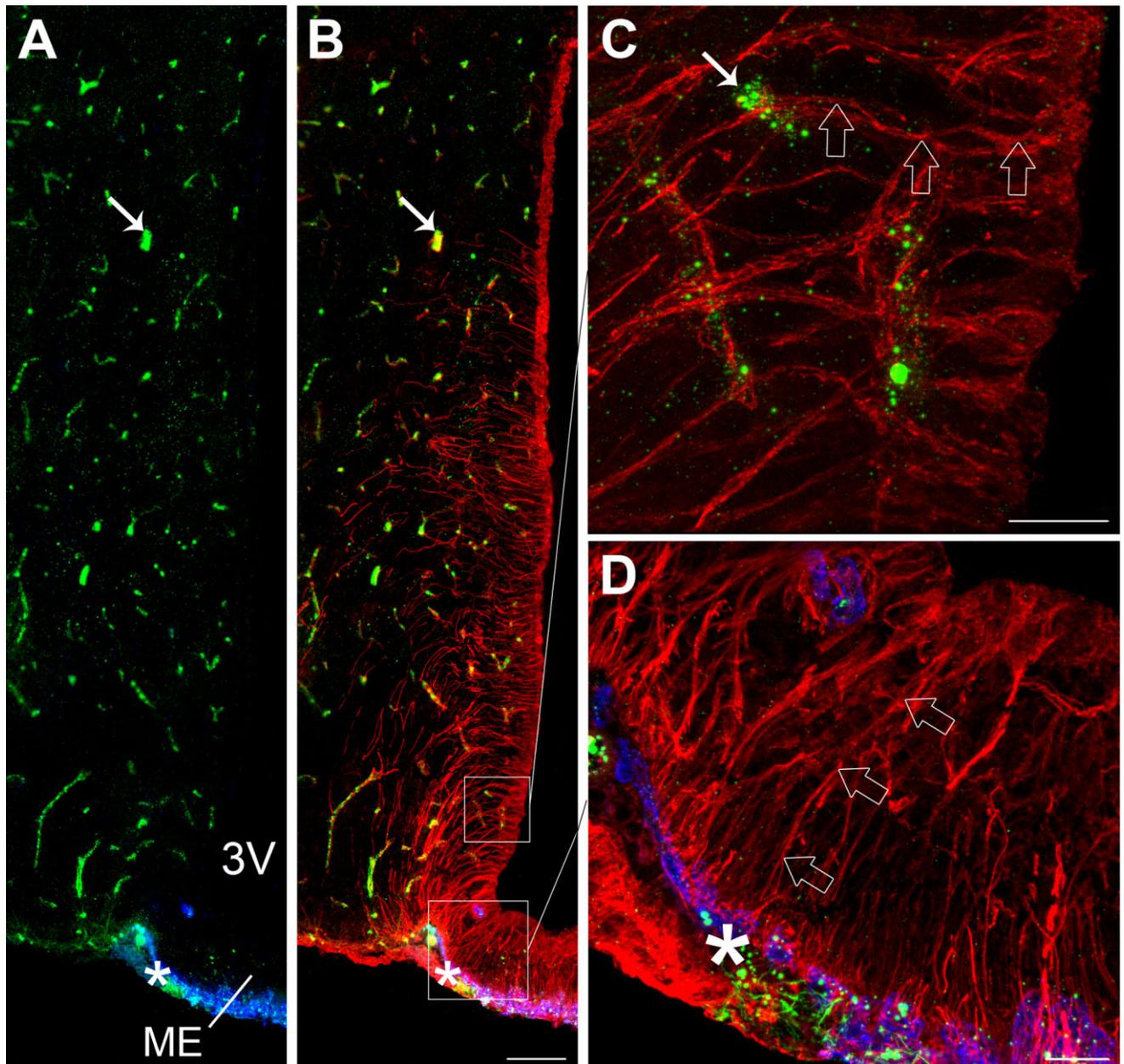


Figure 2. Microphotographs showing von Willebrand factor, MECA 32, and vimentin immunoreactivities in coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus. **A:** Low-magnification photomontage of von Willebrand factor (green) and MECA 32 (blue) immunoreactivities. **B:** Low-magnification photomontage of the same section showing vimentin immunoreactivity (red) merged with A. As shown in B, vimentin is an intermediary filament protein of the cytoskeleton that is expressed in both brain vessels and cells lining the third ventricle, including tanycytes (characterized by their elongated body and long basal process) and “typical” ependymal cells (cuboidal cells without processes located in the dorsal part of the third ventricle). **C:** High-magnification image showing the vimentin-labeled processes of dorsal tanycytes (red, empty arrows) contacting von Willebrand factor-positive brain vessels (green, arrow). **D:** High-magnification image showing the vimentin-labeled processes of median eminence tanycytes (red, empty arrows) contacting MECA 32-positive pituitary portal vessels (blue, asterisk). 3V, third ventricle; ME, median eminence. Scale bar = 100 μm in B (applies to A,B); 20 μm in C,D.

Distributions of the different ependymoglia cell types in the tuberal region of the hypothalamus

Cell counts were assessed 1.9 mm posterior to Bregma (Paxinos and Franklin, 2001). Single-plane images were

acquired from two 20- μm -thick frontal sections separated by 40 μm , by using the ApoTome technology. Different ependymoglia cell types were identified according to anatomical criteria, vimentin immunoreactivity, and their pattern of occludin expression (honeycomb or unorganized).

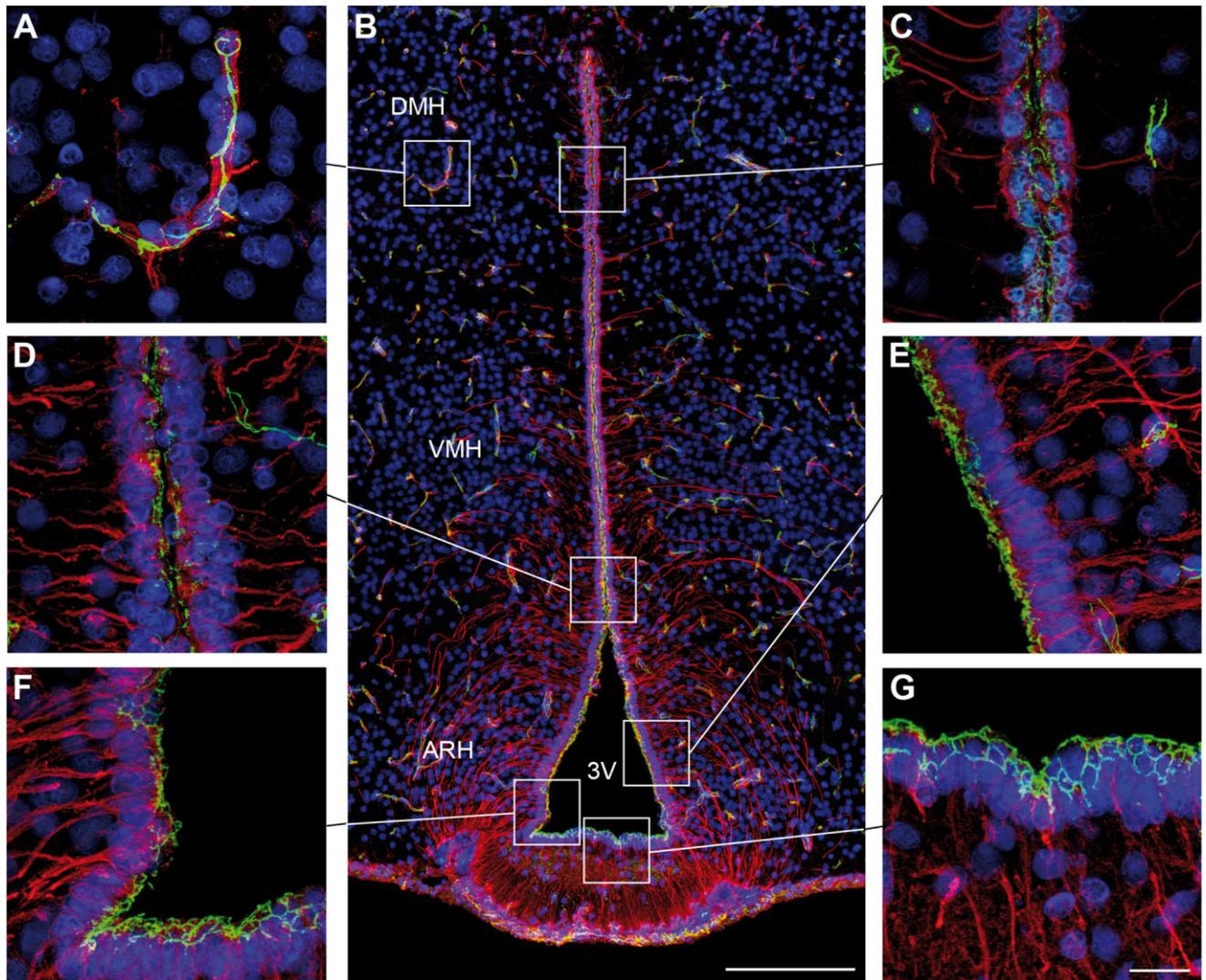


Figure 3. Microphotographs showing the distribution of zonula occludens-1 (ZO-1) and vimentin immunoreactivities in coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus. Images were acquired either at low (B) or high (A,C–G) magnifications. **A:** ZO-1 (green) immunoreactivity is readily visualized in capillaries of the cerebral parenchyma, which are known to display well-differentiated tight junction complexes. **B:** ZO-1 immunoreactivity is also evident at the wall of the third ventricle. **C:** Notably, ZO-1 immunostaining displays a honeycomb distribution in cuboidal ependymal cells. **D:** Ventral to the DMH, where the tanyocytes appear, the honeycomb ZO-1-immunoreactive pattern gradually disappears and is replaced by an unorganized staining pattern. **E:** This unorganized distribution of ZO-1 immunoreactivity becomes obvious in the tanyocytes of the ARH. **F,G:** In contrast, tanyocytes of the median eminence exhibit a honeycomb pattern of ZO-1 expression. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and define the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus. Scale bar = 100 μm in B; 20 μm in G (applies to A,C–G).

For quantification purposes, the wall of the third ventricle was divided into four parts depending on the hypothalamic structure adjacent to the ventricle: the median eminence (ME), the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH), the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH), and the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH). For each image and subdivision, we counted the total number of cell nuclei lining the third ventricle. Cells of each different ependymoglial cell type were counted. By using this method, each cell was counted only once and was thus categorized under a single group. The results from our

analysis of two sections per animal were combined and the percentages of cells belonging to each category were calculated. Quantifications were performed by using three animals. To avoid observer bias, quantifications were repeated by an independent investigator who was unaware of the respective experimental conditions.

Statistics

The differences between several groups were analyzed by one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls multiple comparison test for unequal replications.

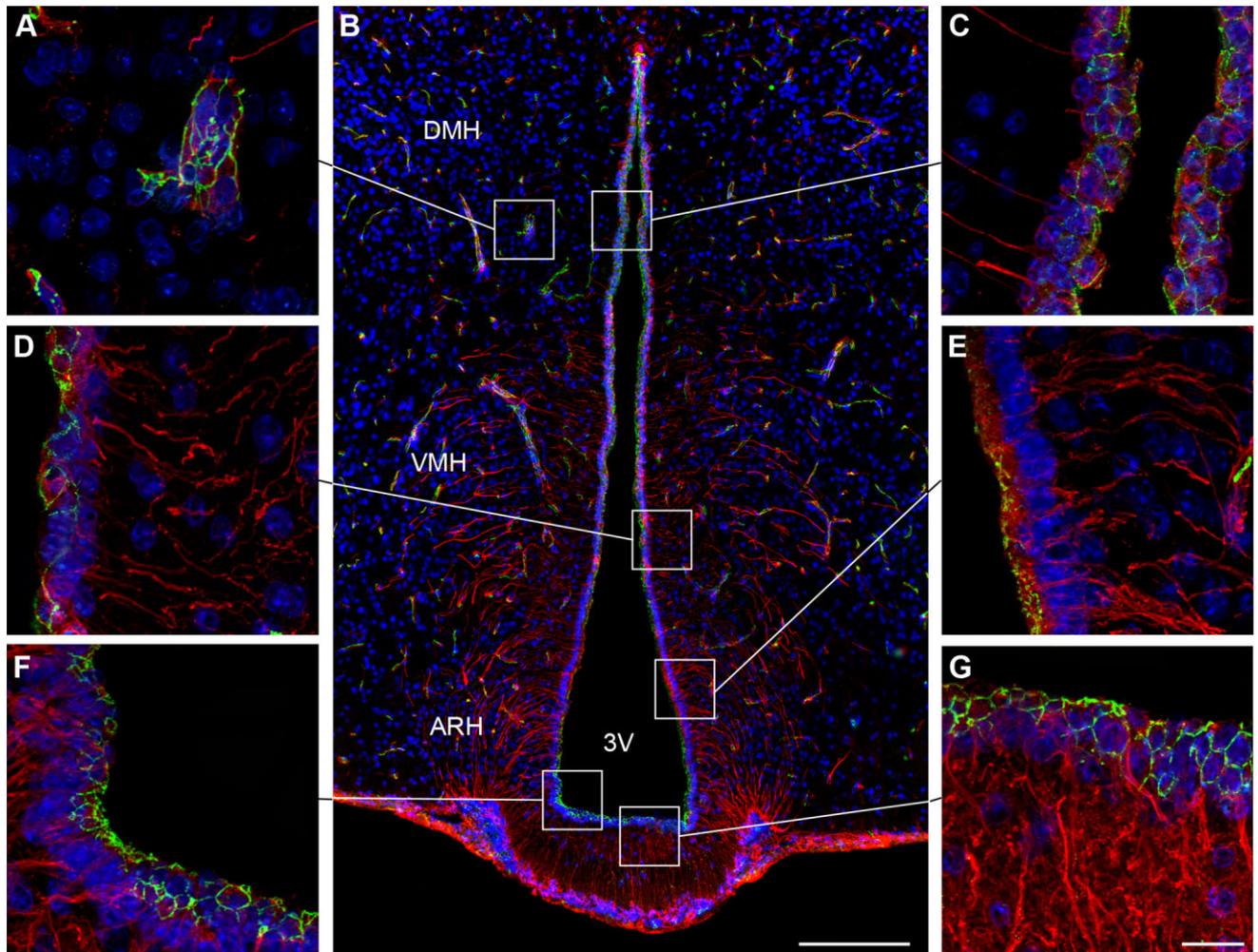


Figure 4. Microphotographs showing the distribution of occludin and vimentin immunoreactivities in coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus. Images were acquired either at low (B) or high (A,C–G) magnifications. **A:** Occludin (green) immunoreactivity is readily visualized in capillaries of the cerebral parenchyma, which are known to display well-differentiated tight junction complexes. **B:** Occludin immunoreactivity is also evident at the wall of the third ventricle. **C:** Notably, occludin immunostaining displays a honeycomb pattern of distribution in cuboidal ependymal cells. **D:** Ventral to the DMH, where tanycytes appear, the occludin-immunoreactive honeycomb pattern gradually disappears and is replaced by an unorganized staining. **E:** This unorganized pattern of occludin immunoreactivity becomes obvious in tanycytes of the ARH. **F,G:** In contrast, tanycytes of the median eminence exhibit a honeycomb expression pattern for occludin. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus. Scale bar = 100 μm in B; 20 μm in G (applies to A,C–G).

Statistical significance was accepted if P was < 0.05 . To compare percentages, groups were subjected to arc-sine transformation prior to statistical analysis to convert them from a binomial to a normal distribution.

RESULTS

First, we briefly assessed the normal anatomical distribution and morphology of vimentin-positive cells and their association with brain capillaries. Vimentin immunoreactivity was distributed throughout the cells lining the third ventricle, exhibiting a different expression pattern in tanycytes located in the ventral region of the ventricle as

compared with that seen in the “typical” ependymal cells (Knowles, 1972; Mathew, 2008), that are mainly located in the dorsal third of the ventricle (red, Fig. 1). The tanycytes exhibited intense apical vimentin immunostaining and extended long and slender vimentin-positive processes toward the nervous parenchyma (Fig. 1A,D,E). Of note, the “typical” ependymal cells, which are known to be devoid of process, typically displayed intense vimentin immunostaining restricted to a prominent, round, and centrally located nucleus (Fig. 1A–C). Unlike the tanycytes, these cuboidal ependymal cells exhibit tufts of cilia on their luminal (apical) surfaces. This feature was assessed by using

detyrosinated-tubulin immunoreactivity (Fig. 1A–D). The first ciliated ependymal cells appeared dorsal to the arcuate nucleus in the portion of the ventricular wall adjacent to the ventromedial nucleus (VMH). Ciliated ependymal cells became more abundant in the dorsal portion of the third ventricle, at the level of the dorsomedial nucleus (DMH), whereas the population of tanycytes gradually declined until only ciliated ependymal cells were present.

Demonstrating the relationship of tanycytes with brain capillaries, Figure 2 shows that vimentin-immunoreactive tanycytes bordering the floor of the third ventricle were in direct contact with the MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries (blue, Fig. 2B,D) at the external zone of the median eminence (ME). By contrast, dorsolateral tanycytes were in contact with MECA 32-immunonegative, von Willebrand factor-immunopositive brain capillaries (Fig. 2B,C). These observations thus suggest that there are at least two different populations of tanycytes that can be distinguished according to the type of blood vessels they interact with in the tuberal region of the hypothalamus.

Co-distribution of ZO-1 and occludin immunoreactivities in ependymoglia cells lining the third ventricle within the tuberal region of the hypothalamus

The presence of tight junction protein immunoreactivity in the wall of the third ventricle at the median eminence has not been fully investigated to date. Accordingly, we analyzed the distribution of ZO-1 and occludin immunostaining, as these are intracellular and transmembrane proteins, respectively, which are known to interact physically at tight junction complexes (Tsukita et al., 2001). As expected, ZO-1 (Fig. 3A,B) and occludin (Fig. 4A,B) immunoreactivities were recorded in brain capillaries throughout the nervous tissue. Predominant staining of ZO-1 and occludin in choroid plexus epithelium was observed, also as expected (data not shown). Importantly, ZO-1 and occludin immunostaining was also identified close to the ventricular surface (Figs. 3B, 4B). Greatly magnified images revealed that ZO-1 and occludin expression was closely associated with ependymocytes, with distinct expression patterns among the different ependymal cell types. In tanycytes located at the levels of the median eminence, ZO-1 and occludin immunoreactivities were organized around the cell bodies in a continuous belt, giving rise to a honeycomb-like shape (Figs. 3F,G, 4F,G). In contrast, tanycytes lining the region of the ventricle adjacent to the ARH exhibited a diffuse pattern of ZO-1 and occludin immunoreactivity in the apical region of the cells (Fig. 3E, 4E). Similar to tanycytes of the median eminence, an organized pattern of ZO-1 and occludin labeling was observed in ependymal cells dorsal to the ARH (Figs. 3C, 4C).

Confocal analysis (Fig. 5A,C) and 3D reconstruction (Fig. 5B,D) of 20- μ m-thick sections suggested that the diffuse apical occludin staining found in ARH tanycytes was not an orientation-related or tangential sectioning artifact. To confirm further that the unorganized pattern of tight-junction protein immunoreactivity observed in ARH tanycytes was not due to the potential orthogonal orientation of these cells in the section plane, we studied occludin immunoreactivity in sagittal sections. Figure 6 shows that in contrast to median eminence tanycytes (Fig. 6A,C) and typical ependymocytes (Fig. 6A,B), both of which display honeycomb-like occludin immunoreactivity, dorsal tanycytes exhibit an unorganized pattern of occludin labeling (Fig. 6A,D).

Remarkably, a combination of cells harboring either organized or unorganized patterns of ZO-1 (Fig. 3D) and occludin (Fig. 4D) was found in the region of the ventricular wall adjacent to the VMH. To determine the identities of these cells, we performed quantitative analyses based on morphological criteria. Each individual cell was categorized according to its pattern of vimentin and tight junction protein immunoreactivity. The results in Figure 7 indicate that the cells in the ventricular wall apposed to the VMH that exhibited a honeycomb pattern of occludin expression were cuboidal ependymal cells, whereas the tanycytes exhibited the typical diffuse occludin expression. Within the median eminence, $79.71 \pm 3.06\%$ of the cells on the ventricular surface were tanycytes harboring a honeycomb pattern of occludin expression (Fig. 7M). The proportion of these cells dropped dramatically at the ARH, VMH, and DMH ($<20\%$; one-way ANOVA, $P < 0.001$, $n = 3$ animals). Conversely, the proportion of tanycytes exhibiting an unorganized pattern of occludin labeling was very low at the median eminence ($9.25 \pm 1.22\%$), increased noticeably at the ARH ($79.28 \pm 4.37\%$; one-way ANOVA, median eminence vs. ARH, $P < 0.05$), remained high at the VMH ($57.08 \pm 14.71\%$; one-way ANOVA, median eminence vs. VMH, $P < 0.05$), and fell back under 10% at the DMH (one-way ANOVA, ARH vs. DMH and VMH vs. DMH, $P < 0.05$). In contrast, cuboidal ependymal cells, which were absent from the ventricular wall at the median eminence and the ARH, appeared at the VMH ($16.67 \pm 8.82\%$), and the abundance of these cells that show an organized pattern of occludin immunoreactivity significantly increased at the DMH ($66.98 \pm 6.08\%$; $P < 0.01$).

Localization of claudin 1, 3, and 5 immunoreactivities in the tuberal region of the hypothalamus

Because occludin and claudins are thought to assemble into heteropolymers to form tight junction intramembrane strands (Tsukita et al., 2001), we next sought to determine whether claudins may be expressed in the cells lining the

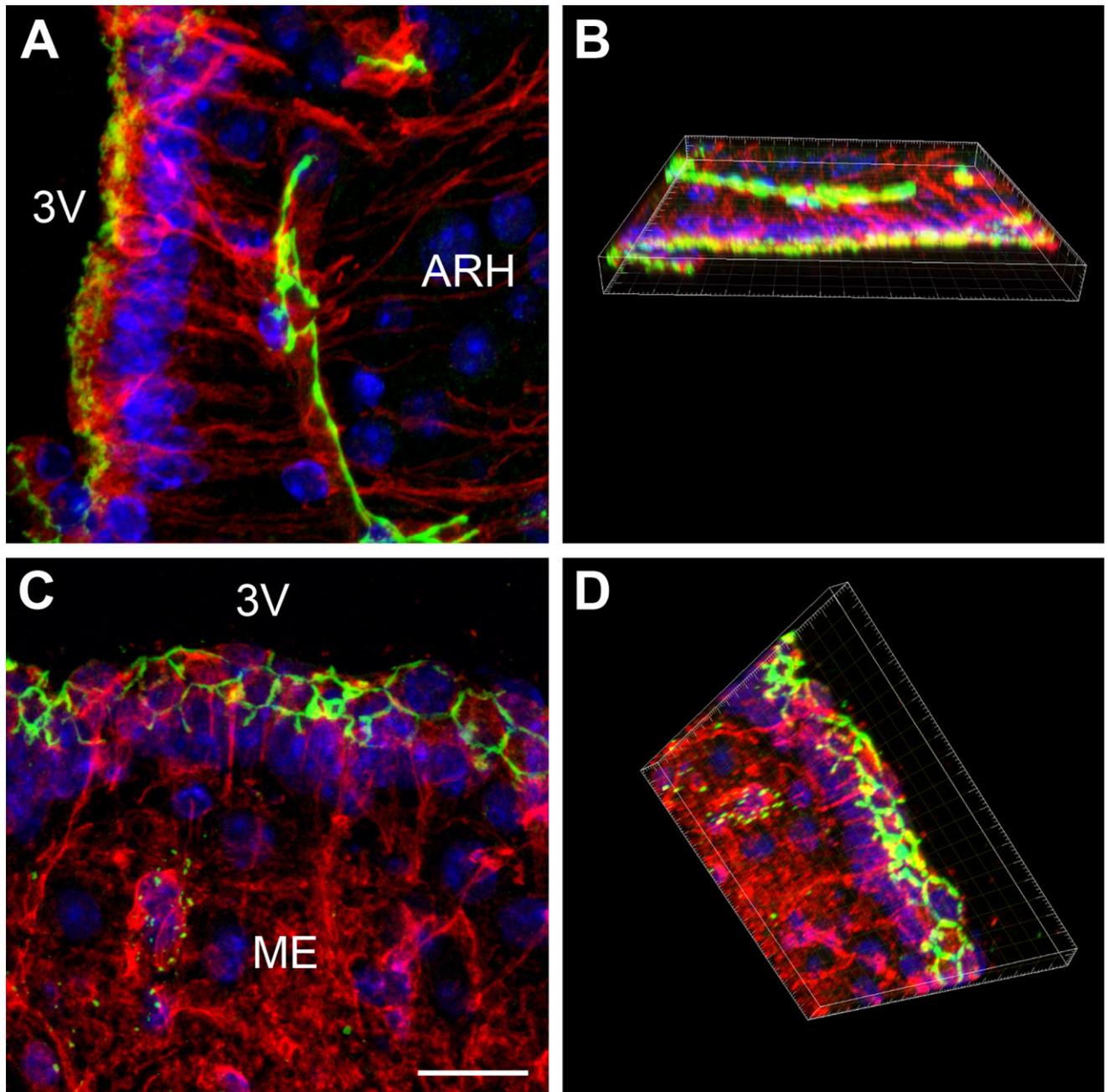


Figure 5. Confocal images showing two different expression patterns for occludin. **A:** Overlay and maximum projection of the z-stack files of a color-combined image, demonstrating the unorganized distribution of occludin (green) in tanycytes lining the arcuate nucleus (vimentin, red). Nuclei are counterstained using Hoechst (blue). **B:** Three-dimensional representation of A obtained with the Imaris 6.0 software. **C:** Overlay and maximum projection of the z-stack files of a color-combined image showing the honeycomb pattern of expression for occludin (green) in tanycytes of the median eminence (vimentin, red). Nuclei are counterstained using hoechst (blue) **D:** Three-dimensional representation of C obtained with the Imaris 6.0 software. 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; ME, median eminence. Scale bar = 20 μm in C (applies to A–D).

ventricular wall of the third ventricle. We performed immunostaining for claudin 1, claudin 3, and claudin 5, all of which have previously been shown to be expressed in the CNS (Furuse et al., 2002; Nitta et al., 2003; Wolburg et al., 2003). Interestingly, these three tight junction integral membrane proteins exhibited very distinct patterns of dis-

tribution in the tuberal region of the hypothalamus. Whereas claudin 5 immunolabeling exhibited an expression pattern very similar to that seen for occludin and ZO-1 (Fig. 8), claudin 3 immunostaining was only found in brain capillaries (Fig. 9), and claudin 1 immunoreactivity was restricted to the ventral part of the third ventricle wall (Fig.

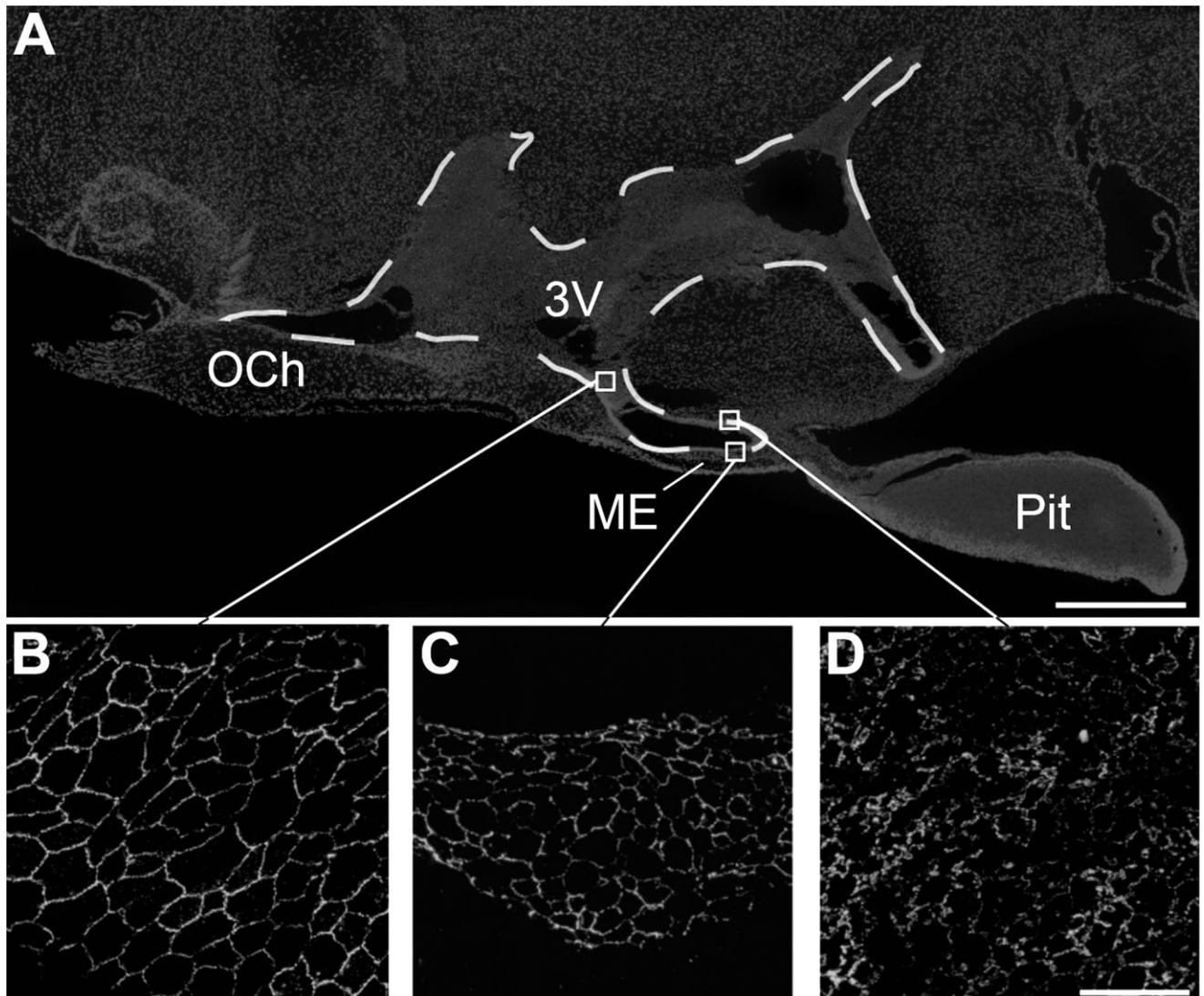


Figure 6. Microphotographs showing the distribution of occluding immunoreactivity in sagittal sections of the tuberal region of the hypothalamus. **A:** Low-magnification photomontage of Hoechst fluorescence showing the different brain structures. **B–D:** High-magnification images showing the honeycomb pattern of occludin immunoreactivity (green) in cuboidal ependymal cells (**B**) and tanycytes of the median eminence (**C**), whereas tanycytes of the arcuate nucleus display an unorganized pattern of immunoreactivity for occludin (**D**). 3V, third ventricle; OCh, optic chiasma; ME, median eminence; Pit, pituitary gland. Scale bar = 500 μm in **A**; 20 μm in **D** (applies to **B–D**).

F10

10). Figure 10 demonstrates that claudin 1 immunoreactivity is concentrated in the most apical part of tanycytes of the median eminence, where it forms a honeycomb pattern. In contrast, arcuate tanycytes, cuboidal ependymal cells, and brain capillaries were devoid of claudin 1 immunoreactivity.

Blood-hypothalamus and cerebrospinal fluid-hypothalamus interfaces in tanycytes of the median eminence

To determine whether tight junction protein expression patterns reflect localized diffusion barriers, we used Evans blue dye. Mice were injected into either their tail vein or lateral

ventricle with Evans blue dye as described in the Materials and Methods section. Intravenous injection of Evans blue resulted in the diffusion of the dye being restricted to the vascular bed of hypothalamic capillaries (arrow, Fig. 11A) and the median eminence (asterisks, Fig. 11A). Noticeably, the Evans blue dye bathing the median eminence did not spread into the neighboring hypothalamic structures, including the ARH (Fig. 11F). By contrast, when injected into the lateral ventricle, the Evans blue dye diffused into the ARH whereas the median eminence remained dye-free (Fig. 11G, L). Intriguingly, the Evans blue dye that penetrated into the ARH did not spread to other hypothalamic structures such as the VMH and DMH (Fig. 11L).

F11

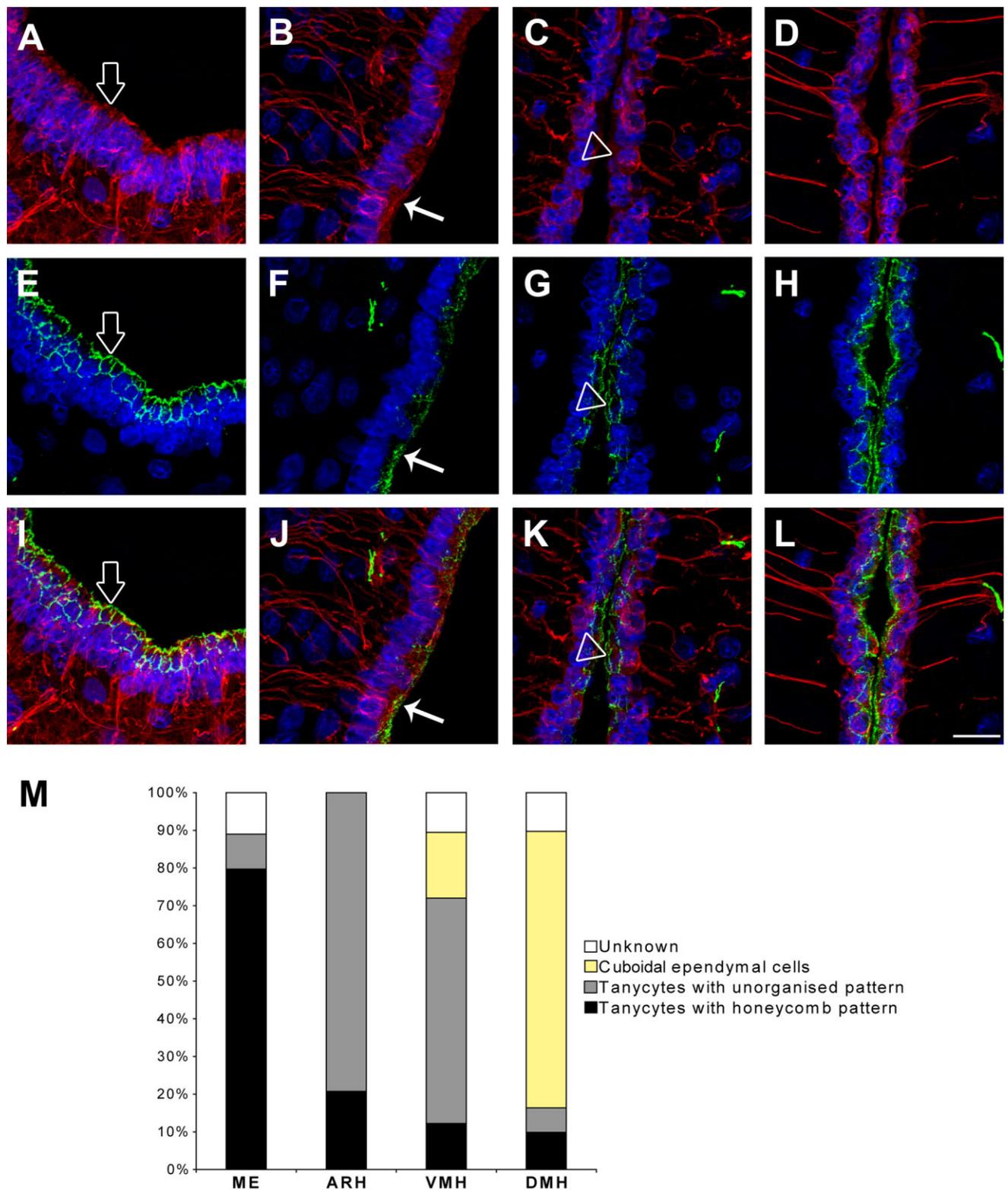


Figure 7. Morphological identification of the different ependymal cell types. A–D: Microphotographs showing the pattern of vimentin immunostaining (red) at the level of the ME (A), ARH (B), VMH (C), and DMH (D). E–H: Microphotographs showing the pattern of occludin immunostaining (green) at the level of the ME (E), ARH (F), VMH (G), and DMH (H). I: Merged picture of A and E. J: Merged picture of B and F. K: Merged picture of C and G. L: Merged picture of D and H. The three cell types identified on the ventricular surface of the third ventricle were tanyocytes harboring a honeycomb pattern of occludin (empty arrows) tanyocytes harboring an unorganized pattern of occludin (arrows), and cuboidal ependymal cells harboring a honeycomb pattern of occludin (empty arrowheads). The nuclei are counterstained using Hoechst (blue). M: Quantification of the basic cell types found on the ventricular surface at the ME, ARH, VMH, and DMH zones. ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; ME, median eminence; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus. Scale bar = 20 μ m in L (applies to A–L).

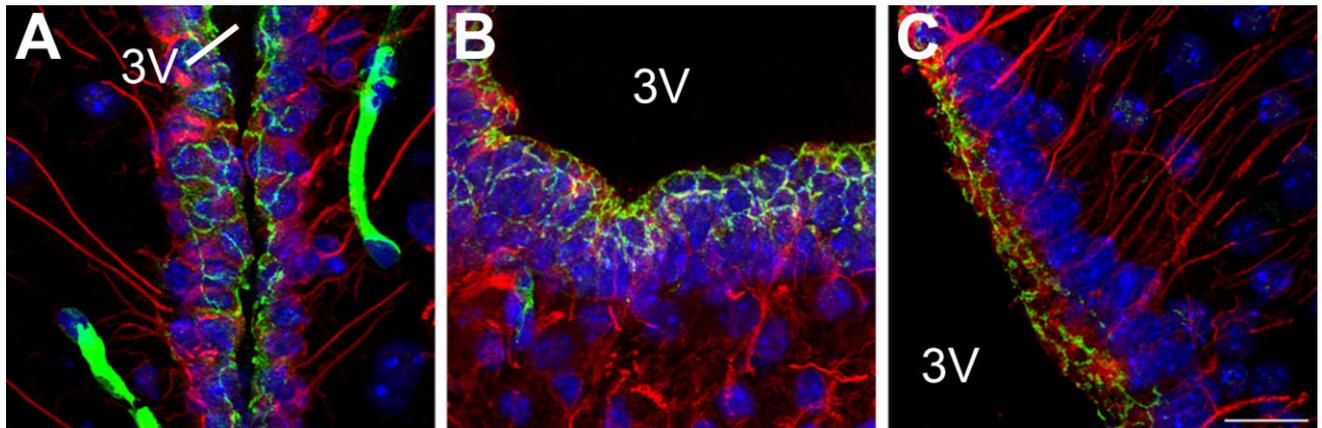


Figure 8. Microphotographs showing the distribution of claudin 5 and vimentin immunoreactivities in coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus. **A,B:** Images showing the honeycomb pattern of immunoreactivity for claudin 5 (green) in both cuboidal ependymal cells (vimentin, red; A) and tanycytes of the median eminence (vimentin, red; B). **C:** Image showing the unorganized pattern of immunoreactivity for claudin 5 in tanycytes of the arcuate nucleus. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle. Scale bar = 20 μm in C (applies to a–C).

DISCUSSION

In the present study, we used immunocytochemistry to systematically examine the distribution of tight junction proteins in the cells that line the ventricular wall of the third ventricle in the tuberal region of the hypothalamus. Our results reveal differential patterns of tight junction protein expression between different ependymoglia cell types and locations. The localization of these different patterns parallels the domains of the ventricular wall that exhibit distinct diffusion properties, as shown by central and peripheral injections of Evans blue dye. Our findings are consistent with the proposed role of median eminence tanycytes in regulating blood-hypothalamus exchanges by forming a cellular sheet that is impermeable to blood-borne molecules at the floor of the third ventricle. In contrast, arcuate tanycytes formed a permeable layer that allowed unrestrained diffusion of molecules between the cerebrospinal fluid and ARH compartments.

Others have established that in the CNS, diffusion barriers are built by using tight junction complexes in which occludin, ZO-1, claudin 5, claudin 1, and claudin 3 play key functional roles (Furuse et al., 1993; Stevenson and Keon, 1998; Morita et al., 1999). The present study provides the first extensive characterization of tight junction protein expression patterns in the ventricular wall of the third ventricle. Our findings are summarized in Figure 12. The results indicate that the tanycytes of the median eminence display a honeycomb-like pattern of immunoreactivity for occludin, ZO-1, claudin 1, and claudin 5, but they do not express claudin 3. Instead, the latter molecule is readily and selectively detected in the capillaries of the BBB, as confirmed previously by others (Wolburg et al., 2003). The cobblestone immunoreactivity pattern is typical of tight junction proteins (Tsukita and Furuse, 2002)

and has been reported in the choroid plexus epithelium (Wolburg et al., 2001).

In epithelial cells, tight junctions are indeed located at the most apical region of lateral membranes, and are composed of sealing strands of integral proteins that hold adjacent plasma membranes together (Tsukita et al., 2001; Tsukita and Furuse, 2002). To function as a paracellular barrier, this belt-like anchoring junction should be continuous and should encircle each of the interacting cells in the sheet, thus giving rise to the typical honeycomb-staining pattern of junction associated proteins (Coisne et al., 2005; Wolburg et al., 2001). The fact that both central and peripheral injections of Evans blue dye do not diffuse through the cellular sheet that is formed by median eminence tanycytes convincingly demonstrates that these specialized ependymoglia cells are joined at their apices by functional tight junctions. These results are consistent with the work of Brightman and Reese (1969), which visualized tight junction-like complexes in the median eminence by using electron microscopy. In addition, our study supplements the work of Petrov and co-authors, who demonstrated ZO-1 immunoreactivity in cells lining the ventricular walls and in median eminence tanycytes (Smith and Shine, 1992; Petrov et al., 1994), by reporting the expression of three additional proteins that are known to be associated with tight junction complexes, namely, occludin, claudin 1, and claudin 5.

The present study also reveals that occludin, ZO-1, and claudin 5 immunoreactivities are abundantly detectable in the arcuate tanycytes and in the cuboidal ependymocytes that pave the dorsal third of the wall of the third ventricle. By contrast, claudin 1 is selectively expressed in the ta-

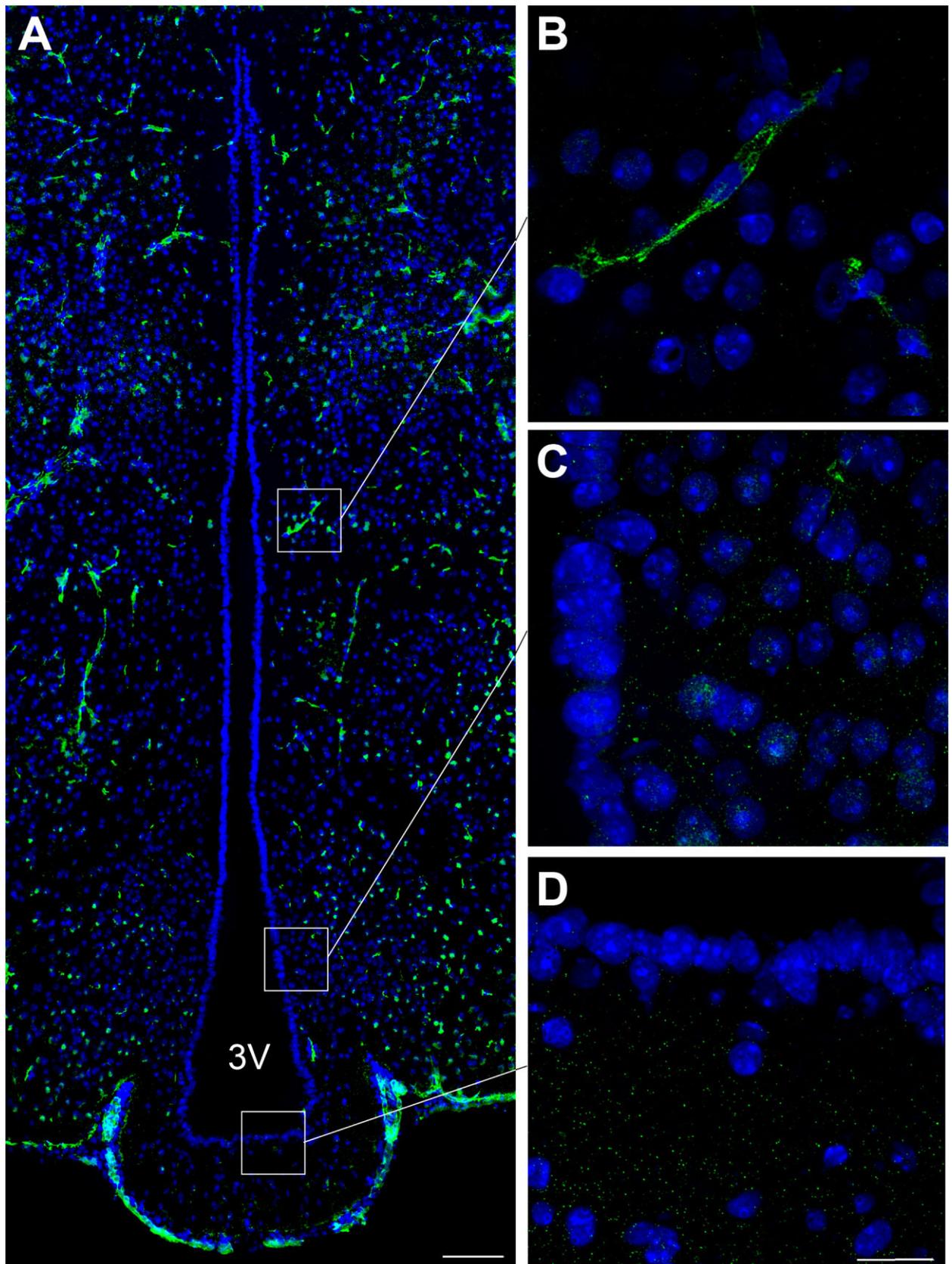


Figure 9. Microphotographs showing the distribution of claudin 3 immunoreactivity in coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus. **A:** Low-magnification photomontage of claudin 3 immunoreactivity (green). **B–D:** High-magnification photomontages showing that claudin 3 is expressed in brain capillaries (**B**) but not in the ependymal layer of the wall of the 3V (**C,D**). Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. Scale bar = 100 μm in **A**; 20 μm in **D** (applies to **B–D**).

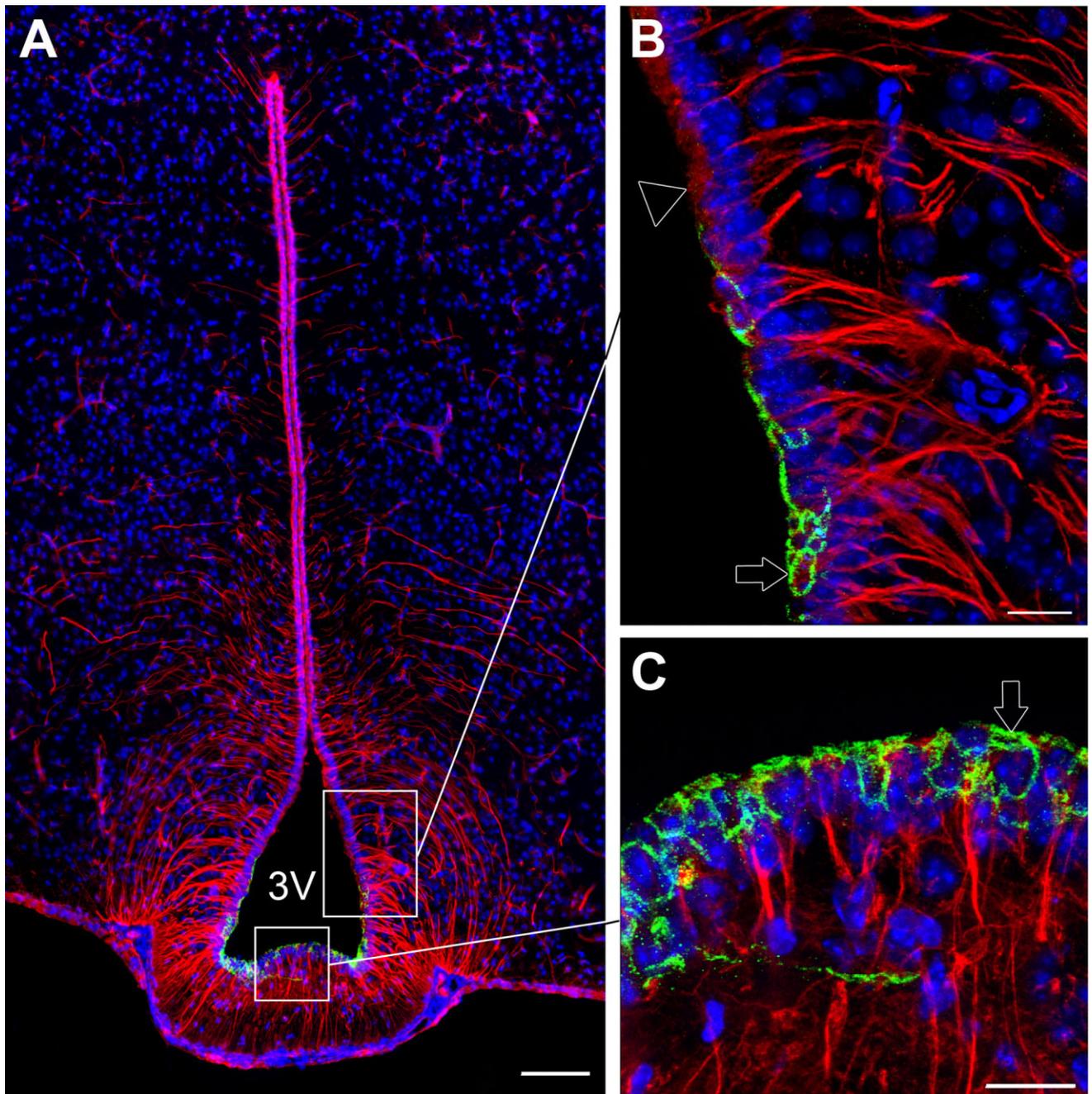


Figure 10. Microphotographs showing the distribution of claudin 1 and vimentin immunoreactivities in coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus. Images were acquired at either low (A) or high (B,C) magnifications. **A:** Photomontage showing claudin 1 immunoreactivity (green) in tanyocytes of the median eminence (vimentin-positive cells with processes, red). **B:** Photomontage showing the transition zone between arcuate tanyocytes that do not express claudin 1 (empty arrowhead) and tanyocytes of the median eminence that exhibit a honeycomb pattern of immunoreactivity for claudin 1 (green, empty arrow). **C:** High-magnification image showing claudin 1 immunoreactivity in ventral tanyocytes of the median eminence (green, empty arrow). Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle. Scale bar = 100 μm in A; 20 μm in B,C.

nocytes of the median eminence. However, whereas the cuboidal ependymal cells displayed honeycomb-like staining patterns for tight junction proteins, the arcuate tanyocytes intriguingly showed unorganized and diffuse apical expression patterns for occludin, ZO-1, and claudin 5. The

latter results are in agreement with previous electron microscopic studies in rats in which the authors mentioned morphologically the existence of “incomplete ependymal tight junctions” facing toward the ARH (Brightman et al., 1975; Gotow and Hashimoto, 1981).

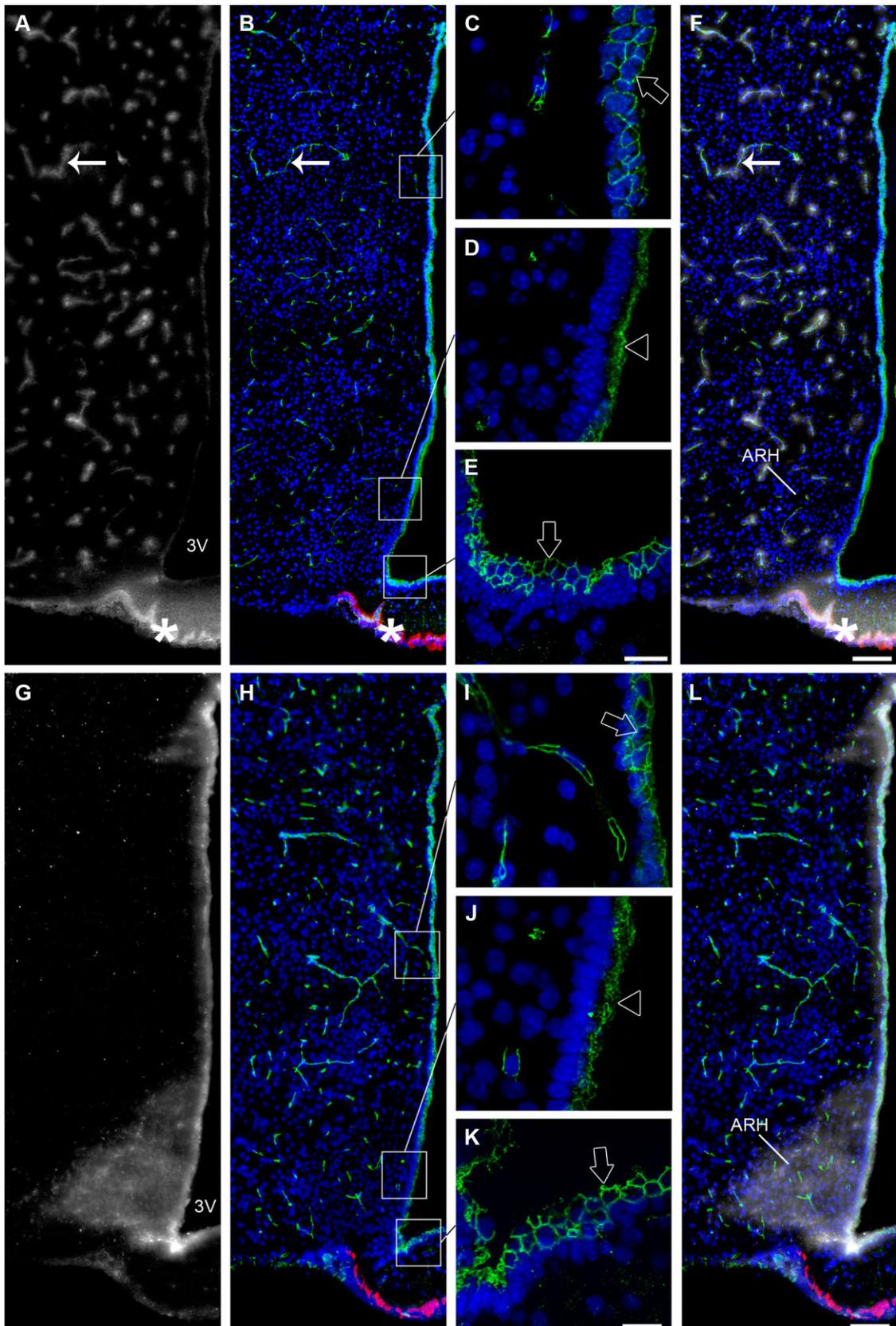


Figure 11.

ROF00

Consistent with these observations, intracerebroventricular injections of Evans blue demonstrated that the arcuate tanycyte layer was permeable to the dye, suggesting that uncontrolled exchanges of solutes may occur between the cerebrospinal fluid and the ARH compartments. In contrast, central infusion of Evans blue did not penetrate the cellular sheet formed by cuboidal ependymal cells. These results stand in contrast to previous studies in which horseradish peroxidase (HRP) was used as a tracer (Brightman and Reese, 1969); upon intracerebroventricular injections, HRP was shown to be dispersed in all hypothalamic nuclei of the periventricular zone (ARH, VMH, and DMH). In our present studies, diffusion of Evans blue originating from the cerebrospinal fluid is restricted to the ARH. The VMH and DMH are not flooded with the tracer, nor is the median eminence, thus confirming the existence of the diffusion barriers between the ARH and both the median eminence and VMH described previously (Rethelyi, 1984). The nature of these diffusion barriers that reside in the parenchyma remains to be fully characterized (Rodriguez et al., 2005). Taken together, our results indicate that the assembly and regulation of tight junction complexes in ependymal cells in general, and in tanycytes in particular, differ between distinct domains of the wall of the third ventricle. Because median eminence tanycytes directly contact Evans blue-permeable fenestrated capillaries, whereas arcuate tanycytes contact Evans blue-impermeable BBB capillaries, it is possible that the differences in tight junction protein organization and diffusion barrier permeability between these two tanycytic cell populations is related to this major distinguishing anatomical feature.

Although the distribution of tight junction proteins in the different domains of the third ventricular wall is obviously correlated with the Evans blue permeability of the paving

cellular sheet, such a parallel is not apparent at the VMH transitional zone. At the interface between the cerebrospinal fluid and brain parenchyma compartments, exclusion of centrally infused Evans blue dye from the VMH is not associated with an unambiguous honeycomb pattern distribution of tight junction proteins in ependymal cells. The tightness of the seal created by ependymal cells may thus not be the sole mechanism involved in the restriction of exchanges between the cerebrospinal fluid and tissue compartments. Interestingly, the transitional zone at the VMH is where the first ciliated ependymal cells, which are totally absent at the ARH, are found. Beating of ependymal cilia sets in motion cerebrospinal fluid flow (Sawamoto et al., 2006) and may thus limit the exchanges between the cerebrospinal fluid compartment and the ependymal sheet at the surface of the third ventricle. This may contribute to the exclusion of ventricular Evans blue from the VMH. By contrast, the arcuate and median eminence tanycytes both lack cilia. Thus the cerebrospinal fluid flow at the floor of the third ventricle may be dramatically lower and diffusional exchanges between the cerebrospinal fluid and ARH compartments may be markedly facilitated. Interestingly, arcuate tanycytes have been previously shown to possess microvilli at their luminal surfaces (Brawer, 1972; Bruni et al., 1972), suggesting that this cell population may play an important role in sensing molecules in the cerebrospinal fluid. This population may also be actively involved in promoting exchanges between the cerebrospinal fluid and the brain compartments at the ARH.

The ARH is a critical component of the neural pathways that regulate energy balance, and therefore it plays a key role in relaying blood-borne molecular signals. Research into this process has largely focused on the involvement of the ARH in relaying leptin signals to other parts of the hypothalamus (Sawchenko, 1998; Elmquist et al., 2005).

Figure 11. Occludin immunoreactivity correlated with the permeability of Evans blue at the tuberal region of the hypothalamus. **A:** Low-magnification photomontage showing fluorescence after intravenous injection of Evans blue dye (gray). **B:** Low-magnification photomontage of the same section showing occludin (tight junction protein, green) and MECA 32 (fenestrated capillary marker, red) immunoreactivities. Occludin (green) is expressed by all cells surrounding the third ventricle, but the pattern of expression is not uniform. **C–E:** High-magnification images captured from the same section. Cuboidal ependymal cells (**C**) and tanycytes at the level of the median eminence (**E**) display a honeycomb pattern of expression for occludin (green, empty arrows). Tanycytes at the level of the arcuate nucleus exhibit an unorganized pattern of expression for occludin (green, empty arrowhead, **D**). **F:** Color-combined image of **A** and **B**. When injected into the blood, the dye is stopped by tight junctions of the blood-brain barrier, and is confined into brain vessels that are immunoreactive for occludin (green, arrows). By contrast, the dye reaches the median eminence parenchyma through the fenestrated portal vessels that are immunoreactive for MECA 32 (red, asterisks). **G:** Low-magnification photomontage showing fluorescence after intracerebroventricular injection of Evans blue dye (gray). **H:** Low-magnification photomontage of the same section showing occludin (green) and MECA 32 (red) immunoreactivities. **I–K:** High-magnification images captured from the same section showing the honeycomb pattern of expression for occludin in cuboidal ependymal cells (green, empty arrow; **I**) and tanycytes of the median eminence (green, empty arrow; **K**) and the unorganized pattern of expression for occludin in tanycytes lining the arcuate nucleus (green, empty arrowhead; **J**). **L:** Color-combined image of **G** and **H**. When injected into the cerebrospinal fluid, Evans blue diffusion is restricted to the arcuate nucleus and is found to diffuse neither into other hypothalamic nuclei nor into the median eminence. The honeycomb pattern of occludin expression corresponds to the non-diffusion of the dye, whereas the unorganized pattern of expression for occludin may be associated with diffusion of the dye into the arcuate nucleus. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and recognize the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus. Scale bar = 20 μm in **E** (applies to **C–E**) and **K** (applies to **I–K**); 100 μm in **F** (applies to **A,B,F**) and **L** (applies to **G,H,L**).

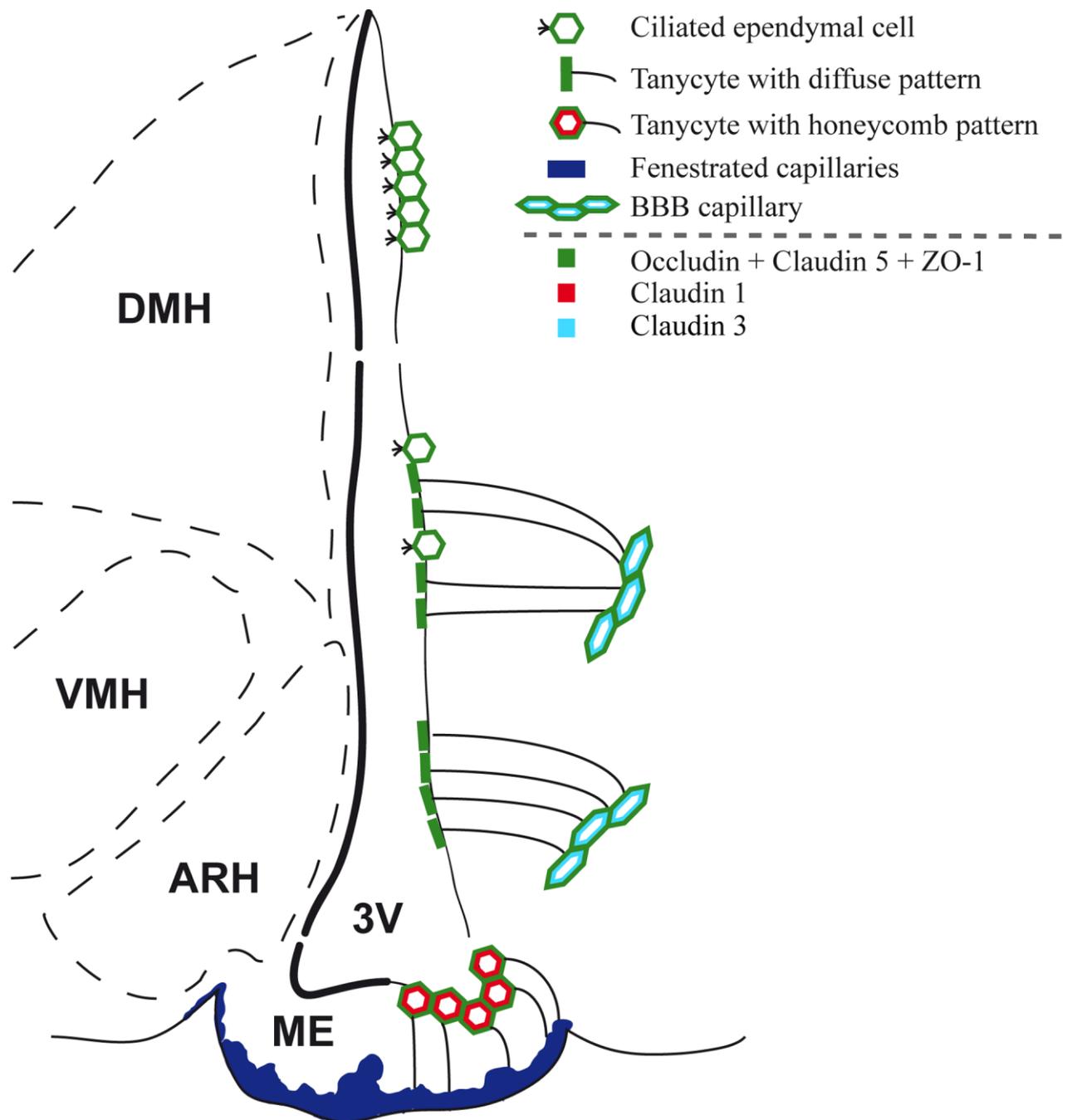


Figure 12. Representative drawing summarizing the distribution of tight junction proteins in the tuberal region of the hypothalamus. 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; ME, median eminence; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus.

However, the mechanisms by which peripheral signals reach the ARH to mediate their central effects remain largely unknown, although several hypotheses refer to the presence of fenestrated capillaries at the ARH (Ciofi et al., 2006) and the existence of a weak BBB at the ARH (Norsted et al., 2008). The results of the present study strongly suggest that exchanges between the cerebrospinal fluid and the ARH milieu can be notably facilitated. It is tempting

to speculate that one possible route for blood-borne molecules to target the ARH would be via the cerebrospinal fluid. Transcytosis studies have substantiated a possible role for the tanycytes of the median eminence in conveying blood-borne molecules to the cerebrospinal fluid (Nakai and Naito, 1975), and conversely (Garcia-Segura et al., 1999; Peruzzo et al., 2004). Consistent with this hypothesis, our results indicate that the ventral tanycytes are

highly polarized due to the presence of efficient tight junction complexes. Indeed, tight junctions are not only known to prevent the diffusion of solutes through the paracellular cleft, but they are also understood to be the principal structures contributing to cell polarity. In this role, they act as an intramembrane barrier to prevent the lateral diffusion of integral membrane proteins that localize to specific sites in the apical or basolateral regions of the cell (Cereijido et al., 1998; Shin et al., 2006).

To our knowledge this is the first detailed study of the differential spatial distribution of tight junction proteins in the tuberal region of the hypothalamus in the adult mouse. The results of our immunofluorescence studies, together with dye permeability experiments, provide detailed and additional information about the diffusion barriers between blood and brain, between blood and cerebrospinal fluid, and between cerebrospinal fluid and brain compartments in this region of the CNS. These data identify the periventricular zone of the tuberal region of the hypothalamus, which contains the median eminence and ARH, as a key interface for blood-cerebrospinal fluid-brain exchanges, and also demonstrate that although fenestrated vessels in the median eminence allow the diffusion of blood-borne molecules into the median eminence milieu, this "brain window" is restricted to the median eminence parenchyma. These data suggest a role for the median eminence tanycytes in controlling these barrier properties. Immunohistochemical results have also suggested that arcuate tanycytes are devoid of efficient tight junction complexes, thus confirming that the ependymal sheet lining the ARH is privileged as an interface for the exchange of molecules between the cerebrospinal fluid and brain parenchyma compartments. Overall, the results of our study support the hypothesis that the median eminence acts as a putative route for peripheral molecules to specifically target the ARH.

ACKNOWLEDGMENTS

Confocal analyses were performed at the Plate-forme régionale de recherche en imagerie cellulaire, INSERM U413-IFRMP 23, Université de Rouen, Mont-Saint-Aignan, France. The MECA 32 antibodies were kindly provided by Professor Britta Engelhardt (Switzerland).

AQ: 2

LITERATURE CITED

- Akmayev IG, Fidelina OV. 1976. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VI. The tanycytes: their relation to the sexual differentiation of the hypothalamus. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res* 173:407–416.
- Akmayev IG, Popov AP. 1977. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VII. The tanycytes: their relation to the hypophyseal adrenocorticotrophic function. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 180:263–282.
- Akmayev IG, Fidelina OV, Kabolova ZA, Popov AP, Schitkova TA. 1973. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. IV. Medial basal hypothalamus. An experimental morphological study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 137:493–512.
- Alliot F, Rutin J, Leenen PJ, Pessac B. 1999. Brain parenchyma vessels and the angiotensin system. *Brain Res* 830:101–112.
- Beauchesne E, Desjardins P, Hazell AS, Butterworth RF. 2009. Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain. *Neurochem Int* 55:275–281.
- Brawer JR. 1972. The fine structure of the ependymal tanycytes at the level of the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 145:25–41.
- Brightman MW, Reese TS. 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648–677.
- Brightman MW, Prescott L, Reese ST. 1975. Intercellular junctions of special ependyma. In: Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Miura-shi, Ishii S, editors. *Brain-endocrine interaction. II. The ventricular system*. Basel: Karger. p 146–165.
- Bruni JE, Montemurro DG, Clattenburg RE, Singh RP. 1972. A scanning electron microscopic study of the ependymal surface of the third ventricle of the rabbit, rat, mouse and human brain. *Anat Rec* 174:407–420.
- Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, Contreras RG. 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* 60:161–177.
- Ciofi P, Leroy D, Tramu G. 2006. Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* 141:1731–1745.
- Coisne C, Dehouck L, Faveeuw C, Delplace Y, Miller F, Landry C, Morissette C, Fenart L, Cecchelli R, Tremblay P, Dehouck B. 2005. Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* 85:734–746.
- Elmqvist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB. 2005. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol* 493:63–71.
- Fernandez-Galaz MC, Torres-Aleman I, Garcia-Segura LM. 1996. Endocrine-dependent accumulation of IGF-I by hypothalamic glia. *Neuroreport* 8:373–377.
- Flament-Durand J, Brion JP. 1985. Tanycytes: morphology and functions: a review. *Int Rev Cytol* 96:121–155.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777–1788.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099–1111.
- Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. 1999. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* 40:574–584.
- Gotow T, Hashimoto PH. 1981. Graded differences in tightness of ependymal intercellular junctions within and in the vicinity of the rat median eminence. *J Ultrastruct Res* 76:293–311.
- Gundersen GG, Bulinski JC. 1986. Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin. *Eur J Cell Biol* 42:288–294.
- Gundersen GG, Kalnoski MH, Bulinski JC. 1984. Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 38:779–789.
- Hallmann R, Mayer DN, Berg EL, Broermann R, Butcher EC. 1995. Novel mouse endothelial cell surface marker is suppressed during differentiation of the blood brain barrier. *Dev Dyn* 202:325–332.

- Hawkins BT, Egleton RD. 2006. Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption. *J Neurosci Methods* 151:262–267.
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL. 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110:1603–1613.
- Kameda Y, Arai Y, Nishimaki T. 2003. Ultrastructural localization of vimentin immunoreactivity and gene expression in tanycytes and their alterations in hamsters kept under different photoperiods. *Cell Tissue Res* 314:251–262.
- Knowles F. 1972. Ependyma of the third ventricle in relation to pituitary function. *Prog Brain Res* 38:255–270.
- Koedel U, Winkler F, Angele B, Fontana A, Pfister HW. 2002. Meningitis-associated central nervous system complications are mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:39–49.
- Leppink DM, Bishop DK, Sedmak DD, Henry ML, Ferguson RM, Streeter PR, Butcher EC, Orosz CG. 1989. Inducible expression of an endothelial cell antigen on murine myocardial vasculature in association with interstitial cellular infiltration. *Transplantation* 48:874–877.
- Mathew TC. 2008. Regional analysis of the ependyma of the third ventricle of rat by light and electron microscopy. *Anat Histol Embryol* 37:9–18.
- Matter K, Balda MS. 2003. Holey barrier: claudins and the regulation of brain endothelial permeability. *J Cell Biol* 161:459–460.
- McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM. 2008. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J Neurosci* 28:9451–9462.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. 1999. Claudin multi-gene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:511–516.
- Nakai Y, Naito N. 1975. Uptake and bidirectional transport of peroxidase injected into the blood and cerebrospinal fluid by ependymal cells of the median eminence. In: Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Miura-shi, Ishii S, editors. Brain-endocrine interaction. II. The ventricular system. Basel: Karger. p 94–108.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161:653–660.
- Norsted E, Gomuc B, Meister B. 2008. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 36:107–121.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau US. 2008. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 20:732–742.
- Paturle-Lafanechere L, Manier M, Trigault N, Pirollet F, Mazarguil H, Job D. 1994. Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* 107:1529–1543.
- Paxinos, Franklin. 2001.
- Peruzzo B, Pastor FE, Blazquez JL, Schobitz K, Pelaez B, Amat P, Rodriguez EM. 2000. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp Brain Res* 132:10–26.
- Peruzzo B, Pastor FE, Blazquez JL, Amat P, Rodriguez EM. 2004. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res* 317:147–164.
- Petrov T, Howarth AG, Krukoff TL, Stevenson BR. 1994. Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 21:235–246.
- Prevot V. 2002. Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 14:247–255.
- Rethelyi M. 1984. Diffusional barrier around the hypothalamic arcuate nucleus in the rat. *Brain Res* 307:355–358.
- Rodriguez EM, Gonzalez CB, Delannoy L. 1979. Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res* 201:377–408.
- Rodriguez EM, Blazquez JL, Pastor FE, Pelaez B, Pena P, Peruzzo B, Amat P. 2005. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247:89–164.
- Rutzel H, Schiebler TH. 1980. Prenatal and early postnatal development of the glial cells in the median eminence of the rat. *Cell Tissue Res* 211:117–137.
- Sanchez E, Vargas MA, Singru PS, Pascual I, Romero F, Fekete C, Charli JL, Lechan RM. 2009. Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology* 150:2283–2291.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A. 2006. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629–632.
- Sawchenko PE. 1998. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol* 402:435–441.
- Schulz M, Engelhardt B. 2005. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Res* 2:8.
- Shin K, Fogg VC, Margolis B. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:207–235.
- Smith GM, Shine HD. 1992. Immunofluorescent labeling of tight junctions in the rat brain and spinal cord. *Int J Dev Neurosci* 10:387–392.
- Stamatovic SM, Shakui P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:593–606.
- Stevenson BR, Keon BH. 1998. The tight junction: morphology to molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:89–109.
- Streeter PR, Rouse BT, Butcher EC. 1988. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* 107:1853–1862.
- Tsukita S, Furuse M. 2002. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol* 14:531–536.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285–293.
- Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M. 1988. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:282–284.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B. 2001. Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci Lett* 307:77–80.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 105:586–592.

AQ: 3

Cette première étude a permis d'apporter des données complémentaires quant à la nature moléculaire des barrières au niveau de la région tubérale de l'hypothalamus médio-basal. Les résultats montrent notamment que les tanocytes de l'éminence médiane expriment l'occludine, ZO-1, la claudine 1 et la claudine 5. Ces molécules sont organisées en ceintures continues autour de leurs corps cellulaires et forment des jonctions serrées qui restreignent la diffusion paracellulaire. Au contraire, les tanocytes dorsaux bordant le ARH expriment l'occludine, ZO-1 et la claudine 5. Ces molécules sont organisées de façon diffuse à l'apex de la cellule et forment des jonctions perméables permettant la diffusion de molécules depuis le LCR vers le ARH.

L'ensemble de ces données indique que seuls les tanocytes de l'éminence médiane forment une barrière qui serait impliquée dans la régulation des échanges entre le sang et le LCR.

Nos résultats d'immunohistochimie ont révélé deux profils de marquage différents pour les protéines de jonctions serrées au niveau des tanocytes de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal. En effet, alors que les tanocytes β possèdent des jonctions serrées organisées en nids d'abeille autour de leurs corps cellulaires, les tanocytes α révèlent un immunomarquage désorganisé situé à l'apex de la cellule pour les mêmes protéines. Le marquage en nids d'abeille est caractéristique des interfaces sang/cerveau où les jonctions serrées forment une ceinture continue autour de la cellule et scellant ainsi tous les espaces intercellulaires existant entre deux cellules voisines. A l'inverse le marquage désorganisé observé au niveau des tanocytes α est assez curieux d'autant plus que rien dans la littérature ne mentionne ce type de marquage. Nous avons voulu voir si ces différences dans l'organisation se reflétaient au niveau ultrastructural.

MATERIELS & METHODES

2 souris mâles adultes ont été décapitées et les cerveaux rapidement isolés. Le troisième ventricule a été microdisséqué en prenant soin de ne pas endommager l'éminence médiane. L'explant isolé est ensuite fixé par immersion pendant 2 heures à 4°C, dans une solution de tampon phosphate salin 0,1M pH 7,4 et contenant 4% de paraformaldéhyde et 2% de glutaraldéhyde. Les tissus sont ensuite post-fixés dans un tampon phosphate contenant 1% d'osmium tetroxyde pendant 1 heure à température ambiante. Après déshydratation, les tissus sont inclus en Araldite. Des coupes semi-fines (1-2µm d'épaisseur) sont utilisées afin d'identifier la région d'intérêt. Les sections ultrafines (80-90 nm d'épaisseur) sont collectées sur des grilles recouvertes de Parlodion 0,8% acétate-isoamyle (EMS, Fort Washington, PA) et contre-colorées dans un mélange d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb avant l'observation sur un microscope électronique à transmission Zeiss 902 (Leo, Rueil-Malmaison, France).

RESULTATS

L'observation des complexes jonctionnels au niveau des tanocytes de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal en microscopie électronique révèle une différence entre les tanocytes α et les tanocytes β quant à la localisation de ces complexes.

Au niveau des tanocytes de l'EM, les complexes jonctionnels sont situés sur les membranes de deux cellules adjacentes et descendent dans le tissu perpendiculairement à la surface ventriculaire (figure 13C). De façon intéressante, les complexes jonctionnels au niveau des tanocytes du ARH ont une orientation tout à fait différente. Ils sont localisés parallèlement à la surface ventriculaire (Figure 13B). Cependant, la signification de cette orientation est inconnue.

Afin de mieux comprendre ce qui se passe au niveau des tanocytes alpha, nous avons entrepris une collaboration avec le Pr Wolburg (Allemagne). Nous envisageons notamment d'utiliser la méthode de cryofracture afin d'apprécier la complexité des ceintures et l'association des particules avec le feuillet lipidique interne ou externe de la membrane plasmique. Ces paramètres nous donnerons des informations sur la nature et l'étanchéité de ces jonctions.

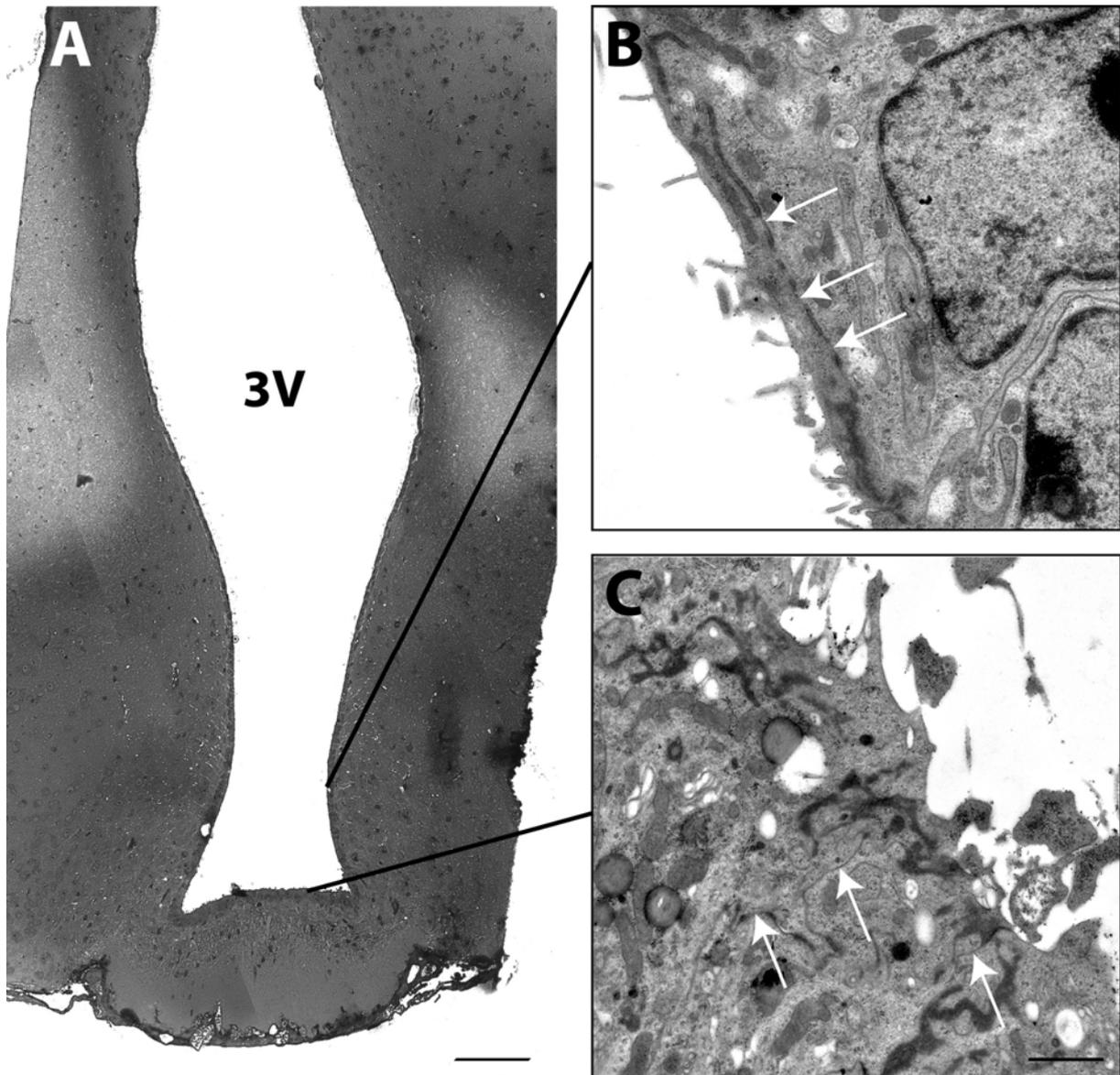


Figure 13 : Localisation à l'échelle ultrastructurale des complexes jonctionnels au niveau des différents tanocytes de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.

A. Coupe semi-fine de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.

B. Visualisation des complexes jonctionnels au niveau des tanocytes du ARH. Les complexes jonctionnels sont localisés parallèlement à la surface du troisième ventricule (flèches).

C. Visualisation des complexes jonctionnels au niveau des tanocytes de l'EM. Les complexes jonctionnels (flèches) sont organisés perpendiculairement à la surface du ventricule et pénètrent dans le parenchyme cérébral où ils assurent la jonction entre deux cellules adjacentes.

Etude de la distribution différentielle des protéines de jonctions serrées selon l'axe antéro-postérieur au niveau des tanocytes de l'hypothalamus médiobasal chez le rat adulte.

Dans l'étude précédente, nous avons mis en évidence les interfaces sang/cerveau au niveau de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal chez la souris adulte. Ici, nous nous avons cherché à savoir comment s'organisent ces interfaces selon l'axe antéro-postérieur. De plus, cette étude a été réalisée chez le rat afin d'évaluer la conservation de ces barrières au niveau des tanocytes entre différentes espèces.

MATERIELS ET METHODES

Douze rats mâles *Sprague Dawley* (Janvier, France) adultes ont été utilisés pour cette étude. Les protocoles de prélèvement des tissus et d'immunohistochimie sont les mêmes que dans l'étude précédente.

La perméabilité de l'hypothalamus a été évaluée par des injections d'une solution saline pH 7,4 contenant 5% de bleu d'Evans dans la veine de la queue. Le volume injecté est de 100 μ L. L'animal est sacrifié par décapitation 20 minutes après l'injection. Ensuite les tissus sont préparés comme énoncé dans l'étude précédente.

L'anticorps dirigé contre la protéine PV-1 nous a gentiment été fourni par le Dr Ciofi (Bordeaux, France) (Ciofi *et al.*, 2009).

RESULTATS

Etude de l'expression des jonctions serrées au niveau de la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal chez le rat adulte

Nous avons réalisé une étude immunohistochimique afin de déterminer si les tanycytes de la région tubérale de l'hypothalamus expriment des protéines de jonctions serrées chez le rat adulte. Nous avons obtenu les mêmes résultats que pour l'étude précédente chez la souris. Les tanycytes β expriment l'occludine, ZO-1, la claudine 5 et la claudine 1 et ce marquage apparaît comme une ceinture continue autour du corps cellulaire de la cellule. Les tanycytes α expriment l'occludine, ZO-1 et la claudine 5 et ce marquage est désorganisé, situé au pôle apical de la cellule. Enfin les cellules épendymaires présentent aussi des nids d'abeilles pour l'occludine, ZO-1 et la claudine 5 (Figures 1, 2 et 3).

Etude de la distribution des jonctions serrées selon l'axe antéro-postérieur de l'hypothalamus médiobasal

Nous avons étudié la distribution des protéines de jonctions serrées et la diffusion du bleu d'Evans injecté de façon systémique sur l'axe antéro-postérieur depuis la région antérieure de l'hypothalamus jusque la fin de la région tubérale. Les résultats indiquent que les premiers tanycytes apparaissent en même temps que les capillaires fenêtrés dans la région antérieure vers bregma -1,78 mm. De façon intéressante, ces tanycytes présentent un immunomarquage en nids d'abeille pour la protéine ZO-1 et émettent un prolongement qui contacte les vaisseaux portes : ce sont des tanycytes β (Figure 4C-E). Lorsque l'on progresse

dans l'axe antéro-postérieur, la proportion de tanocytes au niveau de la paroi ventriculaire augmente. Les tanocytes qui apparaissent alors présentent un immunomarquage désorganisé pour la protéine ZO-1 et ne contactent pas les capillaires fenêtrés : ce sont des tanocytes α (Figure 4C-D). De façon intéressante, le ARH est toujours situé en face des tanocytes α , sauf dans la partie la plus antérieure de l'axe où il se localise entre le troisième ventricule et les capillaires fenêtrés. En parallèle, le bleu d'Evans injecté dans la circulation sanguine diffuse très légèrement dans la partie antérieure de l'hypothalamus et n'atteint jamais le ARH quelque soit le niveau rostro-caudal (Figures 4A et 5A). Pour une vue générale, l'ensemble de ces résultats est synthétisé sur la figure 6.

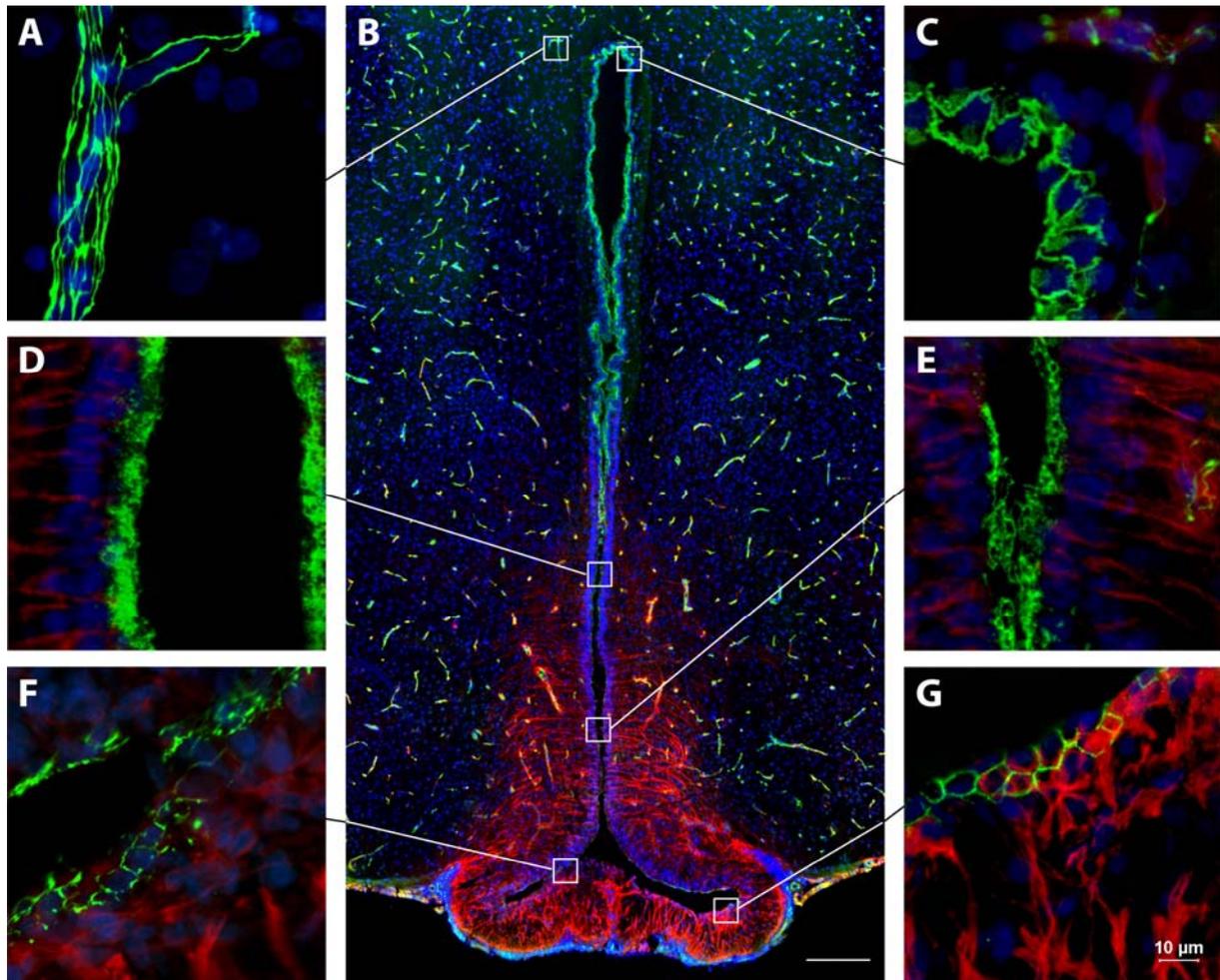


Figure 1 : Distribution de l'occludine dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal chez le rat adulte.

L'occludine (vert) est retrouvée dans les capillaires de la BHE (A) et au niveau de la paroi du troisième ventricule (B). Les tanycytes sont visualisés par leur immunoréactivité pour la protéine de filament intermédiaire nestine (rouge). Alors que les cellules épendymaires présentent un immunomarquage en nids d'abeilles pour l'occludine (C), les tanycytes α situés en dessous présentent un immunomarquage très désorganisé au pôle apical des cellules (D-E). Au niveau des tanycytes β , on retrouve un marquage en nids d'abeilles pour la protéine occludine (F-G). Les noyaux sont contre-colorés au Hoechst (bleu) pour permettre la délimitation des structures. Echelles : 200 μ m pour B et 10 μ m pour G.

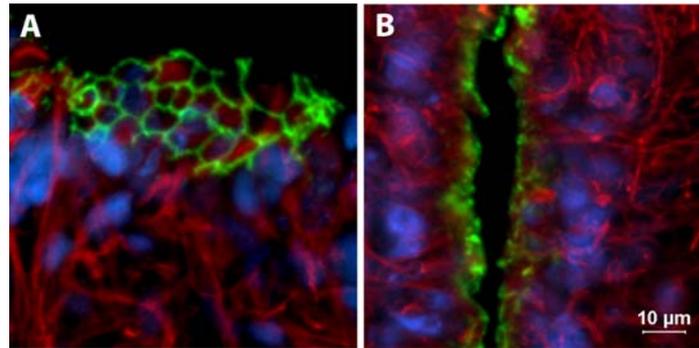


Figure 2 : Expression de la claudine 5 au niveau des tanycytes.

Les tanycytes, visualisés par leur immunoréactivité pour la vimentine (rouge), expriment la claudine 5 (vert). Les tanycytes β ont un marquage en nids d'abeilles (A) alors que les tanycytes α ont un marquage désorganisé. Les noyaux sont contre colorés au Hoechst (bleu).

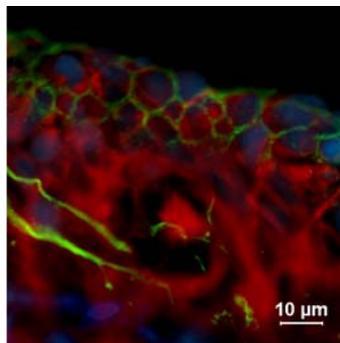


Figure 3 : Expression de la claudine 1 au niveau des tanycytes

Seuls les tanycytes β de l'éminence médiane, visualisés par leur immunoréactivité pour la vimentine (rouge), expriment la claudine 1 (vert) avec un marquage en forme de nids d'abeilles. Les noyaux sont contre colorés au Hoechst (bleu).

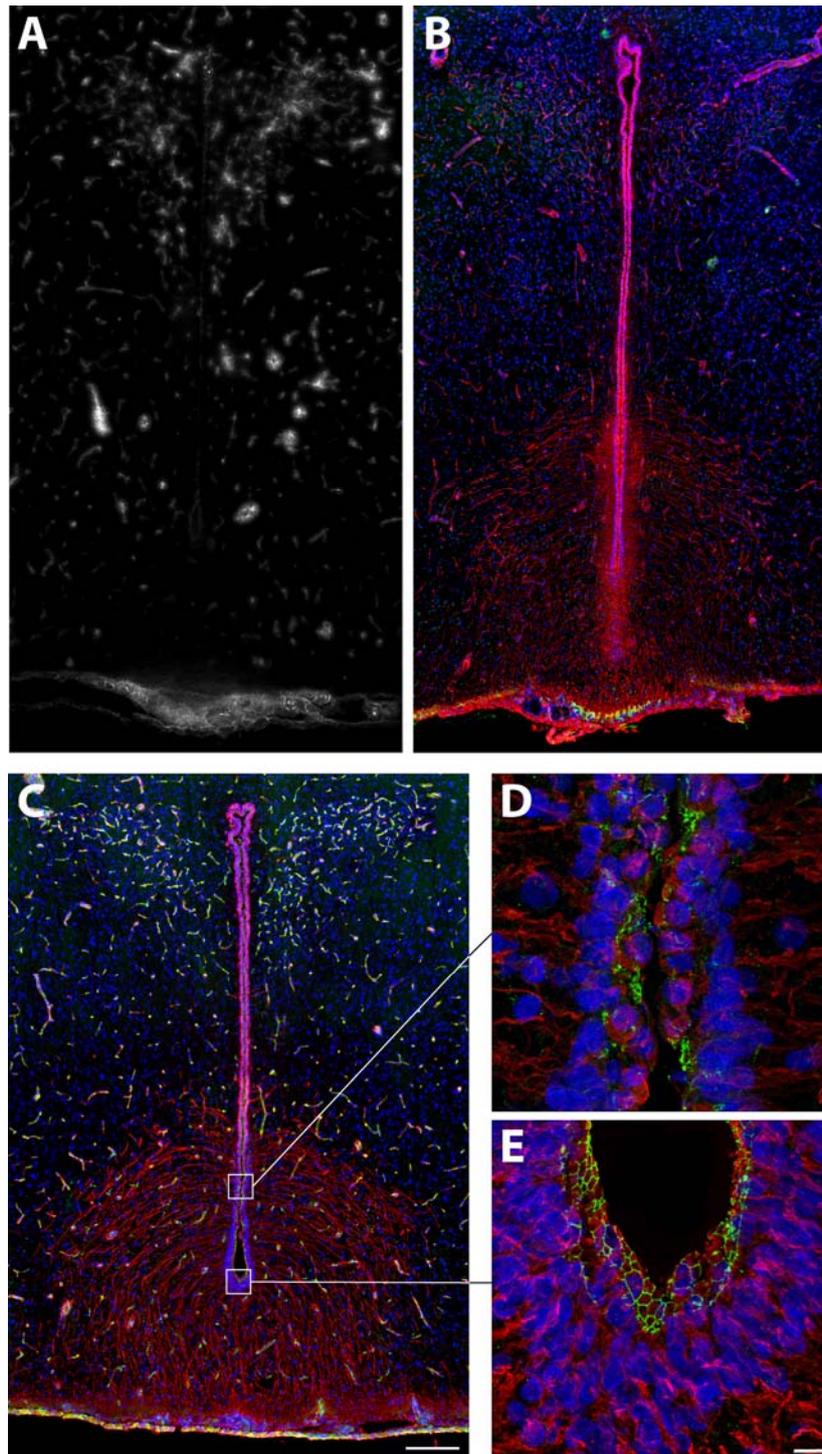


Figure 4 : Corrélation entre la diffusion du bleu d'Evans, les capillaires fenêtrés, et jonctions serrées au niveau des tanocytes dans la région antérieure de l'hypothalamus (Bregma -1,78 mm).

A. Diffusion du bleu d'Evans. **B.** Visualisation des capillaires fenêtrés par leur immunoréactivité pour PV-1 (vert). Les tanocytes sont visualisés par leur immunoréactivité pour la vimentine (rouge). **C-E.** Immunoréactivité pour ZO-1 (vert) et la vimentine (rouge). Les noyaux sont contre colorés au Hoechst (bleu).

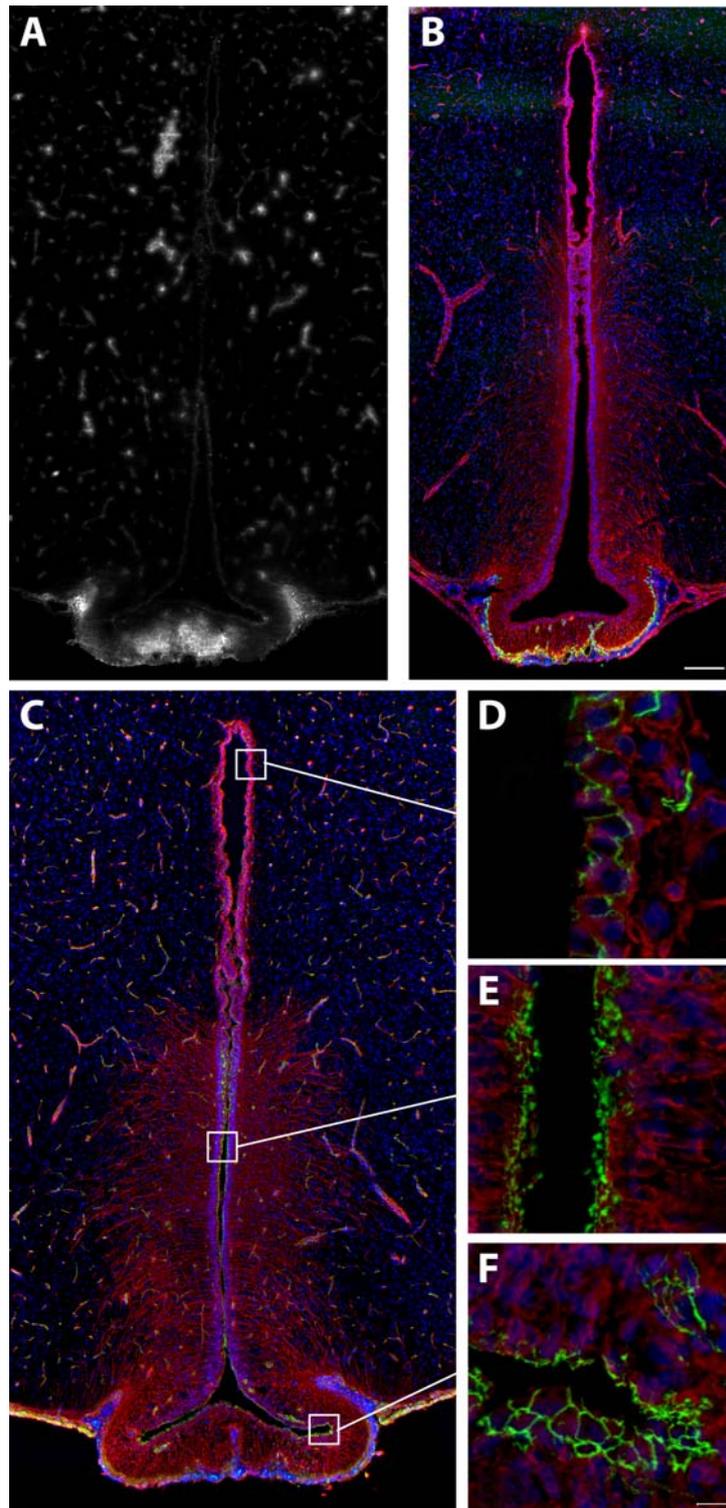
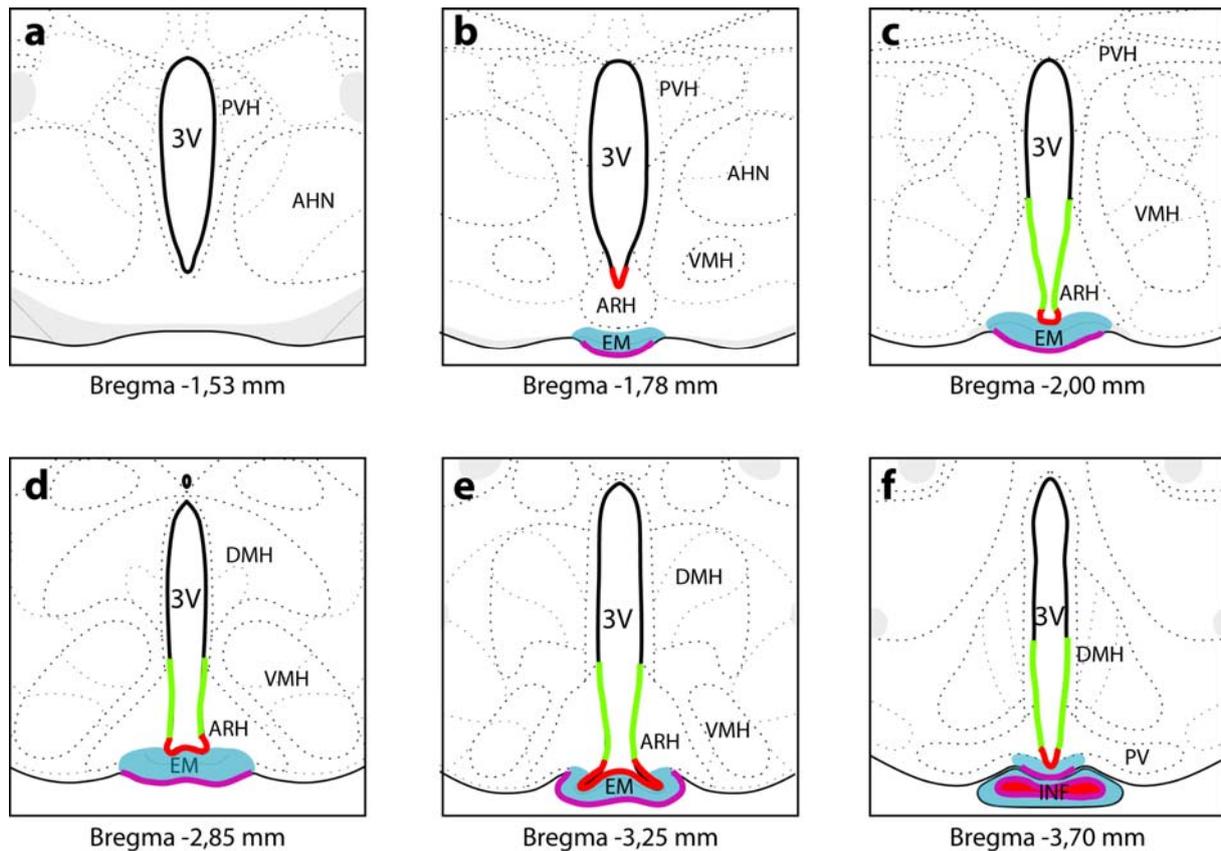


Figure 5 : Corrélation entre la diffusion du bleu d'Evans, les capillaires fenêtrés, et jonctions serrées au niveau des tanocytes dans la région tubérale de l'hypothalamus (Bregma -3,25 mm).

A. Diffusion du bleu d'Evans. **B.** Visualisation des capillaires fenêtrés par leur immunoréactivité pour PV-1 (vert). Les tanocytes sont visualisés par leur immunoréactivité pour la vimentine (rouge). **C-F.** Immunoréactivité pour ZO-1 (vert) et la vimentine (rouge). Les noyaux sont contre colorés au Hoechst (bleu).



Tanycytes α

Tanycytes β

Bleu d'Evans

Capillaires fenêtrés

Figure 6 : Schéma simplifié de la distribution des jonctions serrées et de la diffusion du bleu d'Evans selon l'axe antéro-postérieur chez le rat adulte.

Dans la région antérieure de l'hypothalamus (a), les premiers capillaires fenêtrés apparaissent avec le ARH vers le bregma -1,78 mm. Au niveau de la paroi ventriculaire, l'apparition de ces capillaires fenêtrés coïncide avec l'apparition des premiers tanycytes β (b). En progressant dans la partie postérieure de l'hypothalamus, les tanycytes α apparaissent au dessus des tanycytes β et leur proportion au niveau de la paroi ventriculaire augmente progressivement (c). Le niveau Bregma -2,85 mm correspond au niveau qui a été étudié en détail chez la souris dans l'étude précédente (d). Plus en arrière, la tige hypothalamo-hypophysaire commence à se former (e), piégeant ainsi une partie des tanycytes β et des capillaires fenêtrés (f). Il est important de noter que quelque soit le niveau antéro-postérieur étudié, le bleu d'Evans injecté par la veine de la queue diffuse dans l'éminence médiane mais ne pénètre pas dans le ARH.

Evaluation de la conservation inter espèces : Etude de la distribution différentielle des protéines de jonction serrées dans l'hypothalamus médiobasal chez l'Homme adulte.

L'étude des interfaces sang/cerveau est un champ d'investigation très important pour les laboratoires pharmaceutiques. En effet, l'évolution a doté les organismes supérieurs d'une barrière qui protège le SNC des perturbations homéostasiques et de l'entrée de substances toxiques. Cependant, cette barrière est aussi un obstacle pour l'accès des médicaments au cerveau. Un grand nombre d'entre eux est inefficace juste parce qu'ils n'arrivent pas à franchir la BHE et à atteindre le cerveau. Les OCVs pourraient constituer une autre alternative pour l'entrée des médicaments dans le SNC. Cependant avant d'envisager cette possibilité, il est indispensable dans un premier temps de connaître les bases anatomiques des barrières au niveau de ces OCVs.

Dans cette étude nous avons donc cherché à vérifier si les résultats que nous venons d'énoncer dans les deux précédentes études sont transposables à l'Homme. Nous avons pour cela réalisé une étude immunohistochimique afin d'étudier la présence de jonctions serrées au niveau des tanocytes de la région tubérale de l'hypothalamus humain.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons obtenu un échantillon d'hypothalamus humain issu d'un patient de sexe masculin âgé de 84 ans. Le délai post-mortem était de 10h. Le patient ne souffrait ni de maladie neurologique ni de maladie neuroendocrinologique. Cet échantillon provient d'un patient ayant donné son corps à la science en accord avec la loi française de bioéthique. L'hypothalamus est isolé, inclus dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature embedding medium, Tissue-Tek®, Sakura, France, Villeneuve d'Ascq) préalablement refroidi, congelé dans l'isopentane et stocké à -80°C en attendant d'être coupé au cryostat.

Le protocole d'immunohistochimie est le même que dans les études précédentes. Cependant, afin d'éviter l'autofluorescence liée à l'accumulation de granules de lipofuschine dans les tissus, avant d'être montées les lames sont immergées 10 min dans une préparation de Noir Soudan B (solution à 0,3% dans de l'éthanol 70%) puis rincées 10 fois 10 minutes dans du PBS 0,1M.

RESULTATS

Nous avons pu mettre en évidence la présence de trois protéines de jonctions serrées au niveau de la paroi du troisième ventricule chez l'Homme : l'occludine, ZO-1 (Figure 1) et la claudine 5. Ces trois protéines sont exprimées à la fois par les tanocytes et les cellules épendymaires. L'immunomarquage est organisé en nids d'abeilles qui sont très visibles au niveau des tanocytes situés à la base du ventricule et moins dans les autres types cellulaires.

Nous n'avons pas détecté la claudine 1 sur nos coupes. Cependant, nous ne savons pas si ceci est lié à l'anticorps qui ne reconnaît pas la protéine humaine ou à l'absence de la claudine 1 au niveau des tanocytes. D'autres études en incluant des témoins positifs (par exemple les plexus choroïdes) seront nécessaires afin de valider ce résultat.

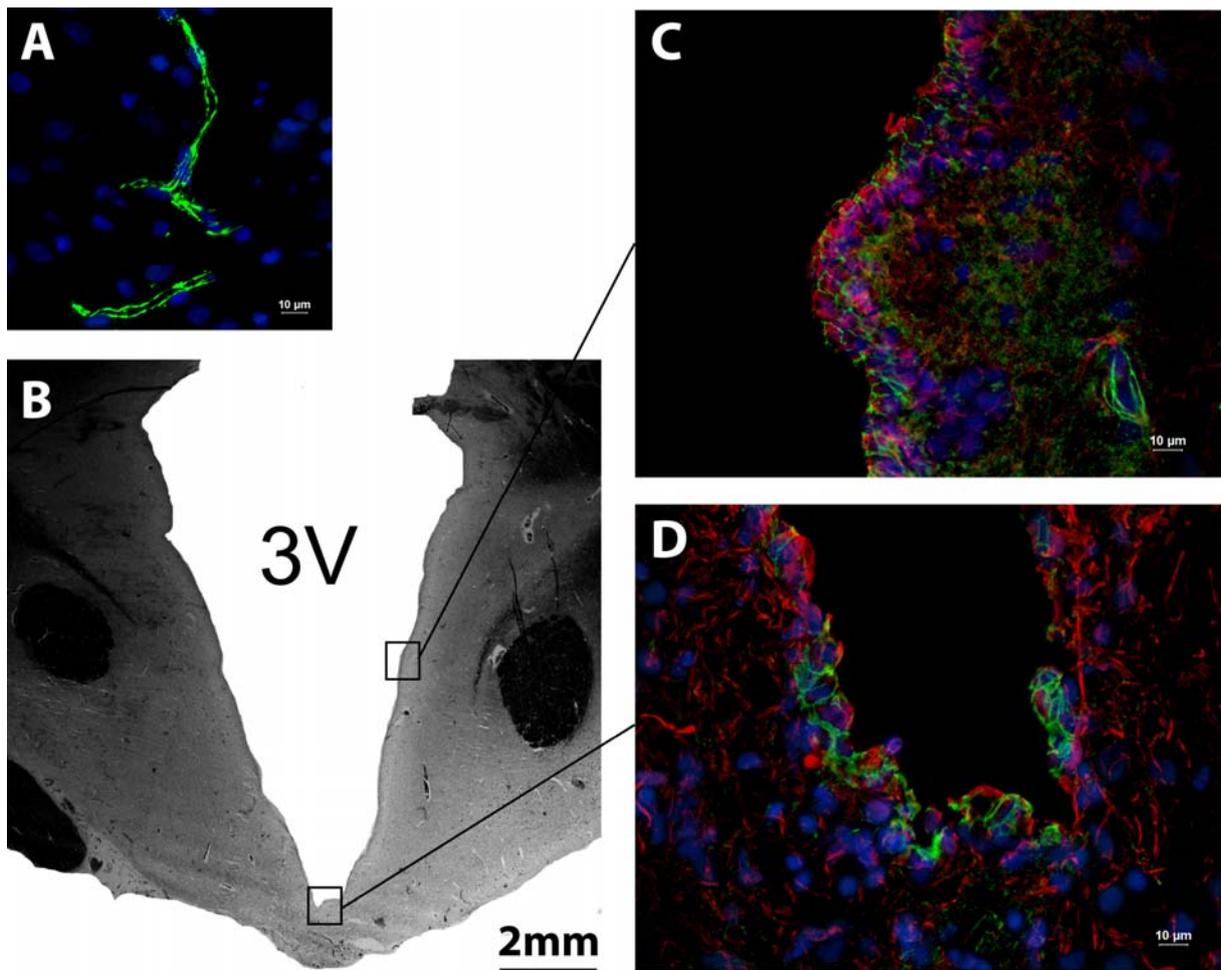


Figure 1 : Immunolocalisation de la protéine ZO-1 au niveau de la paroi du troisième ventricule chez l'Homme âgé.

La protéine ZO-1 (vert) est localisée au niveau des capillaires de la BHE dans le parenchyme cérébral (A). En plus, on retrouve son expression au niveau des cellules bordant le troisième ventricule (B est une coupe colorée au Noir Sudan B). L'immunomarquage pour la protéine ZO-1 semble être organisé en nids d'abeilles au niveau des cellules situées dans la partie haute du ventricule. Ces cellules sont visualisées par un immunomarquage pour la vimentine (rouge) (E). De façon intéressante, l'immunomarquage est plus intense et organisé en nids d'abeilles bien visibles dans la partie inférieure du ventricule où sont localisés les tanocytes (D).

La région tubérale de l'hypothalamus médiobasal est une région clef pour le contrôle de l'homéostasie de l'organisme. Elle s'organise autour du troisième ventricule et constitue une interface tripartite entre le sang, le LCR et les noyaux hypothalamiques. Afin de comprendre comment communiquent ces trois éléments il est indispensable dans un premier temps de connaître les bases anatomiques des interfaces sang/cerveau. L'intérêt pour cette région ne date pas d'aujourd'hui. En effet, depuis les années 70, de nombreuses publications tentent d'éclaircir l'organisation des échanges à ce niveau. La majorité des études a été réalisée au niveau de l'ultrastructure et traite de la diffusion de traceurs corrélée à la présence ou non de jonctions serrées. Cependant, selon les méthodes employées, on trouve beaucoup de divergences dans les résultats. L'utilisation de la fluorescence et des techniques d'immunohistochimie nous a permis de revisiter le problème et de poser les bases anatomiques des interfaces sang/cerveau dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.

LES INTERFACES DE LA REGION TUBERALE DE L'HYPOTHALAMUS MEDIOBASAL : ROLE DES TANYCYTES

Interface sang/LCR : rôle des tanocytes β_2 .

Les tanocytes β_2 forment le plancher du troisième ventricule et envoient leurs prolongements au contact des capillaires du système porte. Ils sont donc situés à l'interface entre le sang et le CSF. Notre étude montre que les tanocytes de l'éminence médiane expriment les protéines de jonction serrée occludine, ZO-1, claudine 5 et claudine1. Ces protéines sont organisées en ceintures continues autour de leur corps cellulaires. En parallèle, l'injection de bleu d'Evans soit dans la circulation sanguine ou dans le LCR montre que les tanocytes β_2 forment une barrière à la diffusion des molécules entre ces deux compartiments.

L'ensemble de nos données concordent ainsi avec les études ultrastructurales montrant la présence de jonctions serrées au niveau des corps cellulaires des tanocytes β_2 (Brightman and Reese, 1969) et avec le fait que la HRP injectée de façon systémique diffuse dans l'EM mais ne passe pas dans le LCR (Brightman *et al.*, 1975). Cependant d'autres auteurs discutent l'étanchéité des jonctions serrées au niveau des tanocytes β_2 et mentionnent la présence de HRP dans l'éminence médiane suite à une injection dans le LCR (Flament-Durand and Brion, 1985; Wagner and Pilgrim, 1974). Il y a plusieurs paramètres à ne pas négliger dans ce type d'expérience. En effet, la quantité de produit injectée n'est pas anodine puisque si le volume est trop important, l'augmentation de la pression et des modifications de l'osmolarité du LCR

peuvent provoquer la diffusion du traceur suite à une détérioration des jonctions serrées (Broadwell *et al.*, 1983). Un autre point a également été soulevé par Peruzzo et ses collaborateurs qui ont récemment démontré que la HRP injectée dans le ventricule latéral peut rapidement atteindre l'EM *via* le liquide subarachnoïdal (Peruzzo *et al.*, 2000). Dans notre étude, la grande citerne est ouverte au moment où le bleu d'Evans est injecté dans le ventricule. Cette technique permet ainsi d'éviter les problèmes d'augmentation de la pression mais également que les molécules ne reviennent par l'espace subarachnoïdal et ainsi n'inondent pas l'EM. Ce protocole a été inspiré du travail de Brightman qui montre par cette méthode que la HRP injectée dans le LCR ne pénètre pas dans l'EM (Brightman *et al.*, 1975).

Interface sang/hypothalamus : rôle des tanocytes $\beta 1$.

Les tanocytes $\beta 1$ bordent les évaginations latérales du renforcement infundibulaire et envoient leurs prolongements au contact des capillaires du système porte. Ils expriment les protéines occludine, ZO-1, claudine 1 et claudine 5 sous forme de nids d'abeilles localisés au niveau des corps cellulaires. Ils forment une barrière à la diffusion du bleu d'Evans entre le sang et le LCR. De façon intéressante, lors d'une injection systémique nous n'avons pas observé de diffusion du colorant depuis l'EM vers le parenchyme adjacent. Ces résultats, d'abord observés chez la souris, sont confirmés chez le rat sur tout l'axe antéro-postérieur. Selon les méthodes employées, de nombreuses études utilisant la HRP sont en accord avec ces données (Brightman *et al.*, 1975; Krisch and Leonhardt, 1978) ou au contraire indiquent que la HRP diffuse jusque dans le ARH (Broadwell *et al.*, 1983; Shaver *et al.*, 1992). Dans notre cas, la diffusion du colorant est arrêtée nettement à la jonction entre l'EM et le ARH suggérant l'existence d'une barrière à ce niveau. Des résultats similaires ont été décrits lors d'injection de HRP directement dans l'EM (Rethelyi and Fockter, 1982) ou inversement dans le ARH (Rethelyi, 1984) où le traceur suit la forme des prolongements des tanocytes $\beta 1$. Bien que des études mentionnent la présence de jonctions serrées au niveau des prolongements des tanocytes $\beta 1$ (Krisch and Leonhardt, 1978), nous n'avons pas détecté par immunohistochimie de protéines de jonctions serrées au niveau des prolongements tanocytaires qui pourraient expliquer cette barrière. D'autres études sont nécessaires afin de comprendre ce phénomène.

Interface LCR/hypothalamus : rôle des tanocytes α et des cellules épendymaires.

La paroi du troisième ventricule est constituée dans sa partie supérieure de cellules épendymaires ciliées. Ces cellules expriment l'occludine, ZO-1 et la claudine 5 sous forme de nids d'abeille. Elles forment une couche étanche à la diffusion du bleu d'Evans depuis le LCR

vers le parenchyme adjacent. Plus bas dans le ventricule, les cellules épendymaires disparaissent progressivement pour laisser place aux tanocytes α qui sont l'unique type cellulaire de la paroi situé au niveau du ARH. Les tanocytes α expriment l'occludine, ZO-1 et la claudine 5 sous forme de marquage désorganisé situé au pôle apical de la cellule. Ils forment une couche perméable à la diffusion du bleu d'Evans depuis le LCR.

L'ensemble de nos résultats diffère avec les autres auteurs puisque, contrairement à eux, nous n'observons pas de diffusion depuis le LCR vers tous les noyaux hypothalamiques en particulier le VMH et le DMH (Brightman *et al.*, 1975). Ces divergences dans les résultats sont certainement dues à la diversité des méthodes utilisées. De façon intéressante, dans notre étude l'absence de diffusion du traceur dans le DMH est corrélée avec le marquage en nids d'abeilles au niveau des cellules épendymaires. A l'inverse, la diffusion du traceur dans le ARH correspond à la désorganisation des protéines de jonctions serrées au niveau des tanocytes α . Cependant, une telle corrélation ne peut être faite au niveau de la zone de transition qui fait face au VMH. En effet, pour qu'une couche de cellules soit étanche, il faut que tous les contacts intercellulaires soient liés par des jonctions serrées d'où le marquage en nids d'abeilles. Dans la zone de transition, la présence à la fois de tanocytes α aux jonctions désorganisées et de cellules épendymaires aux jonctions formant une ceinture continue autour de la cellule ne permet pas d'expliquer l'absence de diffusion dans le parenchyme adjacent. Ceci suggère l'intervention d'un autre facteur dans la régulation des échanges entre le LCR et l'hypothalamus. Les cellules épendymaires sont ciliées et ces cils *via* leurs battements sont directement responsables de la mise en mouvement du LCR. A l'inverse, la partie ventrale du troisième ventricule est constituée uniquement de tanocytes qui ne possèdent pas de cils mais des microvillis qui augmentent la surface d'échange avec le LCR. On peut donc supposer que la présence de cils dans la partie supérieure du troisième ventricule, dont la zone de transition, réduit la diffusion des molécules dans le parenchyme cérébral. Cependant, dans nos conditions expérimentales, l'injection s'effectue sur un temps très court (environ deux minutes). On ne peut pas exclure que si nous laissons le colorant diffuser plus longtemps nous observerions également une pénétration du traceur dans le VMH et le DMH comme l'indiquent les autres auteurs (Brightman *et al.*, 1975; Gotow and Hashimoto, 1981). De plus, des études décrivent que les cellules épendymaires sont relativement perméables aux solutés présents dans le LCR (Gherzi-Egea *et al.*, 1996). A l'inverse, la présence de micovillosités ainsi que l'absence de cils et de jonctions organisées au niveau du ARH favoriseraient la diffusion du traceur.

L'ACCES DES HORMONES PERIPHERIQUES AU ARH

Le ARH est le principal centre d'intégration des hormones périphériques. Il contient notamment les neurones de premier ordre impliqués dans le contrôle de l'équilibre énergétique. Cependant, la façon dont accèdent les hormones circulantes au ARH pour réguler les fonctions neuroendocrines est un sujet de débats depuis de nombreuses années.

Les capillaires cérébraux de l'ARH

Une première hypothèse consiste en un accès des hormones périphériques depuis les capillaires cérébraux présents dans le ARH. Ceci implique un transport des molécules au travers de la BHE notamment par des phénomènes de transcytose médiée par récepteurs. Mais toutes les molécules ne sont pas transportées au niveau de la BHE.

Les auteurs mentionnent également la possibilité d'une BHE plus perméable au niveau du ARH. En effet, des études récentes indiquent que des capillaires de la partie ventromédiale du ARH diffèrent des autres capillaires du parenchyme dans l'expression de certains marqueurs. Les auteurs reportent notamment l'absence d'immunoréactivité pour l'antigène de barrière endothéliale (EBA) (Norsted *et al.*, 2008), protéine aux fonctions peu connues mais dont l'absence au niveau des capillaires est associée à une perméabilité accrue de la BHE (Ghabriel *et al.*, 2000). De plus, certains capillaires expriment des marqueurs de capillaires fenêtrés tels que la dysferline (Norsted *et al.*, 2008). D'autres études décrivent la présence de fenestrations en microscopie électronique (Ciofi *et al.*, 2006) ou encore en immunohistochimie via la détection de PV-1 (Ciofi *et al.*, 2009). Cependant nos études ne nous ont pas permis de visualiser des capillaires fenêtrés immunoréactifs pour MECA32 chez la souris ou PV-1 chez le rat dans le ARH. De plus ceci est corrélé avec le fait que le bleu d'Evans reste confiné dans les capillaires et ne diffuse pas dans le ARH. Toutefois, le bleu d'Evans est un colorant qui se lie à l'albumine, une grosse protéine plasmatique d'environ 68 kDa. On ne peut pas exclure la possibilité que certains capillaires du ARH soient plus perméables aux molécules d'un poids moléculaire inférieur.

Les capillaires fenêtrés de l'EM

Certains auteurs mentionnent que les molécules présentes dans le sang porte peuvent diffuser depuis les capillaires fenêtrés jusque dans la partie ventromédiale du ARH (Broadwell *et al.*, 1983; Shaver *et al.*, 1992). Ceci est en désaccord avec nos données. Cependant, étant donné la proximité entre le ARH et l'EM, on peut légitimement supposer que les neurones du ARH soient capables de détecter les substances présentes dans

l'éminence médiane. Ceci pourrait se faire de deux façons : soit *via* leurs dendrites, soit *via* leurs terminaisons nerveuses. En effet, des études montrent qu'il existe une vraie proximité entre certains neurones du ARH et les capillaires fenêtrés de l'EM (Ciofi *et al.*, 2009), on peut alors supposer que les dendrites de ces neurones sont directement exposés à la circulation sanguine. Enfin, le ARH contient de nombreux neurones hypophysiotropes qui se projettent dans l'EM au contact des capillaires fenêtrés du système porte. Cependant, le concept selon lequel les neurones sont capables de capter des signaux extérieurs *via* leurs terminaisons nerveuses n'a jamais été démontré.

Le LCR

On ne peut pas exclure que certaines hormones puissent être transportées par les plexus choroïdes depuis le sang vers le LCR. Ensuite ces macromolécules pourraient diffuser depuis le LCR dans le ARH, ce qui est en accord avec nos données. Cependant il pourrait exister une autre voie d'accès au LCR plus proche du ARH ; c'est l'éminence médiane et ses tanocytes β qui constituent un véritable lien entre le sang et le LCR.

En effet, nous avons montré que les tanocytes β possèdent des jonctions serrées étanches. Ces cellules allongées forment une interface entre le sang et le LCR. La présence de jonctions serrées indique que les tanocytes sont des cellules polarisées. Ceci est vérifié par l'expression différentielle de certaines protéines au niveau de la membrane telles que GPR50 (Sidibe, Mullier *et al.*, 2010 *in press*) ou le récepteur de l'IGF-1 (Cardona-Gomez *et al.*, 2000). De plus, les tanocytes possèdent toute la machinerie nécessaire pour la transcytose de molécules telle que de nombreuses mitochondries et vésicules et la cavéoline-1 (Peruzzo *et al.*, 2004). Tous les éléments sont donc réunis pour émettre l'hypothèse que les tanocytes de l'éminence médiane puissent réguler les échanges entre le sang et le LCR *via* un mécanisme de transcytose spécifique médiée par récepteurs. De plus, l'absence de cils et la présence de microvillosités dans la base du troisième ventricule suggèrent fortement que les molécules atteignant le LCR par la voie des tanocytes sont dans des conditions favorables à leur diffusion vers le ARH. Enfin, des études complémentaires sont nécessaires afin de valider cette hypothèse.

INTERFACES SANG/CERVEAU DE L'HYPOTHALAMUS MADIOBASAL SUIVANT L'AXE ANTERO-POSTERIEUR

L'étude de l'axe antéropostérieur effectué chez le rat confirme et renforce les résultats obtenus chez la souris. En effet, cette étude réaffirme :

- La fonction de barrière de diffusion des tanocytes β entre le compartiment sanguin et le LCR.
- L'absence de vaisseaux fenêtrés au niveau du ARH ainsi que l'accès restreint à l'EM des molécules systémiques.
- L'absence de jonctions serrées correctement organisées au niveau des tanocytes de l'ARH.

De plus, cette étude met en avant l'organisation différentielle des protéines de jonctions serrées suivant le lieu de projection des pieds tanocytaires, à savoir les capillaires fenêtrés pour les tanocytes β et les capillaires de la BHE pour les tanocytes α . Ces résultats suggèrent la nécessité d'une intercommunication entre les cellules endothéliales et les tanocytes pour la formation de jonctions serrées étanches et donc pour la polarisation des tanocytes.

INTERFACES SANG/CERVEAU DE L'HYPOTHALAMUS MEDIATE BASAL HUMAIN

Nous avons essayé d'approcher l'anatomie des interfaces sang/cerveau chez l'Homme. Cette étude nous a permis de montrer l'expression de l'occludine, ZO-1 et la claudine 5 au niveau des tanocytes du troisième ventricule suggérant ainsi que chez l'Homme, les tanocytes de l'hypothalamus médiate basal constituent également une interface sang/cerveau.

Cependant, la claudine 1 n'a pas été détectée sur les coupes d'hypothalamus humain et nous n'avons également pas pu observer de distribution différentielle des protéines de jonctions serrées au niveau de la paroi ventriculaire. Ces résultats peuvent être liés à plusieurs raisons. En effet, la technique d'immunohistochimie sur tissus humains se heurte à des difficultés importantes principalement dues aux délais post-mortem et donc à des problèmes de conservation des tissus. Ce délai post-mortem doit absolument être réduit au minimum. De plus, rien n'indique que des anticorps pourtant bien caractérisés sur des tissus d'origine animale le soient également sur des tissus humains. L'âge du patient ainsi que ses antécédents cliniques peuvent également être en cause. En effet, depuis quelques années des altérations de la BHE liées aux maladies cérébro-vasculaires mais aussi à la vieillesse et aux maladies neurodégénératives sont largement documentées (voir pour revue Popescu *et al.*, 2009). Ceci pourrait également être vrai pour les tanocytes s'ils sont bien impliqués dans la régulation des échanges sang/cerveau au niveau de l'hypothalamus médiate basal chez l'Homme.

Enfin, on ne peut pas exclure la possibilité que chez l'Homme, des mécanismes différents soient impliqués dans la régulation des échanges entre le sang porte et les noyaux hypothalamiques. Ceci est d'autant plus probable que la morphologie de l'éminence médiate est très différente de celle étudiée chez le rat ou la souris. Des études préliminaires du

laboratoire montrent notamment que le noyau infundibulaire (ou ARH) est localisé près de l'entrée du récessus infundibulaire et s'étend jusque dans l'éminence médiane. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de comprendre comment sont organisés les différentes interfaces sang/cerveau au niveau de l'hypothalamus médiobasal chez l'Homme.

Ce travail de thèse a permis d'éclaircir les bases anatomiques des interfaces sang/cerveau dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal. Pour la première fois, la nature moléculaire des jonctions serrées au niveau des tanocytes a été décrite et corrélée avec des propriétés de perméabilité. Ces résultats viennent renforcer le rôle supposé des tanocytes dans la régulation des échanges entre le sang et le SNC.

Dans le but de compléter cette étude, il est maintenant indispensable de démontrer clairement l'implication des tanocytes dans des phénomènes de transcytose reliant le LCR au compartiment sanguin. Pour arriver à cette fin plusieurs axes de recherche sont à envisager. Nous pourrions dans un premier temps étudier la polarisation des tanocytes. En effet, des études préliminaires montrent que les tanocytes *in vitro* expriment les protéines de jonctions serrées mais lorsqu'elles sont cultivées seules, ces cellules ont du mal à s'orienter. On peut donc supposer que, de la même façon que les astrocytes induisent les propriétés de la BHE, les tanocytes pourraient interagir avec un autre type cellulaire. Nos études montrent une étroite relation entre les tanocytes β et les capillaires fenêtrés du système porte sur tout l'axe antéro-postérieur. A l'inverse, les tanocytes α sont associés à des capillaires de la BHE. On peut émettre l'hypothèse que la distribution différentielle des protéines de jonctions serrées entre les deux types de tanocytes (c'est-à-dire nids d'abeilles *versus* marquage désorganisé) serait une conséquence directe de la communication entre tanocytes et cellules endothéliales. Si tel est le cas, alors les tanocytes ont besoin d'être « guidés » par les cellules endothéliales fenêtrées pour acquérir leur forme bipolaire caractéristique et former des jonctions serrées efficaces *in vitro*. Ces études pourront être menées au laboratoire où les techniques permettant d'isoler les capillaires fenêtrés de l'éminence médiane et/ou les capillaires de la BHE sont disponibles. On peut donc dans un premier temps vérifier l'hypothèse que la communication entre tanocytes et cellules endothéliales est un élément déterminant la mise en place des jonctions serrées et à la polarisation des tanocytes. Ensuite, il sera intéressant de mettre au point un modèle *in vitro* de la barrière tanocytaire afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la transcytose de molécules *via* les tanocytes.

L'établissement de ce modèle *in vitro* permettrait entre autres de tester l'hypothèse que les tanocytes sont impliqués dans le transport de la leptine au SNC. Dans ce cas, on pourrait alors émettre l'hypothèse que les phénomènes de leptinorésistance observés chez les patients obèses seraient dus à une altération de la barrière tanocytaire conduisant à une altération du transport de la leptine vers le SNC. Quoiqu'il en soit, en attendant le modèle *in vitro*, une

première étape pour vérifier cette hypothèse pourrait consister à réaliser une étude anatomique couplée à des injections de traceurs sur des animaux rendus obèses par un régime gras.

Nos résultats permettent également d'envisager d'autres champs de recherche tels que la régulation des interfaces sang/cerveau dans l'hypothalamus médiobasal. Bien que n'étant pas organisées, des protéines de jonctions serrées sont exprimées au niveau des tanocytes α . Comme évoqué au cours de ce manuscrit, les jonctions serrées sont des structures dynamiques intimement liées aux voies de signalisation cellulaire sous-jacentes et qui peuvent être le siège d'une certaine régulation. On peut alors supposer par exemple que les tanocytes α dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques voient leurs protéines de jonctions serrées se rassembler à la membrane plasmique et former des jonctions serrées entre cellules adjacentes, bloquant ainsi temporairement les échanges entre le LCR et le ARH. Etant donné que la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal est une région fortement impliquée dans la fonction de reproduction et que les tanocytes sont doués d'une certaine plasticité, nous pourrions dans un premier temps réaliser cette étude morphologique chez la femelle afin de voir s'il existe des variations au cours du cycle oestral.

Depuis quelques années, l'implication de la période néonatale dans la programmation des maladies métaboliques à l'âge adulte est de plus en plus évidente. En effet, des études montrent que la période néonatale est une période critique pour l'établissement des réseaux neuronaux à l'âge adulte et que les hormones périphériques telles que la leptine jouent un rôle crucial dans ce phénomène. Aussi, serait-il intéressant d'étudier la régulation des échanges sang/cerveau au cours de cette période et notamment d'étudier la mise en place de la barrière tanocytaire.

Enfin, il sera également important de compléter les résultats obtenus chez l'Homme. En effet, la connaissance des bases anatomiques des interfaces sang/cerveau est un pré-requis essentiel si l'on veut envisager l'étude de l'accès des médicaments au cerveau *via* les tanocytes.

Etude de l'expression de la protéine GPR50 dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.

Au cours de ma thèse, mes connaissances concernant la morphologie de l'hypothalamus médiobasal m'ont permis d'être engagée dans diverses collaborations scientifiques. L'une d'entre elles porte sur le récepteur orphelin de la mélatonine GPR50. Dans cette étude, nous avons cherché à analyser l'expression de cette protéine dans la région tubérale de l'hypothalamus médiobasal.

Cette étude fait l'objet d'une publication acceptée dans le *Journal of Pineal Research*.

Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanycytes and median eminence

Abstract: The melatonin receptor family is composed of three members, MT₁ and MT₂ receptors that bind melatonin with high affinity and the orphan GPR50 that does not bind melatonin but shares significant sequence homology with the two other subtypes. In the absence of any known ligand for this orphan receptor, little is still known about its function. We recently reported the development of the first anti-GPR50 antibodies that reliably recognized the recombinant human GPR50. We here used these antibodies to study the expression of GPR50 in mouse, rat and human hypothalamus, a region reported to express GPR50 mRNA. GPR50 immunoreactivity (ir) was observed in dorsomedial hypothalamic (DMH) cells co-stained with the neuronal marker HuC/D. GPR50-ir was also observed in cells of the ependymal layer of the third ventricle that co-stained with vimentin. More specifically, its localization in the lower region of the third ventricle and along the long basal processes contacting portal blood vessels in the median eminence (ME) suggested expression of GPR50 in tanycytes. Consistent staining patterns were observed in all three species with two different antibodies. Taken together, our study validates two GPR50-specific antibodies for the use in rodent and human tissue. Evolutionary conserved expression of GPR50 in DMH neurons and tanycytes, together with previously reported expression of the receptor in the pituitary, support the potentially important role of GPR50 in key hypothalamic functions, including regulation of the hypothalamo-pituitary axes.

Anissa Sidibe^{1,2,*}, Amandine Mullier^{3,*}, Patty Chen^{1,2}, Marc Baroncini^{3,4}, Jean A. Boutin⁵, Philippe Delagrang⁵, Vincent Prevot³ and Ralf Jockers^{1,2}

¹Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS, Paris, France; ²Inserm, U1016, Paris, France; ³Inserm, Jean-Pierre Aubert Research Center, Lille, France; ⁴Laboratoire d'Anatomie, Faculté de médecine, Université Lille 2, Lille, France; ⁵Institut de Recherches SERVIER, Suresnes, France

Key words: GPCR, GPR50, melatonin, MRR, orphan receptor

Address reprint requests to Ralf Jockers, Institut Cochin, 22 rue Mechain 75014, Paris France.

E-mail: ralf.jockers@inserm.fr

*Equal contribution of these two authors.

Received November 11, 2009; accepted December 23, 2009.

Introduction

The neurohormone melatonin is involved in many different physiological processes including regulation of circadian and seasonal rhythms, of retinal physiology and energy homeostasis [1]. Additional effects, most likely due the intrinsic antioxidant properties of melatonin and its metabolites have also been reported [2]. Molecular targets of melatonin can be divided into two groups, the recently characterized enzyme quinone reductase 2 and seven transmembrane-spanning G protein-coupled melatonin receptors [3]. The melatonin receptor subfamily is composed of three members in mammals, MT₁ and MT₂ that bind melatonin with high affinity and the orphan GPR50 protein that does not bind melatonin or any other known ligand [4]. GPR50 has been classified as member of the melatonin receptor subfamily because of its high sequence homology (45%) with MT₁ and MT₂ and the presence of characteristic amino acid motifs. More recently, this classification was further supported by studies of the synteny of the GPR50 gene indicating that GPR50 is the eutherian ortholog of Mel1c, a true melatonin receptor found in fish and avian species [5]. It is interesting to note that GPR50 expression is maintained in mammals despite the apparent loss of melatonin binding suggesting the

presence of further currently unknown ligand-dependent or ligand-independent functions of GPR50 [6]. The potential importance of GPR50 in humans has been underlined by genetic studies. Variants in exon 2 of the GPR50 gene were associated with major depression in females [7] and with modified lipid metabolism [8]. However, the consequences of these variants on GPR50 function are currently unknown.

Several studies attempted to elucidate the function of GPR50 using different approaches. Pharmacological studies showed that GPR50 might be involved in the regulation of the melatonin signal itself by inhibiting the function of MT₁ receptors in MT₁/GPR50 heterodimers in those cells coexpressing both proteins [9]. Biochemical studies revealed that GPR50 directly interacts with NOGO A and might be associated with neurite outgrowth [10]. Mice lacking functional GPR50 by inserting the lac Z into the GPR50 coding region show increased activity and metabolic rate and a partial resistance to diet-induced obesity [11]. Furthermore, GPR50 mRNA levels are decreased under short-day conditions in Siberian hamster [12] and by fasting and energy-rich diet in mice suggesting a role of GPR50 in energy sensing [11].

In situ hybridization studies showed expression of GPR50 mRNA in the ependymal layer and the DMH

and several other central and peripheral sites [13, 14]. However, little is known about the expression of GPR50 at the protein level in the absence of immunohistochemical studies and weak expression levels of the lac Z gene in GPR50 knockout mice [11].

Development of antibodies raised against members of the melatonin receptor subfamily represents a major bottleneck. Despite more than 10 yr of intense research on MT₁ and MT₂ receptors, no validated antibody is currently available to detect these receptors in rodents. We recently developed antibodies that reliably detect the recombinant human GPR50 in transfected cells [15]. Preliminary studies in human hippocampus and rat pituitary suggested that these antibodies might be useful tools for the detection of GPR50 in rodents and humans. Here, we validated two of these antibodies by detecting the expression of the GPR50 protein in the mouse, rat and human hypothalamus, a region where GPR50 mRNA expression has been consistently observed [11, 13, 14, 16].

Experimental methods

Tissues

Five adult male C57Black6 mice (Charles River, France) and five adult male Sprague Dawley rats (Janvier, France) were used in this study. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC) and the experimental protocols were approved by the local institutional research animal committee. Animals were maintained on a controlled light cycle (14 hr on/10 hr off) and provided with food and water *ad libitum*. The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (8%; 350 mg/kg) and were perfused transcardially with 0.9% saline. The brains were quickly removed, embedded in ice-cold OCT, frozen in isopentane (−55°C) and stored at −80°C until sectioning.

Human hypothalamic tissue was obtained 10-hr post-mortem from an autopsied 84-yr-old man. A review of medical records indicated that specimen was obtained from individual with no neurological or neuroendocrinological disorder. The brain sample was taken from patient that donated body to Science in compliance with the French laws on bioethics. Structures inside and outside the human brain were identified by reference to an atlas of the human brain [17]. Briefly, the hypothalamus was isolated, embedded in ice-cold OCT (Optimal Cutting Temperature embedding medium, Tissue-Tek®, Sakura, France, Ville-neuve d'Ascq), frozen in isopentane (−55°C) and stored at −80°C until sectioning.

Antibodies

Polyclonal antibodies were generated in rabbits against the KPASVHFKGDSVHFK peptide (GPR50 pAb5), and LIDVDADSDMAV peptide (GPR50 pAb7), and the IgG fraction purified as described [15]. Both antibodies have been shown to selectively recognize the recombinant human GPR50 [15]. GPR50 pAb5 and pAb7 were used at 1 and 1.5 µg/mL, respectively, and blocking peptides corre-

sponding to the epitopes at 0.1 and 0.15 mg/mL, respectively.

The mouse monoclonal anti-HuC/D purchased from Molecular Probes, Invitrogen (San Diego, CA, USA) was used at dilution 1:500; immunogen: purified human HuC/D neuronal protein. The HuC/D antiserum recognized the Elav family members HuC, HuD, and Hel-N1, which are all neuronal proteins. The antibody labelled neuronal cell nuclei and perikarya. The expression pattern of HuC/D protein was similar to that of reported mRNA [17].

The mouse monoclonal anti-vimentin clone V9 purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France) was used at dilution 1:1000; immunogen: purified pig eye lens vimentin. This antibody reacts with human and rat vimentin.

The chicken polyclonal anti-vimentin purchased from Chemicon (Temecula, CA, USA) was used at dilution 1:2000; immunogen: recombinant Syrian gold hamster vimentin. This antibody reacts with mouse vimentin. The two vimentin antiseras produced a pattern of staining similar to that described previously in human, mouse and rat [18–20].

SDS-PAGE and Western blot

Mouse hypothalamus tissue was homogenized in buffer (25 mM Tris/HCl pH 7.4, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl₂) and protein concentrations were measured by the BCA assay according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL, USA). Eighty microgram of protein lysates were mixed with SDS-PAGE loading buffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 5% SDS, 10% glycérol, 100 mM dithiothreitol, 0.05% bromophenol blue) and solubilized overnight at room temperature. Prior to protein separation by SDS-PAGE, samples were heated at 95°C for 5 min. The Western blotting was performed as previously described [15].

Immunohistochemistry

Using a cryostat, 20-µm serial frozen sections were cut and collected on chrome-alum-gelatin-coated slides. Slide-mounted sections were fixed by immersion for 10 min at 4°C in 2% paraformaldehyde and processed immediately for immunohistochemistry. Sections were rinsed four times in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4) and blocked for 1 hr using blocking solution (PBS containing 4% normal goat serum and 0.3% Triton X-100) at 4°C. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in blocking solution. The sections were then subjected to four washes in 0.1 M PBS and were incubated for 1 hr at room temperature with a mix of secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (1:500 dilution; all purchased from Molecular Probes, Invitrogen) in the blocking solution. The sections were rinsed four times in 0.1 M PBS. A nuclear counterstaining operation was performed by incubating the sections for 1 min in Hoechst (1:1000 dilution; Molecular Probes, Invitrogen) diluted in 0.1 M PBS. Finally, sections were washed four times in 0.1 M phosphate buffer and coverslipped using Permafluor® (ThermoFisher, Illkirch, France). The slides were

stored at 4°C until analysis. To assess the specificity of pAb5 and pAb7 in immunohistochemistry, the method described above was used with the exception that GPR50 antibodies were preincubated for 8 hr with an excess of peptide corresponding to their respective epitopes.

Microscopic analysis

Sections were analyzed using an Axio Imager.Z1 ApoTome microscope (Zeiss, Germany), equipped with a motorized stage and an AxioCam MRm camera (Zeiss, Germany). Specific filter cubes were used for the visualization of green (EX: 475/40 nm, DM: 500 nm, BA: 530/50 nm), red (EX: 550/25 nm, DM: 570 nm, BA: 605/70 nm), and UV (bis-benzimide) fluorescence (EX: 365 nm, DM: 395 nm, BA: 445/50 nm).

To create photomontages, single-plane images were captured using the MosaiX module of the AxioVision 4.6 system (Zeiss, Germany) and a Zeiss 20X objective (N.A. 0.8) for each fluorophore sequentially. Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) was then used to process and merge the photomontages.

High magnification microphotographs represent maximal intensity projections derived from 20 to 25 triple-epoTome images collected using the z-stack module of the AxioVision 4.6 system and a Zeiss 63X oil immersion objective (N.A. 1.4). All images were captured in a stepwise fashion over a defined z-focus range corresponding to all visible staining within the section and consistent with the optimum step size for the corresponding objective and the wavelength ($\lambda = 500$ nm).

Results

Converging evidence suggest that the hypothalamus might be a major expression site of the orphan GPR50. To verify this hypothesis on the protein level, we used two previously developed polyclonal antibodies against two different epitopes of the carboxyl terminal tail of GPR50 (pAb5 and pAb7) [15]. Mouse hypothalamus tissue lysates were separated by SDS gel electrophoresis and probed with pAb5 and pAb7 in western blots (Fig. 1). Both antibodies showed a similar staining pattern with an immunoreactive band of approximately 65 kDa corresponding to the previously reported size of the recombinant human GPR50 monomer [15]. Further bands with higher molecular weight were observed, most likely corresponding to oligomeric forms of GPR50 as previously reported [9]. Similar results were obtained with tissue lysates from rat hypothalamus (not shown).

Immunofluorescence staining patterns were first studied in mouse tissue and then compared to rat and human tissues. Strong GPR50-ir was observed in three different regions of the mouse hypothalamus, the dorsomedial hypothalamus (DMH), the ependymal layer of the third ventricle and the median eminence (ME) (Figs 2 and 3). Similar staining patterns were observed with both anti-GPR50 antibodies further supporting the specificity of the labeling (pAb5: Fig. 2; pAb7: Fig. 3). No labeling was seen when primary antibodies were omitted or when primary antibodies were preincubated with immunogenic peptides

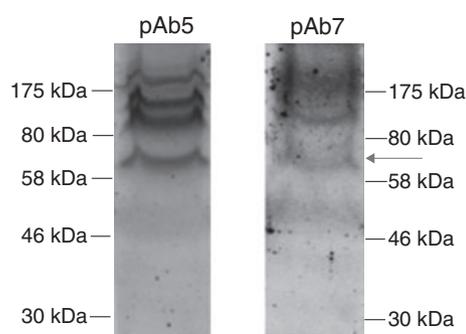


Fig. 1. Western blot detection of rat GPR50 by purified antibodies 5 (pAb5) and 7 (pAb7). Lysates from mouse hypothalamic tissue lysates were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. GPR50 monomers (indicated by arrow) and oligomers were detected.

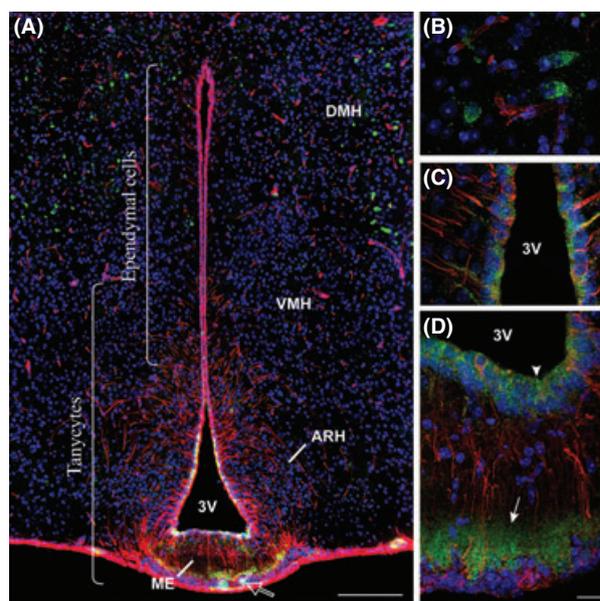


Fig. 2. Microphotographs showing the distribution of polyclonal purified antibody 5 and vimentin-ir in coronal sections of the tuberal region of the mouse hypothalamus. (A) Low magnification photomontage of pAb5 (green) and vimentin (red) immunofluorescences. pAb5-ir was found in the DMH, tanycytes, ME and in cells of the *pars tuberalis* that lie outside of the capillary zone (empty arrow). (B) High magnification image showing pAb5-ir cells in the DMH. (C, D) High magnification images showing the distribution of pAb5 in tanycytes (C and D, arrowhead) and the external zone of the median eminence (D, arrow). Tanycytes are visualized in red by their immunoreactivity for the cytoskeleton protein vimentin. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus, ME, median eminence; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus. Scale bar = 200 μ m in A; 20 μ m in D.

(Figs S1 and S2). Ependymal GPR50 staining was confined to the basal part typically corresponding to tanycytes (Figs 2C, D and 3D). The identity of tanycytes was further confirmed by the co-staining of the intermediate filament

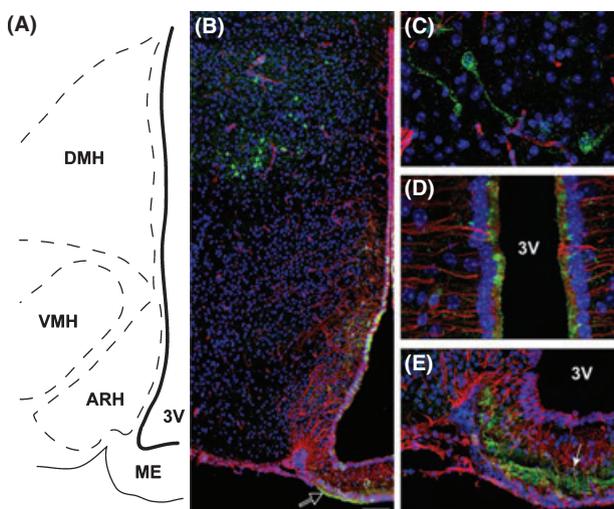


Fig. 3. Microphotographs showing the distribution of polyclonal purified antibody 7 and vimentin-ir in coronal sections of the tuberal region of the mouse hypothalamus. (A) Schematic drawing of the tuberal region of the mouse hypothalamus. (B) Low magnification photomontage of pAb7 (green) and vimentin (red) immunofluorescences. pAb7-ir was found in the DMH, tanycytes, median eminence and in cells of the *pars tuberalis* that lie outside of the capillary zone (empty arrow). (C) High magnification image showing pAb7-ir cells in the DMH. (D,E) High magnification images showing the distribution of pAb7 in tanycytes (D) and the external zone of the median eminence (E, arrow). Tanycytes are visualized in red by their immunoreactivity for the cytoskeleton protein vimentin. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus, ME, median eminence; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus. Scale bar = 200 μm in B; 20 μm in E.

protein vimentin with GPR50 in the soma of cells located at the border of the third ventricle and extending long and slender vimentin-positive processes toward the nervous parenchyma and, within the ME, in tanycytic endfeet contacting the portal blood capillaries (Figs 2D and 3E, arrows). At the ME, some GPR50-ir was also seen outside of the capillary zone in endocrine-like cells of the *pars tuberalis* (Figs 2A and 3B, empty arrows). In addition, GPR50-ir was observed in individual cell bodies and neuritis of DMH cells (Figs 2B and 3C). Extensive co-staining of GPR50 positive cells with the neuronal HuC/D marker protein indicated that GPR50 is expressed in neurons of the DMH (Fig. 7A–C).

Similar to the mouse hypothalamus, GPR50-ir in rat hypothalamic slices was strongly observed in tanycyte cell bodies at the border of the third ventricle co-stained with vimentin (Fig. 4C,E). Staining was also seen in the ME within tanycyte endfeet and/or nerve terminals, cells of the *pars tuberalis* (Fig. 4B,C,F) and in DMH cell bodies and neuritis (Fig. 4D) that co-stained with the neuronal HuC/D marker protein (Fig. 7D–F). Labeling of human hypothalamic slices further confirmed the presence of GPR50 immunoreactivity in tanycytes on the border of the third ventricle (Fig. 5A–C), in the ME (Fig. 5D) and in cell bodies and neuritis of DMH neurons (Figs 6 and 7G–I). Notably, a similar staining pattern was observed in human

hypothalamic sections with pAb7 further supporting the specificity of the labeling (data not shown).

Discussion

We report here the first GPR50 expression profile on the protein level in mouse, rat and human hypothalamus. GPR50-ir was particularly observed in the DMH, the ependymal layer of the third ventricle and the ME. Localization of GPR50 in these regions is consistent with previous *in situ* hybridization results [13, 14, 16]. Several precautions were taken to ascertain the specificity of the labeling: (1) use of antibodies validated with recombinant GPR50, (2) detection of a protein of the expected molecular size for GPR50 in western blots of hypothalamic tissue lysates, (3) use of two different antibodies recognizing two different epitopes of GPR50, (4) displacement of staining by immunogenic peptides, (5) comparison of labeling pattern in three different species (mouse, rat, human).

GPR50 expression in the DMH was shown by several groups in *in situ* hybridization experiments [13, 14, 16]. However, GPR50 expression in the DMH was not confirmed in GPR50 knockout mice most likely due to weak expression levels of the inserted lac Z gene [11]. Our immunofluorescence data confirm now GPR50 expression in the DMH on the protein level. Extensive co-staining was observed with the neuronal HuC/D marker protein indicating that GPR50 is widely expressed in a sub-population of DMH neurons but not in astrocytes. Whereas cell bodies stained always positive for GPR50, neurite staining was only occasionally observed.

The DMH is an important nodal point of neuroendocrine/autonomic circuitries with projections coming from the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) and the lateral hypothalamic area (LHA) and going to the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH) [21]. The DMH is part of a 'fear circuitry' regulating cardiovascular responses to stress such as myocardial blood flow and the tachycardia associated with the defense reaction. Moreover, the DMH is involved in the final common pathway of corticotrophin-releasing hormone (CRH) secretion by the PVN, sympathetic nervous system outflow to the adrenal gland, and brown adipose tissue (BAT) thermogenesis. Recent data suggest that the DMH contains a Bmal1-based circadian oscillator that is food-entrainable [22]. The increased metabolic rate and partial resistance to diet-induced obesity of GPR50 knockout is consistent with the function of the DMH in energy homeostasis. Increased corticosterone levels and hyperactivity of GPR50 knockout mice suggest an increased stress response, which might also involve the DMH.

We observed GPR50-ir in the ependymal layer of the third ventricle. The basal part corresponding to the expected location of tanycytes was consistently stained with both anti-GPR50 antibodies in all three species studied (mouse, rat, human). This is consistent with several studies reporting expression of GPR50 mRNA [14, 16] and lac Z expression in the GPR50 knockout mice model [11] in this region. In the absence of antibodies directed against tanycyte-specific proteins, we used the intermediate filament protein vimentin to visualize cells of the ependymal

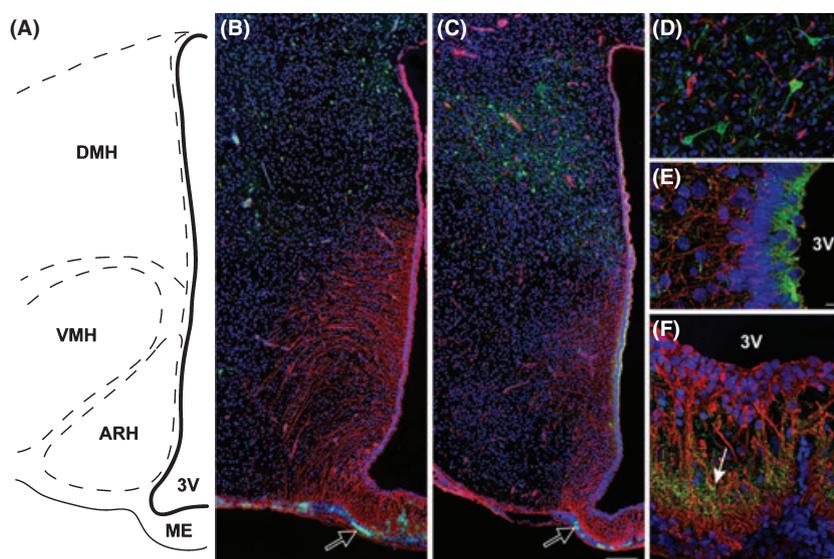


Fig. 4. Microphotographs showing the distribution of GPR50 and vimentin-ir in coronal sections of the tuberal region of the rat hypothalamus. (A) Schematic drawing of the tuberal region of the rat hypothalamus. (B) Low magnification photomontage of pAb5 (green) and vimentin (red) immunofluorescences. pAb5-ir was found in the DMH, median eminence and in cells of the pars tuberalis that lie outside of the capillary zone (empty arrow). (C) Low magnification photomontage of pAb7 (green) and vimentin (red) immunofluorescences. pAb7-ir was found in the DMH, tanycytes, median eminence and in cells of the *pars tuberalis* that lie outside of the capillary zone (empty arrow). (D) High magnification image showing pAb7-ir cells in the DMH. (E,F) High magnification images showing the distribution of pAb7 in tanycytes (E) and the external zone of the median eminence (F, arrow). Tanycytes are visualized in red by their immunoreactivity for the cytoskeleton protein vimentin. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus, ME, median eminence; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus. Scale bar = 200 μ m in C; 20 μ m in D, E and F.

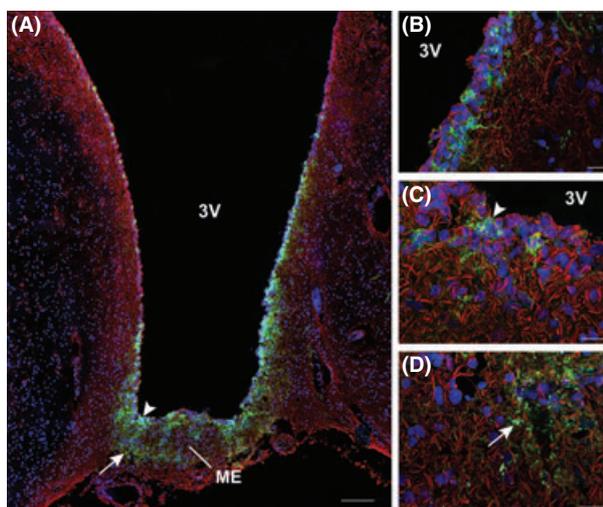


Fig. 5. Microphotographs showing the distribution of polyclonal purified antibody 5 and vimentin-ir in coronal sections of the median eminence in human. (A) Low magnification photomontage of pAb5 (green) and vimentin (red) immunofluorescences. pAb5-ir was found in tanycyte cell bodies (arrowhead) and external zone of the median eminence (arrow). (B–D) High magnification images showing the distribution of pAb5 in tanycytes (B and C, arrowhead) and the external zone of the median eminence (D, arrow). Tanycytes are visualized in red by their immunoreactivity for the cytoskeleton protein vimentin. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle; ME, median eminence. Scale bar = 200 μ m in A; 20 μ m in B, C and D.

layer. Our study shows that the GPR50 protein is expressed in tanycyte cell bodies contacting the third ventricle, which adds GPR50 to the few proteins that are expressed in tanycytes. Staining was also observed in processes extending towards the portal capillaries, in a sub-population most likely belonging to the β -tanycyte subtype [23].

Tanycytes are bipolar cells connecting the cerebrospinal fluid (CSF) with the portal capillaries that are involved in the communication between CSF and the portal blood capillaries serving the pituitary gland [20, 23]. Tanycytes most likely participate in sensing of CSF glucose concentration [24] and in the release of hypothalamic hormones such as GnRH to the portal system [25–27]. They appear to be the only cell type expressing type II deiodinase necessary for the conversion of inactive thyroxine (T4) to active tri iodothyroxine (T3) [28]. Tanycytes have recently been suggested to be an important source of neural stem cells that gives rise to differentiated neuronal cells that migrate to their appropriate location within the hypothalamus [29]. Involvement of tanycytes in the seasonal responsiveness has been suggested [30].

Detection of GPR50 in tanycyte cell bodies and processes suggest that GPR50 could be involved in the transport of molecules from the CSF to the portal blood capillaries. However, this hypothesis could only be confirmed once the ligand(s) of the still orphan GPCR are identified. Localization of GPR50 on the boarder of the third ventricle strongly supports the presence of putative GPR50 ligand(s) in the CSF of the basal part of the third ventricle.

In conclusion, we provide conclusive evidence for GPR50 expression at distinct hypothalamic regions in three

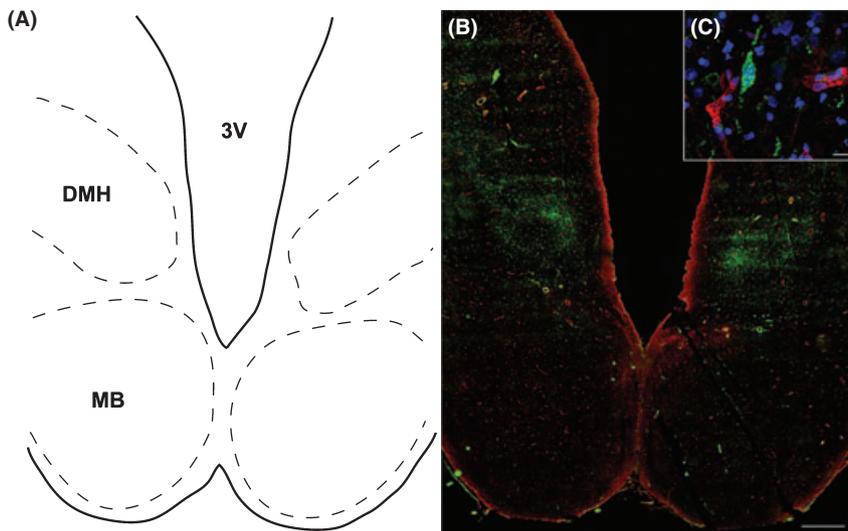


Fig. 6. Microphotographs showing the distribution of polyclonal purified antibody 5 and vimentin-ir in coronal sections of the posterior region of the human hypothalamus. (A) Schematic drawing of the posterior region of the human hypothalamus. (B) Low magnification photomontage of pAb5 (green) and vimentin (red) immunofluorescences. (C) High magnification image showing pAB7-ir cells in the DMH. Cell nuclei are visualized by Hoechst counterstaining (blue). 3V, third ventricle; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; MB, mammillary body. Scale bar = 2000 μm in B; 20 μm in C.

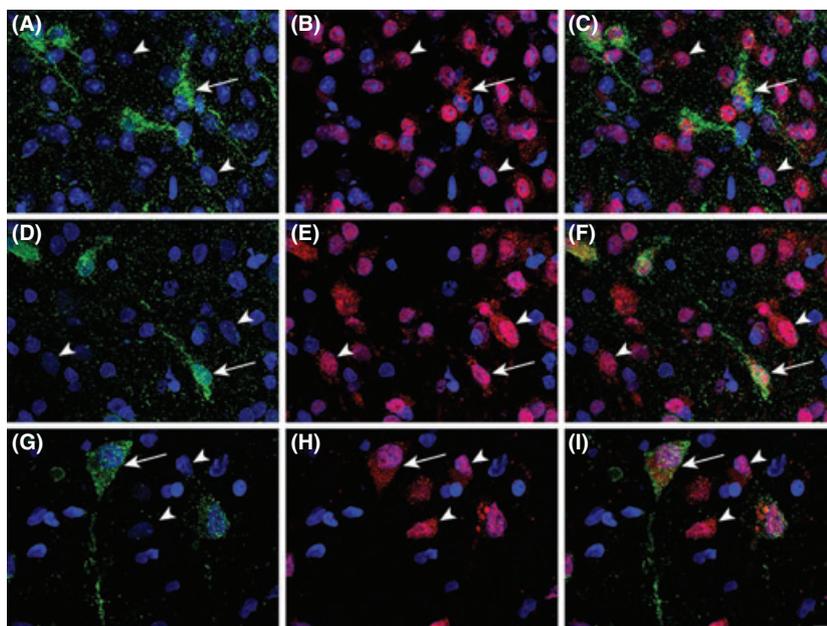


Fig. 7. Morphological identification of GPR50-ir cells in the DMH. (A–C) Micrographs showing the pattern of pAb7 (A) and HuC/D (B) in the mouse DMH. (C) Merged picture of A and B. (D–F) Micrographs showing the pattern of pAb7 (D) and HuC/D (E) in the rat DMH. (F) Merged picture of D and E. (G–I) Micrographs showing the pattern of pAb7 (G) and HuC/D (H) in the human DMH. (I) Merged picture of G and H. All GPR50-ir cells express the neuronal marker HuC/D (arrows) whereas some HuC/D-ir cells do not express GPR50 (arrowheads). Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei. Scale bar = 10 μm in I.

different species suggesting an important role of GPR50 in the hypothalamo-pituitary axes. Our validated antibodies will be valuable tools to further investigate the expression pattern of GPR50 in other tissues and in different physiological and pathological situations.

Acknowledgements

This work was supported by grants from SERVIER, the Fondation Recherche Médicale ('Equipe FRM'), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

References

- ZAWILSKA JB, SKENE DJ, ARENDT J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 2009; **61**:383–410.
- HARDELAND R, TAN DX, REITER RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 2009; **47**:109–126.
- JOCKERS R, MAURICE P, BOUTIN JA et al. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 2008; **154**:1182–1195.
- REPPERT SM, WEAVER DR, EBISAWA T et al. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett* 1996; **386**:219–224.
- DUFURNY L, LEVASSEUR A, MIGAUD M et al. GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol* 2008; **8**:105.
- LEVOYE A, DAM J, AYOUB MA et al. Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep* 2006; **7**:1094–1098.
- THOMSON PA, WRAY NR, THOMSON AM et al. Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and

- GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Mol Psychiatry* 2005; **10**:470–478.
8. BHATTACHARYYA S, LUAN J, CHALLIS B et al. Sequence variants in the melatonin-related receptor gene (GPR50) associate with circulating triglyceride and HDL levels. *J Lipid Res* 2006; **47**:761–766.
 9. LEVOYE A, DAM J, AYOUB MA et al. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT(1) melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* 2006; **25**:3012–3023.
 10. GRUNEWALD E, KINNELL HL, PORTEOUS DJ et al. GPR50 interacts with neuronal NOGO-A and affects neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 2009; **42**:363–371.
 11. IVANOVA EA, BECHTOLD D, DUPRE S et al. Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knock out mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; **294**:E176–E182.
 12. BARRETT P, IVANOVA E, GRAHAM ES et al. Photoperiodic regulation of cellular retinoic acid-binding protein 1, GPR50 and nestin in tanyocytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J Endocrinol* 2006; **191**:687–698.
 13. DREW JE, BARRETT P, WILLIAMS LM et al. The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies. *J Neuroendocrinol* 1998; **10**:651–661.
 14. DREW JE, BARRETT P, MERCER JG et al. Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J Neuroendocrinol* 2001; **13**:453–458.
 15. OULD-HAMOUDA H, CHEN P, LEVOYE A et al. Detection of the human GPR50 orphan seven transmembrane protein by polyclonal antibodies mapping different epitopes. *J Pineal Res* 2007; **43**:10–15.
 16. VASSILATIS DK, HOHMANN JG, ZENG H et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**:4903–4908.
 17. MAI JK, ASSHEUER J, PAXINOS G. *Atlas of the Human Brain*. Academic Press, San Diego, CA, 1997.
 18. PREVOT V. Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 2002; **14**:247–255.
 19. BARONCINI M, ALLET C, LEROY D et al. Morphological evidence for direct interaction between gonadotrophin-releasing hormone neurones and astroglial cells in the human hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2007; **19**:691–702.
 20. MULLIER A, BOURET S, PREVOT V et al. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanyocytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 2010; **9999**.
 21. BERNARDIS LL, BELLINGER LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; **218**:284–306.
 22. FULLER PM, LU J, SAPER CB. Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science* 2008; **320**:1074–1077.
 23. RODRIGUEZ EM, BLAZQUEZ JL, PASTOR FE et al. Hypothalamic tanyocytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 2005; **247**:89–164.
 24. GARCIA MA, MILLAN C, BALMACEDA-AGUILERA C et al. Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* 2003; **86**:709–724.
 25. PREVOT V, DEHOUCQ B, POULAIN P et al. Neuronal-glial-endothelial interactions and cell plasticity in the postnatal hypothalamus: implications for the neuroendocrine control of reproduction. *Psychoneuroendocrinology* 2007; **32**(Suppl 1):S46–S51.
 26. KING JC, LETOURNEAU RJ. Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology* 1994; **134**:1340–1351.
 27. YAMAMURA T, HIRUNAGI K, EBIHARA S et al. Seasonal morphological changes in the neuro-glial interaction between gonadotropin-releasing hormone nerve terminals and glial endfeet in Japanese quail. *Endocrinology* 2004; **145**:4264–4267.
 28. DIANO S, NAFTOLIN F, GOGLIA F et al. Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 1998; **139**:2879–2884.
 29. XU Y, TAMAMAKI N, NODA T et al. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol* 2005; **192**:251–264.
 30. KAMEDA Y, ARAI Y, NISHIMAKI T. Ultrastructural localization of vimentin immunoreactivity and gene expression in tanyocytes and their alterations in hamsters kept under different photoperiods. *Cell Tissue Res* 2003; **314**:251–262.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Microphotographs showing the specificity of GPR50 antibody pAb5 in coronal sections of the tuberal region of the mouse hypothalamus. (A) Low magnification photomontage of GPR50-ir (green). (B) Low magnification photomontage of GPR50-ir (green) after the antibody was incubated with an excess of peptide that corresponds to the epitope recognized by pAb5. The staining from the blocked antibody compared to the antibody alone confirms the specificity of GPR50-ir in the DMH, tanyocytes and ME. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle. Scale bar = 100 μ m in B.

Figure S2. Microphotographs showing the specificity of GPR50 antibody pAb7 in coronal sections of the tuberal region of the mouse hypothalamus. (A) Low magnification photomontage of GPR50-ir (green). (B) Low magnification photomontage of GPR50-ir (green) after the antibody was incubated with an excess of peptide that corresponds to the epitope recognized by pAb7. The staining from the blocked antibody compared to the antibody alone confirms the specificity of GPR50-ir in the DMH, tanyocytes and ME. Sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and identify the morphological limits of each hypothalamic structure. 3V, third ventricle. Scale bar = 100 μ m in B.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

- Akmayev IG, Fidelina OV. 1976. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VI. The tanycytes: their relation to the sexual differentiation of the hypothalamus. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res* 173(3):407-416.
- Akmayev IG, Fidelina OV, Kabolova ZA, Popov AP, Schitkova TA. 1973. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. IV. Medial basal hypothalamus. An experimental morphological study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 137(4):493-512.
- Akmayev IG, Popov AP. 1977. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VII. The tanycytes: Their relation to the hypophyseal adrenocorticotrophic function. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 180(2):263-282.
- Allet C. 2006. Gliogenèse dans l'hypothalamus au cours du développement post-natal: implication dans le contrôle de la maturation sexuelle femelle. Lille II: Université du Droit et de la Santé.
- Altman J, Bayer SA. 1978. Development of the diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle. *J Comp Neurol* 182(4 Pt 2):995-1015.
- Altman J, Bayer SA. 1986. The development of the rat hypothalamus. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 100:1-178.
- Anderson JW, Washburn DL, Ferguson AV. 2000. Intrinsic osmosensitivity of subfornical organ neurons. *Neuroscience* 100(3):539-547.
- Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S. 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol* 133(1):43-47.
- Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. 1989. An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(12):4544-4548.
- Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. 1999. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 274(33):23463-23467.
- Augustine RA, Kokay IC, Andrews ZB, Ladyman SR, Grattan DR. 2003. Quantitation of prolactin receptor mRNA in the maternal rat brain during pregnancy and lactation. *J Mol Endocrinol* 31(1):221-232.
- Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA. 2001a. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276(4):2733-2741.
- Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, Du Pasquier L, Imhof BA. 2001b. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* 98(13):3699-3707.

- Balda MS, Flores-Maldonado C, Cerejido M, Matter K. 2000. Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *J Cell Biochem* 78(1):85-96.
- Balda MS, Garrett MD, Matter K. 2003. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160(3):423-432.
- Balda MS, Matter K. 2000. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J* 19(9):2024-2033.
- Banks WA, Erickson MA. 2009. The Blood-brain Barrier and Immune Function and Dysfunction. *Neurobiol Dis* [Epub ahead of print].
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17(2):305-311.
- Banks WA, Tschop M, Robinson SM, Heiman ML. 2002. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 302(2):822-827.
- Barrett P, Ivanova E, Graham ES, Ross AW, Wilson D, Ple H, Mercer JG, Ebling FJ, Schuhler S, Dupre SM, Loudon A, Morgan PJ. 2006. Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 [corrected] and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J Endocrinol* 191(3):687-698.
- Barth SW, Riediger T, Lutz TA, Rechkemmer G. 2003. Differential effects of amylin and salmon calcitonin on neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and the arcuate nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 341(2):131-134.
- Basco E, Woodhams PL, Hajos F, Balazs R. 1981. Immunocytochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in mouse tanycytes. *Anat Embryol (Berl)* 162(2):217-222.
- Baskin DG, Brewitt B, Davidson DA, Corp E, Paquette T, Figlewicz DP, Lewellen TK, Graham MK, Woods SG, Dorsa DM. 1986. Quantitative autoradiographic evidence for insulin receptors in the choroid plexus of the rat brain. *Diabetes* 35(2):246-249.
- Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR. 2002. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418(6898):650-654.
- Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. 2000. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 275(27):20520-20526.
- Beauvillain JC, Moyse E, Dutriez I, Mitchell V, Poulain P, Mazzuca M. 1992. Localization of mu opioid receptors on the membranes of nerve endings and tanycytes in the guinea-pig median eminence by electron microscopic radioautography. *Neuroscience* 49(4):925-936.
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. 1990. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13(3):198-208.

- Bellinger LL, Bernardis LL. 2002. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav* 76(3):431-442.
- Bennett L, Yang M, Enikolopov G, Iacovitti L. 2009. Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain. *Mol Cell Neurosci* 41(3):337-347.
- Berger UV, Hediger MA. 2001. Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle. *J Comp Neurol* 433(1):101-114.
- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, Malecki A. 2008. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep* 60(5):600-622.
- Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Azuara E, Amerena J, Gonzalez-Mariscal L. 2004. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res* 292(1):51-66.
- Betz AL, Firth JA, Goldstein GW. 1980. Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 192(1):17-28.
- Bhattacharyya S, Luan J, Challis B, Keogh J, Montague C, Brennand J, Morten J, Lowenbeim S, Jenkins S, Farooqi IS, Wareham NJ, O'Rahilly S. 2006. Sequence variants in the melatonin-related receptor gene (GPR50) associate with circulating triglyceride and HDL levels. *J Lipid Res* 47(4):761-766.
- Bjelke B, Fuxe K. 1993. Intraventricular beta-endorphin accumulates in DARPP-32 immunoreactive tanycytes. *Neuroreport* 5(3):265-268.
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS. 1998. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139(8):3485-3491.
- Blazquez JL, Guerra M, Pastor F, Peruzzo B, Amat P, Rodriguez EM. 2002. Antibodies obtained by xenotransplantation of organ-cultured median eminence specifically recognize hypothalamic tanycytes. *Cell Tissue Res* 308(2):241-253.
- Boado RJ, Pardridge WM. 1990. The brain-type glucose transporter mRNA is specifically expressed at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 166(1):174-179.
- Bonaz B, Taylor I, Tache Y. 1993. Peripheral peptide YY induces c-fos-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett* 163(1):77-80.
- Boston BA, Blaydon KM, Varnerin J, Cone RD. 1997. Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. *Science* 278(5343):1641-1644.
- Bouali SM, Fournier A, St-Pierre S, Jolicoeur FB. 1995. Effects of NPY and NPY2-36 on body temperature and food intake following administration into hypothalamic nuclei. *Brain Res Bull* 36(2):131-135.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. 2004. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304(5667):108-110.

- Brightman MW. 1968. The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. *Prog Brain Res* 29:19-40.
- Brightman MW, Prescott L, Reese ST. 1975. Intercellular junctions of special ependyma. In: Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Ishii S, editors. *Brain-Endocrine Interaction II The Ventricular System in Neuroendocrine Mechanisms*: Karger, Basel, Switzerland. p 146-165.
- Brightman MW, Reese TS. 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40(3):648-677.
- Broadwell RD, Balin BJ, Salzman M, Kaplan RS. 1983. Brain-blood barrier? Yes and no. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(23):7352-7356.
- Broadwell RD, Brightman MW. 1976. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol* 166(3):257-283.
- Caldwell FT, Graves DB, Wallace BH. 1998. Studies on the mechanism of fever after intravenous administration of endotoxin. *J Trauma* 44(2):304-312.
- Campfield LA, Smith FJ. 1986. Functional coupling between transient declines in blood glucose and feeding behavior: temporal relationships. *Brain Res Bull* 17(3):427-433.
- Cardona-Gomez GP, Chowen JA, Garcia-Segura LM. 2000. Estradiol and progesterone regulate the expression of insulin-like growth factor-I receptor and insulin-like growth factor binding protein-2 in the hypothalamus of adult female rats. *J Neurobiol* 43(3):269-281.
- Caron E, Sachot C, Prevot V, Bouret SG. 2009. Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. *J Comp Neurol* in press.
- Carretero J, Burks D, Rubio M, Blanco E, Herrero JJ, Bodego P, Juanes JA, Hernandez E, Riesco JM. 2002. Immunocytochemical evidence for growth hormone-releasing hormone in the tanycytes of the median eminence of the rat. *Folia Morphol (Warsz)* 61(4):209-216.
- Cartmell T, Luheshi GN, Rothwell NJ. 1999. Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. *J Physiol* 518 (Pt 2):585-594.
- Chance WT, Balasubramaniam A, Zhang FS, Wimalawansa SJ, Fischer JE. 1991. Anorexia following the intrahypothalamic administration of amylin. *Brain Res* 539(2):352-354.
- Chaudhuri JD. 2000. Blood brain barrier and infection. *Med Sci Monit* 6(6):1213-1222.
- Chauvet N, Apert C, Dumoulin A, Epelbaum J, Alonso G. 1997. Mab22C11 antibody to amyloid precursor protein recognizes a protein associated with specific astroglial cells of the rat central nervous system characterized by their capacity to support axonal outgrowth. *J Comp Neurol* 377(4):550-564.

- Chen P, Smith MS. 2004. Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin. *Endocrinology* 145(2):823-829.
- Chiba A. 2001. Marked distributional difference of alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH)-like immunoreactivity in the brain between two elasmobranchs (*Scyliorhinus torazame* and *Etmopterus brachyurus*): an immunohistochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 122(3):287-295.
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. 2003. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23(33):10691-10702.
- Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prevot V, Levine JE. 2009. Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150(12):5509-5519.
- Ciofi P, Leroy D, Tramu G. 2006. Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* 141(4):1731-1745.
- Citi S, Sabanay H, Kendrick-Jones J, Geiger B. 1989. Cingulin: characterization and localization. *J Cell Sci* 93 (Pt 1):107-122.
- Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. 2009. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 21(8):673-682.
- Claude P. 1978. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 39(2-3):219-232.
- Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26):15191-15196.
- Cone RD. 2005. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8(5):571-578.
- Coomber BL, Stewart PA. 1985. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res* 30(1):99-115.
- Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, Ricquier D, Richard D, Horvath TL, Gao XB, Diano S. 2007. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 5(1):21-33.
- Coppola A, Meli R, Diano S. 2005. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology* 146(6):2827-2833.
- Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S. 1999. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol* 147(7):1569-1582.

- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(2):695-698.
- Cornford EM, Varesi JB, Hyman S, Damian RT, Raleigh MJ. 1997. Mitochondrial content of choroid plexus epithelium. *Exp Brain Res* 116(3):399-405.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411(6836):480-484.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. 2008. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149(8):3926-3932.
- Daftary SS, Gore AC. 2005. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med (Maywood)* 230(5):292-306.
- Dehouck B, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R. 1994. Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* 126(2):465-473.
- Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, Cecchelli R. 1997. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 138(4):877-889.
- Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. 1990. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54(5):1798-1801.
- Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, Bazzoni G. 2000. The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol* 44(6):743-748.
- Del Maschio A, De Luigi A, Martin-Padura I, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella P, Adorini L, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, Dejana E. 1999. Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med* 190(9):1351-1356.
- Dellmann HD, Simpson JB. 1975. Comparative ultrastructure and function of the subfornical organ. In: Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Ishii S, editors. *Brain-Endocrine Interaction II The Ventricular System in Neuroendocrine Mechanisms*: Karger, Basel, Switzerland. p 166-189.
- Dente CJ, Steffes CP, Speyer C, Tyburski JG. 2001. Pericytes augment the capillary barrier in in vitro cocultures. *J Surg Res* 97(1):85-91.
- Descamps L, Dehouck MP, Torpier G, Cecchelli R. 1996. Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol* 270(4 Pt 2):H1149-1158.

- Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, Murphy S, Beaumont T, Rafols JA. 2000. Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvasc Res* 60(1):55-69.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293(5539):2449-2452.
- Drew JE, Barrett P, Mercer JG, Moar KM, Canet E, Delagrangre P, Morgan PJ. 2001. Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J Neuroendocrinol* 13(5):453-458.
- Duenas M, Luquin S, Chowen JA, Torres-Aleman I, Naftolin F, Garcia-Segura LM. 1994. Gonadal hormone regulation of insulin-like growth factor-I-like immunoreactivity in hypothalamic astroglia of developing and adult rats. *Neuroendocrinology* 59(6):528-538.
- Dumont Y, Moysse E, Fournier A, Quirion R. 2007. Distribution of peripherally injected peptide YY ([125I] PYY (3-36)) and pancreatic polypeptide ([125I] hPP) in the CNS: enrichment in the area postrema. *J Mol Neurosci* 33(3):294-304.
- Dunn-Meynell AA, Govek E, Levin BE. 1997. Intracarotid glucose selectively increases Fos-like immunoreactivity in paraventricular, ventromedial and dorsomedial nuclei neurons. *Brain Res* 748(1-2):100-106.
- Duvernoy HM, Risold PY. 2007. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev* 56(1):119-147.
- Ebnet K, Iden S, Gerke V, Suzuki A. 2008. Regulation of epithelial and endothelial junctions by PAR proteins. *Front Biosci* 13:6520-6536.
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S, Vestweber D. 2001. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J* 20(14):3738-3748.
- Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 117(Pt 1):19-29.
- el Hafny B, Bourre JM, Roux F. 1996. Synergistic stimulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities by retinoic acid and astroglial factors in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol* 167(3):451-460.
- El Hafny B, Chappey O, Piciotti M, Debray M, Boval B, Roux F. 1997. Modulation of P-glycoprotein activity by glial factors and retinoic acid in an immortalized rat brain microvessel endothelial cell line. *Neurosci Lett* 236(2):107-111.
- Elkjaer M, Vajda Z, Nejsum LN, Kwon T, Jensen UB, Amiry-Moghaddam M, Frokiaer J, Nielsen S. 2000. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 276(3):1118-1128.

- Elmqvist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB. 1998. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(2):741-746.
- Elmqvist JK, Scammell TE, Jacobson CD, Saper CB. 1996. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *J Comp Neurol* 371(1):85-103.
- Erlich P. 1885. *Das sauerstoffbedürfnis des organismus. Ein farbenanalytische studie.* Herschwald, Berlin. 69-72 p.
- Errante LD, Wiche G, Shaw G. 1994. Distribution of plectin, an intermediate filament-associated protein, in the adult rat central nervous system. *J Neurosci Res* 37(4):515-528.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hrubby VJ, Cone RD. 1997. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385(6612):165-168.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273(45):29745-29753.
- Fanning AS, Little BP, Rahner C, Utepbergenov D, Walther Z, Anderson JM. 2007. The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol Biol Cell* 18(3):721-731.
- Farrell CL, Pardridge WM. 1991. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13):5779-5783.
- Farrell CL, Yang J, Pardridge WM. 1992. GLUT-1 glucose transporter is present within apical and basolateral membranes of brain epithelial interfaces and in microvascular endothelia with and without tight junctions. *J Histochem Cytochem* 40(2):193-199.
- Fekete C, Mihaly E, Herscovici S, Salas J, Tu H, Larsen PR, Lechan RM. 2000. DARPP-32 and CREB are present in type 2 iodothyronine deiodinase-producing tanycytes: implications for the regulation of type 2 deiodinase activity. *Brain Res* 862(1-2):154-161.
- Fernandez-Galaz MC, Morschl E, Chowen JA, Torres-Aleman I, Naftolin F, Garcia-Segura LM. 1997. Role of astroglia and insulin-like growth factor-I in gonadal hormone-dependent synaptic plasticity. *Brain Res Bull* 44(4):525-531.
- Fernandez-Galaz MC, Torres-Aleman I, Garcia-Segura LM. 1996. Endocrine-dependent accumulation of IGF-I by hypothalamic glia. *Neuroreport* 8(1):373-377.
- Fillebeen C, Descamps L, Dehouck MP, Fenart L, Benaissa M, Spik G, Cecchelli R, Pierce A. 1999. Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J Biol Chem* 274(11):7011-7017.
- Flament-Durand J, Brion JP. 1985. Tanycytes: morphology and functions: a review. *Int Rev Cytol* 96:121-155.

- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. 1995. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19):8655-8659.
- Frank HJ, Pardridge WM. 1981. A direct in vitro demonstration of insulin binding to isolated brain microvessels. *Diabetes* 30(9):757-761.
- Fukuhara T, Shimizu K, Kawakatsu T, Fukuyama T, Minami Y, Honda T, Hoshino T, Yamada T, Ogita H, Okada M, Takai Y. 2004. Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins through c-Src and Cdc42-GEF FRG. *J Cell Biol* 166(3):393-405.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123(6 Pt 2):1777-1788.
- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127(6 Pt 1):1617-1626.
- Galli P, Brenna A, Camilli de P, Meldolesi J. 1976. Extracellular calcium and the organization of tight junctions in pancreatic acinar cells. *Exp Cell Res* 99(1):178-183.
- Garcia-Segura LM, Luquin S, Parducz A, Naftolin F. 1994. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* 10(1):59-69.
- Garcia-Segura LM, Rodriguez JR, Torres-Aleman I. 1997. Localization of the insulin-like growth factor I receptor in the cerebellum and hypothalamus of adult rats: an electron microscopic study. *J Neurocytol* 26(7):479-490.
- Garcia MA, Carrasco M, Godoy A, Reinicke K, Montecinos VP, Aguayo LG, Tapia JC, Vera JC, Nualart F. 2001. Elevated expression of glucose transporter-1 in hypothalamic ependymal cells not involved in the formation of the brain-cerebrospinal fluid barrier. *J Cell Biochem* 80(4):491-503.
- Garcia MA, Millan C, Balmaceda-Aguilera C, Castro T, Pastor P, Montecinos H, Reinicke K, Zuniga F, Vera JC, Onate SA, Nualart F. 2003. Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* 86(3):709-724.
- Gazzin S, Strazielle N, Schmitt C, Fevre-Montange M, Ostrow JD, Tiribelli C, Ghersi-Egea JF. 2008. Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCb1 and ABCc1 between blood-brain interfaces. *J Comp Neurol* 510(5):497-507.
- Gentil BJ, Benaud C, Delphin C, Remy C, Berezowski V, Cecchelli R, Feraud O, Vittet D, Baudier J. 2005. Specific AHNAK expression in brain endothelial cells with barrier properties. *J Cell Physiol* 203(2):362-371.
- Ghabriel MN, Zhu C, Hermanis G, Allt G. 2000. Immunological targeting of the endothelial barrier antigen (EBA) in vivo leads to opening of the blood-brain barrier. *Brain Res* 878(1-2):127-135.

- Gherzi-Egea JF, Finnegan W, Chen JL, Fenstermacher JD. 1996. Rapid distribution of intraventricularly administered sucrose into cerebrospinal fluid cisterns via subarachnoid velae in rat. *Neuroscience* 75(4):1271-1288.
- Gherzi-Egea JF, Leninger-Muller B, Suleman G, Siest G, Minn A. 1994. Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *J Neurochem* 62(3):1089-1096.
- Goldgefter L. 1976. Non-diffusional distribution of radioactivity in the rat median eminence after intraventricular injection of ³H-LH-RH. *Cell Tissue Res* 168(3):411-418.
- Goldmann EE. 1909. Die aussere and innere sekretion des gesunden und kranken organismus im lichte der "vitale fardung". *Beitr Klin Chir* 64:192-265.
- Gonul E, Duz B, Kahraman S, Kayali H, Kubar A, Timurkaynak E. 2002. Early pericyte response to brain hypoxia in cats: an ultrastructural study. *Microvasc Res* 64(1):116-119.
- Gotoh H, Okumura A, Nagai K, Okumura N. 2008. Localization of phospho-tyrosine489-beta-adducin immunoreactivity in the hypothalamic tanycytes and its involvement in energy homeostasis. *Brain Res* 1228:97-106.
- Gotow T, Hashimoto PH. 1981. Graded differences in tightness of ependymal intercellular junctions within and in the vicinity of the rat median eminence. *J Ultrastruct Res* 76(3):293-311.
- Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D. 1996. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20):10779-10784.
- Gross PM. 1991. Morphology and physiology of capillary systems in subregions of the subfornical organ and area postrema. *Can J Physiol Pharmacol* 69(7):1010-1025.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. 1997. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48(1):23-29.
- Gudino-Cabrera G, Nieto-Sampedro M. 2000. Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia* 30(1):49-63.
- Guillam MT, Hummler E, Schaerer E, Yeh JI, Birnbaum MJ, Beermann F, Schmidt A, Deriaz N, Thorens B. 1997. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* 17(3):327-330.
- Hallmann R, Mayer DN, Berg EL, Broermann R, Butcher EC. 1995. Novel mouse endothelial cell surface marker is suppressed during differentiation of the blood brain barrier. *Dev Dyn* 202(4):325-332.
- Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. 2002. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277(1):455-461.

- Harre EM, Roth J, Pehl U, Kueth M, Gerstberger R, Hubschle T. 2002. Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *J Appl Physiol* 92(6):2657-2666.
- Harrold JA, Widdowson PS, Williams G. 1999. Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes* 48(2):267-271.
- Hashemi SH, Li JY, Schindler M, Dahlstrom A. 2001. Presence of sst2(a) receptor immunoreactivity in rat ependyma and tanycytes. *Neuroreport* 12(9):1793-1797.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141(1):199-208.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M. 1978. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272(5656):827-829.
- Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H. 1997. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19(1):13-26.
- Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126(14):3047-3055.
- Herbison AE. 1998. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19(3):302-330.
- Herwig A, Wilson D, Logie TJ, Boelen A, Morgan PJ, Mercer JG, Barrett P. 2009. Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(5):R1307-1315.
- Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, Flier JS. 2002. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143(3):775-783.
- Hirabayashi S, Tajima M, Yao I, Nishimura W, Mori H, Hata Y. 2003. JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol* 23(12):4267-4282.
- Hirata K, Ishida T, Penta K, Rezaee M, Yang E, Wohlgemuth J, Quertermous T. 2001. Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 276(19):16223-16231.
- Hoi Sang U, Saier MH, Jr., Ellisman MH. 1979. Tight junction formation is closely linked to the polar redistribution of intramembranous particles in aggregating MDCK epithelia. *Exp Cell Res* 122(2):384-391.

- Hokfelt T, Fuxe K. 1972. Effects of prolactin and ergot alkaloids on the tubero-infundibular dopamine (DA) neurons. *Neuroendocrinology* 9(2):100-122.
- Honda K, Negoro H, Higuchi T, Tadokoro Y. 1987. Activation of neurosecretory cells by osmotic stimulation of anteroventral third ventricle. *Am J Physiol* 252(6 Pt 2):R1039-1045.
- Hong-Goka BC, Chang FL. 2004. Estrogen receptors alpha and beta in choroid plexus epithelial cells in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 360(3):113-116.
- Hopkins SJ, Rothwell NJ. 1995. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 18(2):83-88.
- Hornby PJ. 2001. Central neurocircuitry associated with emesis. *Am J Med* 111 Suppl 8A:106S-112S.
- Horstmann E. 1954. [The fiber glia of selacean brain.]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 39(6):588-617.
- Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B. 2003. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5(2):137-142.
- Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB. 1991. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308(2):249-276.
- Iden S, Rehder D, August B, Suzuki A, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Ohno S, Behrens J, Vestweber D, Ebnet K. 2006. A distinct PAR complex associates physically with VE-cadherin in vertebrate endothelial cells. *EMBO Rep* 7(12):1239-1246.
- Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N. 1999. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 261(1):108-112.
- Inoko A, Itoh M, Tamura A, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. 2003. Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues. *Genes Cells* 8(11):837-845.
- Inui A. 2001. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2(8):551-560.
- Ishida T, Kundu RK, Yang E, Hirata K, Ho YD, Quertermous T. 2003. Targeted disruption of endothelial cell-selective adhesion molecule inhibits angiogenic processes in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 278(36):34598-34604.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. 1999a. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147(6):1351-1363.
- Itoh M, Morita K, Tsukita S. 1999b. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* 274(9):5981-5986.

- Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S, Tsukita S. 1993. The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 121(3):491-502.
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154(3):491-497.
- Ivanova EA, Bechtold DA, Dupre SM, Brennand J, Barrett P, Luckman SM, Loudon AS. 2008. Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(1):E176-182.
- Jaworowicz DJ, Jr., Korytko PJ, Singh Lakhman S, Boje KM. 1998. Nitric oxide and prostaglandin E2 formation parallels blood-brain barrier disruption in an experimental rat model of bacterial meningitis. *Brain Res Bull* 46(6):541-546.
- Joseph SA, Sorrentino S, Sundberg DK. 1975. Releasing hormones, LRF and TRF, in the cerebrospinal fluid of the third ventricle. In: Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Ishii S, editors. *Brain-Endocrine Interaction II The Ventricular System in Neuroendocrine Mechanisms*: Karger, Basel, Switzerland. p 306-312.
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. 1998. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23(1):1-10.
- Kameda Y, Arai Y, Nishimaki T. 2003. Ultrastructural localization of vimentin immunoreactivity and gene expression in tanycytes and their alterations in hamsters kept under different photoperiods. *Cell Tissue Res* 314(2):251-262.
- Karssen AM, Meijer OC, van der Sandt IC, Lucassen PJ, de Lange EC, de Boer AG, de Kloet ER. 2001. Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology* 142(6):2686-2694.
- Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W. 2002. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci* 18(1-2):7-14.
- Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S. 2008. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell* 19(6):2465-2475.
- Kawano H, Daikoku S. 1987. Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 265(2):242-253.
- Keep RF, Jones HC. 1990. A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 56(1):47-53.
- Killian DM, Chikhale PJ. 2001. Predominant functional activity of the large, neutral amino acid transporter (LAT1) isoform at the cerebrovasculature. *Neurosci Lett* 306(1-2):1-4.

- King BM. 2006. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 87(2):221-244.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762):656-660.
- Kozlowski GP, Coates PW. 1985. Ependymoneuronal specializations between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell Tissue Res* 242(2):301-311.
- Krause DN, Duckles SP, Pelligrino DA. 2006. Influence of sex steroid hormones on cerebrovascular function. *J Appl Physiol* 101(4):1252-1261.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. 2008. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 1778(3):631-645.
- Krisch B, Leonhardt H. 1978. The functional and structural border of the neurohemal region of the median eminence. *Cell Tissue Res* 192(2):327-339.
- Krisch B, Leonhardt H, Buchheim W. 1978. The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat. *Cell Tissue Res* 195(3):485-497.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393(6680):72-76.
- Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, Tsukita S. 1999. Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr Biol* 9(18):1035-1038.
- Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K. 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 118(5):1003-1014.
- Langub MC, Jr., Watson RE, Jr. 1992. Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology* 130(1):364-372.
- Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM. 2002. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143(1):155-162.
- Lerant A, Freeman ME. 1998. Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Res* 802(1-2):141-154.
- Leung LW, Contreras RG, Flores-Maldonado C, Cereijido M, Rodriguez-Boulan E. 2003. Inhibitors of glycosphingolipid biosynthesis reduce transepithelial electrical resistance in MDCK I and FRT cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(4):C1021-1030.
- Levine JE. 1997. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biol Reprod* 56(2):293-302.

- Li YZ, Davidowa H. 2004. Food deprivation decreases responsiveness of ventromedial hypothalamic neurons to melanocortins. *J Neurosci Res* 77(4):596-602.
- Lidinsky WA, Drewes LR. 1983. Characterization of the blood-brain barrier: protein composition of the capillary endothelial cell membrane. *J Neurochem* 41(5):1341-1348.
- Ling EA, Kaur C, Lu J. 1998. Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplax cells. *Microsc Res Tech* 41(1):43-56.
- Lippoldt A, Liebner S, Andbjør B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H, Fuxe K. 2000. Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Neuroreport* 11(7):1427-1431.
- Lutz TA, Del Prete E, Scharrer E. 1994. Reduction of food intake in rats by intraperitoneal injection of low doses of amylin. *Physiol Behav* 55(5):891-895.
- Lutz TA, Del Prete E, Scharrer E. 1995. Subdiaphragmatic vagotomy does not influence the anorectic effect of amylin. *Peptides* 16(3):457-462.
- Lutz TA, Mollet A, Rushing PA, Riediger T, Scharrer E. 2001. The anorectic effect of a chronic peripheral infusion of amylin is abolished in area postrema/nucleus of the solitary tract (AP/NTS) lesioned rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25(7):1005-1011.
- Ma YJ, Hill DF, Junier MP, Costa ME, Felder SE, Ojeda SR. 1994. Expression of epidermal growth factor receptor changes in the hypothalamus during the onset of female puberty. *Mol Cell Neurosci* 5(3):246-262.
- Mandarino LJ, Sundarraj N, Finlayson J, Hassell HR. 1993. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res* 57(5):609-621.
- Mangiapane ML, Brody MJ. 1987. Vasoconstrictor and vasodilator sites within anteroventral third ventricle region. *Am J Physiol* 253(6 Pt 2):R827-831.
- Mangiapane ML, Simpson JB. 1980a. Subfornical organ lesions reduce the pressor effect of systemic angiotensin II. *Neuroendocrinology* 31(6):380-384.
- Mangiapane ML, Simpson JB. 1980b. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am J Physiol* 239(5):R382-389.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142(1):117-127.
- Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. 2005. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17(5):453-458.

- McKinley MJ, Badoer E, Oldfield BJ. 1992. Intravenous angiotensin II induces Fos-immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. *Brain Res* 594(2):295-300.
- Meister B, Hokfelt T, Tsuruo Y, Hemmings H, Ouimet C, Greengard P, Goldstein M. 1988. DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein in tanyocytes of the mediobasal hypothalamus: distribution and relation to dopamine and luteinizing hormone-releasing hormone neurons and other glial elements. *Neuroscience* 27(2):607-622.
- Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P. 1999. Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 403(2):261-280.
- Millhouse OE. 1975. Lining of the third ventricle in the rat. In: Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Ishii S, editors. *Brain-Endocrine Interaction II - The Ventricular System in Neuroendocrine Mechanisms*. Shizuoka: Karger, Basel, Switzerland. p 3-18.
- Moller M, Baeres FM. 2002. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 309(1):139-150.
- Morgan L, Shah B, Rivers LE, Barden L, Groom AJ, Chung R, Higazi D, Desmond H, Smith T, Staddon JM. 2007. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 147(3):664-673.
- Morin SM, Stotz-Potter EH, DiMicco JA. 2001. Injection of muscimol in dorsomedial hypothalamus and stress-induced Fos expression in paraventricular nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(5):R1276-1284.
- Moroi S, Saitou M, Fujimoto K, Sakakibara A, Furuse M, Yoshida O, Tsukita S. 1998. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1):C1708-1717.
- Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ. 2008. Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* 93(7):773-797.
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8(10):1298-1308.
- Mumford AD, Parry LJ, Summerlee AJ. 1989. Lesion of the subfornical organ affects the haemotensive response to centrally administered relaxin in anaesthetized rats. *J Endocrinol* 122(3):747-755.
- Murakami T, Felinski EA, Antonetti DA. 2009. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced permeability. *J Biol Chem*.
- Muroya S, Yada T, Shioda S, Takigawa M. 1999. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci Lett* 264(1-3):113-116.

- Nakai Y, Naito N. 1975. Uptake and bidirectional uptake of peroxydase injected into the blood and cerebrospinal fluid by ependymal cells of the median eminence. In: Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Ishii S, editors. Brain-Endocrine Interaction II The Ventricular System in Neuroendocrine Mechanisms: Karger, Basel, Switzerland. p 94-108.
- Nakao N, Ono H, Yamamura T, Anraku T, Takagi T, Higashi K, Yasuo S, Katou Y, Kageyama S, Uno Y, Kasukawa T, Iigo M, Sharp PJ, Iwasawa A, Suzuki Y, Sugano S, Niimi T, Mizutani M, Namikawa T, Ebihara S, Ueda HR, Yoshimura T. 2008. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452(7185):317-322.
- Nakao N, Takagi T, Iigo M, Tsukamoto T, Yasuo S, Masuda T, Yanagisawa T, Ebihara S, Yoshimura T. 2006. Possible involvement of organic anion transporting polypeptide 1c1 in the photoperiodic response of gonads in birds. *Endocrinology* 147(3):1067-1073.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409(6817):194-198.
- Nasdala I, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Kuhn A, Ebnet K, Brachtendorf G, Samulowitz U, Kuster B, Engelhardt B, Vestweber D, Butz S. 2002. A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem* 277(18):16294-16303.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161(3):653-660.
- Norsted E, Gomuc B, Meister B. 2008. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 36(2):107-121.
- Ohkubo T, Niwa M, Yamashita K, Kataoka Y, Shigematsu K. 1990. Neuropeptide Y (NPY) and peptide YY (PYY) receptors in rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 10(4):539-552.
- Ohnishi H, Nakahara T, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M. 2004. JACOP, a novel plaque protein localizing at the apical junctional complex with sequence similarity to cingulin. *J Biol Chem* 279(44):46014-46022.
- Ohno S. 2001. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13(5):641-648.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau US. 2008. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 20(6):732-742.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. 1997. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278(5335):135-138.
- Olney JW. 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164(880):719-721.

- Ono T, Steffens AB, Sasaki K. 1983. Influence of peripheral and intracerebroventricular glucose and insulin infusions on peripheral and cerebrospinal fluid glucose and insulin levels. *Physiol Behav* 30(2):301-306.
- Palade GE, Simionescu M, Simionescu N. 1979. Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta Physiol Scand Suppl* 463:11-32.
- Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD. 2000. Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275(25):19139-19145.
- Pan W, Kastin AJ. 2000. Interactions of IGF-1 with the blood-brain barrier in vivo and in situ. *Neuroendocrinology* 72(3):171-178.
- Pardridge WM. 2003. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv* 3(2):90-105, 151.
- Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. 1990. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem* 265(29):18035-18040.
- Pardridge WM, Kang YS, Buciak JL, Yang J. 1995. Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood-brain barrier in vivo in the primate. *Pharm Res* 12(6):807-816.
- Pardridge WM, Mietus LJ. 1979. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest* 64(1):145-154.
- Parton RG, Simons K. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3):185-194.
- Peiser C, McGregor GP, Lang RE. 2000. Binding and internalization of leptin by porcine choroid plexus cells in culture. *Neurosci Lett* 283(3):209-212.
- Pelletier G, Luu-The V, Labrie F. 1994. Immunocytochemical localization of 5 alpha-reductase in rat brain. *Mol Cell Neurosci* 5(5):394-399.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. 2006. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443(7112):700-704.
- Peruzzo B, Pastor FE, Blazquez JL, Amat P, Rodriguez EM. 2004. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res* 317(2):147-164.
- Peruzzo B, Pastor FE, Blazquez JL, Schobitz K, Pelaez B, Amat P, Rodriguez EM. 2000. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp Brain Res* 132(1):10-26.
- Petersenn S. 2002. Structure and regulation of the growth hormone secretagogue receptor. *Minerva Endocrinol* 27(4):243-256.

- Petrov T, Howarth AG, Krukoff TL, Stevenson BR. 1994. Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 21(3-4):235-246.
- Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *Faseb J* 22(1):146-158.
- Poorkhalkali N, Juneblad K, Jonsson AC, Lindberg M, Karlsson O, Wallbrandt P, Ekstrand J, Lehmann A. 2000. Immunocytochemical distribution of the GABA(B) receptor splice variants GABA(B) R1a and R1b in the rat CNS and dorsal root ganglia. *Anat Embryol (Berl)* 201(1):1-13.
- Popescu BO, Toescu EC, Popescu LM, Bajenaru O, Muresanu DF, Schultzberg M, Bogdanovic N. 2009. Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. *J Neurol Sci* 283(1-2):99-106.
- Preston JE, Segal MB. 1992. The uptake of anionic and cationic amino acids by the isolated perfused sheep choroid plexus. *Brain Res* 581(2):351-355.
- Prevot V, Bouret S, Croix D, Takumi T, Jennes L, Mitchell V, Beauvillain JC. 2000. Evidence that members of the TGFbeta superfamily play a role in regulation of the GnRH neuroendocrine axis: expression of a type I serine-threonine kinase receptor for TGRbeta and activin in GnRH neurones and hypothalamic areas of the female rat. *J Neuroendocrinol* 12(7):665-670.
- Prevot V, Cornea A, Mungenast A, Smiley G, Ojeda SR. 2003. Activation of erbB-1 signaling in tanycytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity. *J Neurosci* 23(33):10622-10632.
- Prevot V, Croix D, Bouret S, Dutoit S, Tramu G, Stefano GB, Beauvillain JC. 1999. Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* 94(3):809-819.
- Prewitt CM, Herman JP. 1998. Anatomical interactions between the central amygdaloid nucleus and the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat: a dual tract-tracing analysis. *J Chem Neuroanat* 15(3):173-185.
- Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM. 2008. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 149(9):4387-4395.
- Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, Fuxe J. 2004. CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 279(1):796-804.
- Reese TS, Karnovsky MJ. 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34(1):207-217.

- Reinhardt RR, Bondy CA. 1994. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology* 135(5):1753-1761.
- Rethelyi M. 1984. Diffusional barrier around the hypothalamic arcuate nucleus in the rat. *Brain Res* 307(1-2):355-358.
- Rethelyi M, Fockter V. 1982. The fiber architecture of the rat median eminence with some accidental observations on the significance of tanycyte processes. *Acta Biol Acad Sci Hung* 33(2-3):289-300.
- Richard D, Bourque CW. 1995. Synaptic control of rat supraoptic neurones during osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis in vitro. *J Physiol* 489 (Pt 2):567-577.
- Riediger T, Schmid HA, Lutz T, Simon E. 2001. Amylin potently activates AP neurons possibly via formation of the excitatory second messenger cGMP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(6):R1833-1843.
- Riediger T, Schmid HA, Lutz TA, Simon E. 2002. Amylin and glucose co-activate area postrema neurons of the rat. *Neurosci Lett* 328(2):121-124.
- Rodriguez EM. 1972. Comparative and functional morphology of the median eminence. In: Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Ishii S, editors. *Brain-Endocrine Interaction I Median Eminence: Structure and Function*: Karger, Basel, Switzerland. p 319-334.
- Rodriguez EM, Blazquez JL, Pastor FE, Pelaez B, Pena P, Peruzzo B, Amat P. 2005. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247:89-164.
- Rodriguez EM, Gonzalez CB, Delannoy L. 1979. Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res* 201(3):377-408.
- Rodriguez EM, Rodriguez S, Hein S. 1998. The subcommissural organ. *Microsc Res Tech* 41(2):98-123.
- Roh MH, Fan S, Liu CJ, Margolis B. 2003. The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci* 116(Pt 14):2895-2906.
- Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. 2002a. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem* 277(30):27501-27509.
- Roh MH, Makarova O, Liu CJ, Shin K, Lee S, Laurinec S, Goyal M, Wiggins R, Margolis B. 2002b. The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* 157(1):161-172.
- Rose JM, Audus KL. 1998. Receptor-mediated angiotensin II transcytosis by brain microvessel endothelial cells. *Peptides* 19(6):1023-1030.

- Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA, Bloom SR. 1998. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139(10):4428-4431.
- Rothwell NJ, Hopkins SJ. 1995. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18(3):130-136.
- Rouget C. 1873. Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques. *Arch Physiol Norm Path* 5:603-663.
- Rowland NE, Crews EC, Gentry RM. 1997. Comparison of Fos induced in rat brain by GLP-1 and amylin. *Regul Pept* 71(3):171-174.
- Saavedra JM. 1986. Atrial natriuretic peptide (6-33) binding sites: decreased number and affinity in the subfornical organ of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 4(3):S313-316.
- Sagar SM, Price KJ, Kasting NW, Sharp FR. 1995. Anatomic patterns of Fos immunostaining in rat brain following systemic endotoxin administration. *Brain Res Bull* 36(4):381-392.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11(12):4131-4142.
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 137(6):1393-1401.
- Sanchez E, Vargas MA, Singru PS, Pascual I, Romero F, Fekete C, Charli JL, Lechan RM. 2009. Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology* 150(5):2283-2291.
- Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J. 2005. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* 28(3):152-157.
- Sato Y, Rifkin DB. 1989. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 109(1):309-315.
- Satoh H, Zhong Y, Isomura H, Saitoh M, Enomoto K, Sawada N, Mori M. 1996. Localization of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. *Exp Cell Res* 222(2):269-274.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Rivier J, Vale WW. 1985. The distribution of growth-hormone-releasing factor (GRF) immunoreactivity in the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study using antisera directed against rat hypothalamic GRF. *J Comp Neurol* 237(1):100-115.

- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, et al. 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77(4):491-502.
- Schulz M, Engelhardt B. 2005. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Res* 2:8.
- Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D, Jr. 1996. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2(5):589-593.
- Sexton PM, Paxinos G, Kenney MA, Wookey PJ, Beaumont K. 1994. In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. *Neuroscience* 62(2):553-567.
- Shan J, Krukoff TL. 2000. Area postrema ablation attenuates activation of neurones in the paraventricular nucleus in response to systemic adrenomedullin. *J Neuroendocrinol* 12(8):802-810.
- Shaver SW, Pang JJ, Wainman DS, Wall KM, Gross PM. 1992. Morphology and function of capillary networks in subregions of the rat tuber cinereum. *Cell Tissue Res* 267(3):437-448.
- Shaver SW, Sposito NM, Gross PM. 1990. Quantitative fine structure of capillaries in subregions of the rat subfornical organ. *J Comp Neurol* 294(1):145-152.
- Shin K, Fogg VC, Margolis B. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:207-235.
- Shin K, Straight S, Margolis B. 2005. PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* 168(5):705-711.
- Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. 2001. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50(2):227-232.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP. 1999. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285(5424):103-106.
- Skinner DC, Malpoux B, Delaleu B, Caraty A. 1995. Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of the ewe: correlation with LH pulses and the LH surge. *Endocrinology* 136(8):3230-3237.
- Smith GM, Shine HD. 1992. Immunofluorescent labeling of tight junctions in the rat brain and spinal cord. *Int J Dev Neurosci* 10(5):387-392.

- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146(9):3686-3692.
- Smith PM, Ferguson AV. 1997. Vasopressin acts in the subfornical organ to decrease blood pressure. *Neuroendocrinology* 66(2):130-135.
- Smoller CG. 1965. Neurosecretory Processes Extending into Third Ventricle: Secretary or Sensory? *Science* 147:882-884.
- Sobue K, Yamamoto N, Yoneda K, Hodgson ME, Yamashiro K, Tsuruoka N, Tsuda T, Katsuya H, Miura Y, Asai K, Kato T. 1999. Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci Res* 35(2):155-164.
- Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, Sawada N. 2004. Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp Cell Res* 300(1):202-212.
- Song K, Allen AM, Paxinos G, Mendelsohn FA. 1992. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J Comp Neurol* 316(4):467-484.
- Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, Ali RR, Pestell R, Matter K, Balda MS. 2006. Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 26(6):2387-2398.
- Stanley BG, Leibowitz SF. 1985. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(11):3940-3943.
- Steffen BJ, Breier G, Butcher EC, Schulz M, Engelhardt B. 1996. ICAM-1, VCAM-1, and MADCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. *Am J Pathol* 148(6):1819-1838.
- Steffen BJ, Butcher EC, Engelhardt B. 1994. Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *Am J Pathol* 145(1):189-201.
- Steffens AB, Scheurink AJ, Porte D, Jr., Woods SC. 1988. Penetration of peripheral glucose and insulin into cerebrospinal fluid in rats. *Am J Physiol* 255(2 Pt 2):R200-204.
- Stevenson BR, Heintzelman MB, Anderson JM, Citi S, Mooseker MS. 1989. ZO-1 and cingulin: tight junction proteins with distinct identities and localizations. *Am J Physiol* 257(4 Pt 1):C621-628.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103(3):755-766.
- Stirone C, Duckles SP, Krause DN. 2003. Multiple forms of estrogen receptor-alpha in cerebral blood vessels: regulation by estrogen. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(1):E184-192.

- Stitt JT. 1985. Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats. *J Physiol* 368:501-511.
- Stoll J, Wadhvani KC, Smith QR. 1993. Identification of the cationic amino acid transporter (System y⁺) of the rat blood-brain barrier. *J Neurochem* 60(5):1956-1959.
- Straight SW, Shin K, Fogg VC, Fan S, Liu CJ, Roh M, Margolis B. 2004. Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell* 15(4):1981-1990.
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF. 2000. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 59(7):561-574.
- Sun K, Ferguson AV. 1997. Cholecystokinin activates area postrema neurons in rat brain slices. *Am J Physiol* 272(5 Pt 2):R1625-1630.
- Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K, Ohno S. 2002. aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *J Cell Sci* 115(Pt 18):3565-3573.
- Takahashi Y, Smith P, Ferguson A, Pittman QJ. 1997. Circumventricular organs and fever. *Am J Physiol* 273(5 Pt 2):R1690-1695.
- Takai Y, Nakanishi H. 2003. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 116(Pt 1):17-27.
- Takenaga Y, Takagi N, Murotomi K, Tanonaka K, Takeo S. 2009. Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 29(6):1099-1108.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83(7):1263-1271.
- Thompson RH, Swanson LW. 1998. Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res Brain Res Rev* 27(2):89-118.
- Thomzig A, Laube G, Pruss H, Veh RW. 2005. Pore-forming subunits of K-ATP channels, Kir6.1 and Kir6.2, display prominent differences in regional and cellular distribution in the rat brain. *J Comp Neurol* 484(3):313-330.
- Thomzig A, Wenzel M, Karschin C, Eaton MJ, Skatchkov SN, Karschin A, Veh RW. 2001. Kir6.1 is the principal pore-forming subunit of astrocyte but not neuronal plasma membrane K-ATP channels. *Mol Cell Neurosci* 18(6):671-690.
- Tilling T, Korte D, Hoheisel D, Galla HJ. 1998. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem* 71(3):1151-1157.
- Touzani K, Sclafani A. 2002. Area postrema lesions impair flavor-toxin aversion learning but not flavor-nutrient preference learning. *Behav Neurosci* 116(2):256-266.

- Tran ND, Correale J, Schreiber SS, Fisher M. 1999. Transforming growth factor-beta mediates astrocyte-specific regulation of brain endothelial anticoagulant factors. *Stroke* 30(8):1671-1678.
- Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F, Bauer HC, Bauer H. 2002. The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem* 277(12):10201-10208.
- Traweger A, Lehner C, Farkas A, Krizbai IA, Tempfer H, Klement E, Guenther B, Bauer HC, Bauer H. 2008. Nuclear Zonula occludens-2 alters gene expression and junctional stability in epithelial and endothelial cells. *Differentiation* 76(1):99-106.
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407(6806):908-913.
- Tsukita S, Furuse M. 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149(1):13-16.
- Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM. 1997. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138(8):3359-3368.
- Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. 1996. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379(6560):69-72.
- Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, Takagi H, Honda Y, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Nishikawa S. 2002. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J Clin Invest* 110(11):1619-1628.
- Uhr M, Holsboer F, Muller MB. 2002. Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins. *J Neuroendocrinol* 14(9):753-759.
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126(4):741-754.
- Van Itallie CM, Anderson JM. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68:403-429.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I. 1998. Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microsc Res Tech* 41(1):57-83.
- Virgintino D, Robertson D, Errede M, Benagiano V, Tauer U, Roncali L, Bertossi M. 2002. Expression of caveolin-1 in human brain microvessels. *Neuroscience* 115(1):145-152.
- Vivas L, Chiaraviglio E, Carrer HF. 1990. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to changes in sodium concentration. *Brain Res* 519(1-2):294-300.

- Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. 2003. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Brain Res Rev* 42(3):221-242.
- Wagner HJ, Pilgrim C. 1974. Extracellular and transcellular transport of horseradish peroxidase (HRP) through the hypothalamic tanycyte ependyma. *Cell Tissue Res* 152(4):477-491.
- Walsh RJ, Posner BI, Kopriwa BM, Brawer JR. 1978. Prolactin binding sites in the rat brain. *Science* 201(4360):1041-1043.
- Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI. 1987. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120(5):1846-1850.
- Wan W, Wetmore L, Sorensen CM, Greenberg AH, Nance DM. 1994. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 34(1):7-14.
- Wang QP, Guan JL, Pan W, Kastin AJ, Shioda S. 2008. A diffusion barrier between the area postrema and nucleus tractus solitarius. *Neurochem Res* 33(10):2035-2043.
- Wang Z, Mandell KJ, Parkos CA, Mrsny RJ, Nusrat A. 2005. The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene* 24(27):4412-4420.
- Wegmann F, Ebnet K, Du Pasquier L, Vestweber D, Butz S. 2004. Endothelial adhesion molecule ESAM binds directly to the multidomain adaptor MAGI-1 and recruits it to cell contacts. *Exp Cell Res* 300(1):121-133.
- Wei LC, Shi M, Chen LW, Cao R, Zhang P, Chan YS. 2002. Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Brain Res Dev Brain Res* 139(1):9-17.
- Weindl A, Schinko I. 1975. Vascular and ventricular neurosecretion in the organum vasculosum of the lamina terminalis of the golden hamster. In: Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Ishii S, editors. *Brain-Endocrine Interaction II The Ventricular System*: Karger, Basel, Switzerland. p 190-203.
- Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS. 2004. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol* 24(19):8408-8417.
- Wisialowski T, Parker R, Preston E, Sainsbury A, Kraegen E, Herzog H, Cooney G. 2000. Adrenalectomy reduces neuropeptide Y-induced insulin release and NPY receptor expression in the rat ventromedial hypothalamus. *J Clin Invest* 105(9):1253-1259.
- Wolburg H, Lippoldt A. 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38(6):323-337.
- Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W. 1994. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 5):1347-1357.

- Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* 335(1):75-96.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 105(6):586-592.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B. 2001. Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci Lett* 307(2):77-80.
- Xu J, Kausalya PJ, Phua DC, Ali SM, Hossain Z, Hunziker W. 2008. Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Mol Cell Biol* 28(5):1669-1678.
- Yamamoto H, Kishi T, Lee CE, Choi BJ, Fang H, Hollenberg AN, Drucker DJ, Elmquist JK. 2003. Glucagon-like peptide-1-responsive catecholamine neurons in the area postrema link peripheral glucagon-like peptide-1 with central autonomic control sites. *J Neurosci* 23(7):2939-2946.
- Yang B, Ferguson AV. 2002. Orexin-A depolarizes dissociated rat area postrema neurons through activation of a nonselective cationic conductance. *J Neurosci* 22(15):6303-6308.
- Yasuo S, Watanabe M, Nakao N, Takagi T, Follett BK, Ebihara S, Yoshimura T. 2005. The reciprocal switching of two thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes is involved in the photoperiodic gonadal response of Japanese quail. *Endocrinology* 146(6):2551-2554.
- Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S. 2003. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* 426(6963):178-181.
- Zaretskaia MV, Zaretsky DV, Sarkar S, Shekhar A, DiMicco JA. 2008. Induction of Fos-immunoreactivity in the rat brain following disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 1200:39-50.
- Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R. 2005. Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm* 71:345-372.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505):425-432.
- Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K, Mori M. 1993. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* 120(2):477-483.
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. 2006. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494(3):528-548.